

УДК 576.3:57.017.642:602.9

ПОЛУЧЕНИЕ НЕЙРОНОВ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

© 2014 г. А.Г. Мензоров

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;
Федеральное государственное бюджетное учреждение
научно-исследовательский институт медицинской генетики
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Томск, Россия;
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»,
Новосибирск, Россия, e-mail: menzorov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 2 сентября 2014 г. Принята к публикации 31 октября 2014 г.

Продолжительность жизни людей существенно увеличилась за последнее время, что привело к росту доли «возрастных» болезней, в том числе нейродегенеративных заболеваний. Одно из перспективных направлений их лечения – клеточная терапия. Для клеточной терапии оптимально использовать пациент-специфические клетки для того, чтобы избежать иммунного ответа. В обзоре рассмотрены современные подходы изменения клеточной судьбы с акцентом на получение нейральных клеток с помощью трансдифференцировки. Для получения нейральных клеток можно проводить дифференцировку эмбриональных стволовых клеток в нейроны. Такие клетки будут гетерологичными, кроме того, при использовании производных плюрипотентных клеток есть риск формирования опухолей. Терапевтическое клонирование даст возможность получить аутологичные эмбриональные стволовые клетки, которые можно дифференцировать в нейроны, однако могут возникнуть этические проблемы. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки позволяют получить пациент-специфические нейроны, однако остается риск появления опухолей. Трансдифференцировка – перспективная технология получения пациент-специфических нейронов из фибробластов, минуя стадию плюрипотентности. Однако возникает вопрос полноты репрограммирования фибробластов в нейроны и функциональности нейронов. Кроме того, зрелые нейроны будет затруднительно использовать в клеточной терапии, так как их относительно мало и они плохо переносят трансплантацию. Поэтому в настоящее время оптимальная стратегия получения клеточного материала для клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний – использование нейральных стволовых клеток. Для пациент-специфических нейральных стволовых клеток можно использовать индуцированные плюрипотентные стволовые клетки или трансдифференцировку фибробластов или астроцитов. В обзоре рассмотрены современные данные по трансдифференцировке различных типов клеток человека в нейроны и в клетки-предшественники нейронов. В целом использование пациент-специфических нейральных стволовых клеток даст возможность в будущем проводить терапию некоторых нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, клонирование, плюрипотентность, репрограммирование, трансдифференцировка, нейроны.

ВВЕДЕНИЕ

Клеточная терапия – одно из наиболее перспективных направлений медицины. Замещение поврежденных или нефункционирующих клеток может стать методом лечения

болезней, на сегодняшний день считающихся неизлечимыми. В целом клеточную терапию можно разделить на несколько направлений: трансплантация клеток-предшественников, соматических стволовых клеток, трансплантация дифференцированных клеток, готовых

к выполнению своих функций, и трансплантация генетически модифицированных клеток с исправленными дефектами. Сейчас использование клеточной терапии в практике ограничивается переливанием крови и трансплантацией костного мозга.

Для широкого применения клеточной терапии в лечении заболеваний необходимо решить несколько проблем. Во-первых, введение чужеродного клеточного материала вызывает иммунологическое отторжение. Так, при пересадке органов и костного мозга определяют близость антигенов главного комплекса гистосовместимости, что существенно ограничивает возможности поиска донора. Даже при использовании «совместимого» материала реципиенты вынуждены принимать иммунодепрессанты в течение всей жизни. Во-вторых, возможность получить клетки донора физически ограничена – доступны лишь некоторые клеточные типы, например клетки костного мозга, но количество этих клеток может быть недостаточным для лечения. Если же говорить про нейроны, гепатоциты и другие специализированные клетки, то их практически невозможно получить от доноров. В-третьих, дифференцированные клетки взрослого организма чаще всего уже не способны к делению, функционируют в сформированной клеточной нише и поэтому не могут быть использованы для пересадки.

Заболевания нервной системы, связанные с нарушением функционирования и гибелью нейронов, такие как болезни Альцгеймера и Паркинсона, в настоящее время практически не поддаются лечению. Рассеянный склероз – болезнь, связанная с демиелинизацией аксонов в центральной и периферической нервной системе, также неизлечима. В то же время известно, что, например, признаком болезни Паркинсона является гибель дофаминергических нейронов в черной субстанции среднего мозга, а при рассеянном склерозе выработку миелина прекращают олигодендроциты. Трансплантация функциональных нейральных клеток может быть перспективным подходом для лечения таких заболеваний.

Ниже будут рассмотрены различные способы получения нейральных клеток для клеточной терапии, перспективы применения и имеющиеся проблемы.

РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Все разнообразие типов клеток в нормальном развитии – нейроны, клетки кожи, крови, печени и другие формируется в результате деления и дифференцировки одной клетки – зиготы. Эмбриональное развитие можно представить как дерево, в основе которого лежит одна клетка, зигота, а ветви, отходящие от ствола, символизируют последовательную дифференцировку клеток. Способность к делению и дифференцировке в клетки, производные трех зародышевых листков, энтодермы, мезодермы и эктодермы, называется плюрипотентностью. Программа развития осуществляется путем последовательной активации различных групп транскрипционных факторов, которые регулируют экспрессию множества генов. На экспрессию генов влияют как внутренние факторы, так и внешние сигналы, например получаемые от окружающих клеток.

В экспериментальных системах и в некоторых случаях в нормальном развитии возможно изменение судьбы клеток (рис. 1). Дифференцировка – превращение недифференцированных клеток или клеток-предшественников в дифференцированные со специфическими функциями. Обратный процесс называется дедифференцировкой. Превращение одного предшественника клеток в другой – трансдетерминация. Например, в процессе кроветворения гемопоэтические стволовые клетки дифференцируются в предшественников лимфоидного ряда (лимфоциты и др.) и миелоидного ряда (гранулоциты, макрофаги, эритроциты и др.). Оказалось, что в экспериментальной системе можно вызвать трансдетерминацию, с помощью экспрессии транскрипционных факторов изменить судьбу предшественников миелоидного ряда так, что они дифференцируются в предшественников гранулоцитов и макрофагов или (в другом эксперименте) в предшественников эритроцитов (Orkin, Zon, 2008). И, наконец, недавно была показана прямая дифференцировка – эмбриональные стволовые клетки можно напрямую дифференцировать в нейроны в результате экспрессии определенных транскрипционных факторов. Прямой такая дифференцировка названа из-за того, что обязательные в нормальном

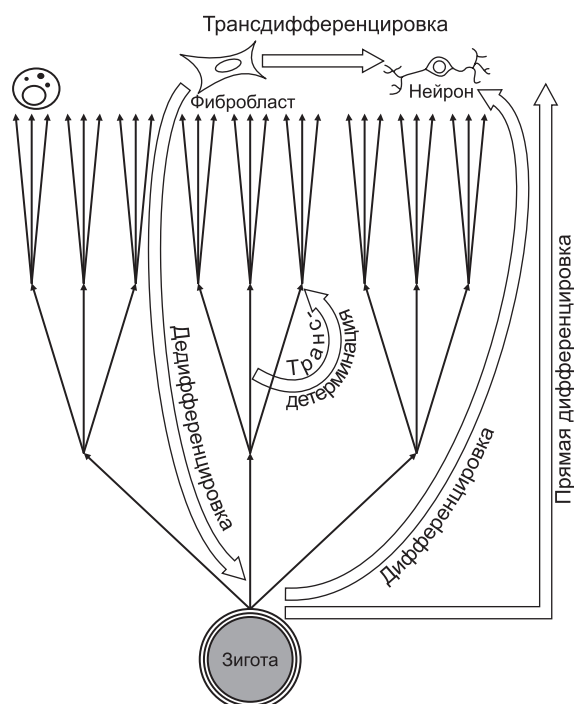


Рис. 1. Различные пути изменения судьбы клетки.

Нормальное развитие – дифференцировка тотипотентной зиготы в различные типы клеток с постепенным сужением потенциала к дифференцировке. В эксперименте можно изменить судьбу клетки – вызвать дедифференцировку, трансдетерминацию, трансдифференцировку или прямую дифференцировку (по: Vierbuchen, Wernig, 2011, с модификациями).

Fig. 1. Different ways to change the cell fate.

In the normal development, a totipotent zygote gives rise to different cell types with gradual decrease in differentiation potential. Cell fate can be changed in experiments by induction of dedifferentiation, transdetermination, transdifferentiation, or direct differentiation (Vierbuchen, Wernig, 2011, with modifications).

развитии стадии дифференцировки в этом случае не проходятся. Наконец, превращение дифференцированной клетки одного типа в другой без прохождения стадий дедифференцировки – трансдифференцировка.

Все вышеописанные способы изменения судьбы клетки потенциально пригодны для использования в клеточной терапии. Ниже будут рассмотрены возможности применения этих подходов с акцентом на получении нейральных клеток и использовании относительно нового направления в исследованиях – трансдифференцировки.

ПОЛУЧЕНИЕ НЕЙРОНОВ ИЗ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Клетки внутренней массы бластоцисты в процессе нормального развития дифференцируются во все типы клеток взрослого организма. Эти клетки можно выделить *in vitro* и практически неограниченно размножить. Недифференцированные клетки в культуре, способные к неограниченному размножению и к дифференцировке в специализированные типы клеток, были названы «эмбриональными стволовыми клетками». Впервые эмбриональные стволовые

(ЭС) клетки были получены Эвансом и Кауфманом из бластоцист мыши (Evans, Kaufman, 1981). В 1998 г. Томсон получил ЭС клетки человека (Thomson *et al.*, 1998). Появление плюрипотентных ЭС клеток открыло новые перспективы клеточной терапии. Исследователи смогли получить путем дифференцировки ЭС клеток различные типы клеток, в том числе и нейроны (Wobus, Boheler, 2005).

Следует отметить проблемы, связанные с применением ЭС клеток в медицине. Некоторые считают неэтичным разрушение эмбрионов человека даже на такой ранней стадии развития, как бластоциста. Из-за этических проблем число полученных линий ЭС клеток невелико. Это затрудняет использование полученных из ЭС клеток дифференцированных производных в клеточной терапии. Среди небольшого числа линий клеток сложно найти сходные по главному комплексу гистосовместимости, а значит, для большинства пациентов не удастся подобрать иммунологически совместимые трансплантируемые клетки.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ КЛОНИРОВАНИЕ

Для клеточной терапии желательно использовать пациент-специфические клетки. В идеа-

ле это должны быть клетки самого пациента, тогда можно не опасаться иммунологического отторжения. И, конечно же, хотелось бы иметь собственные плюрипотентные клетки для каждого пациента, чтобы была возможность получения максимального спектра дифференцированных клеток. Долгое время считалось, что клетки обладают плюрипотентностью только в раннем эмбриональном развитии и восстановление плюрипотентности невозможно. Однако Джон Гёрдон показал, что это не так. Если энуклеировать ооцит лягушки и подсадить ядро дифференцированной клетки, можно получить взрослое животное (Gurdon, 1962). Это означает, что процесс развития можно обратить назад, вызвав дедифференцировку. Метод переноса ядра дифференцированной клетки в цитоплазму энуклеированного ооцита чаще всего не совсем корректно называют «клонированием». Впервые метод клонирования был успешно применен на млекопитающих в 1997 г., когда была получена овца Долли (Wilmut *et al.*, 1997). Затем были клонированы многие виды млекопитающих. Эффективность клонирования в большинстве случаев менее 1 %, а большинство клонированных животных имеют различные проблемы в развитии.

Помимо возможности создания «копий» животных клонирование потенциально открывает еще одно перспективное направле-

ние. Клонирование человека недопустимо по этическим причинам, в том числе и из-за ожидаемых нарушений в функционировании генома. Однако можно довести развитие полученного клона лишь до стадии бластоцисты и выделить плюрипотентные ЭС клетки. Получение ЭС клеток путем клонирования было названо терапевтическим клонированием (рис. 2). В теории терапевтическое клонирование позволяет решить проблему получения пациент-специфических клеток. Однако для этого метода также есть ограничения. Впервые ЭС клетки человека удалось получить путем клонирования в 2013 г. (Tachibana *et al.*, 2013). Несмотря на достаточно высокую эффективность клонирования, для получения ЭС клеток нужны ооциты высокого качества, а значит, для получения даже одной линии ЭС клеток необходимо использовать много ооцитов. А это, в свою очередь, вызывает морально-этические проблемы. Кроме того, при клонировании ЭС клетки будут иметь митохондрии донора ооцитов. Это может быть плюсом для лечения заболеваний, связанных с мутациями митохондриального генома, но, возможно, другой гаплотип митохондриальной ДНК будет вызывать иммунный ответ. Недавние исследования позволили обойти необходимость использования ооцитов донора для индукции плюрипотентности.

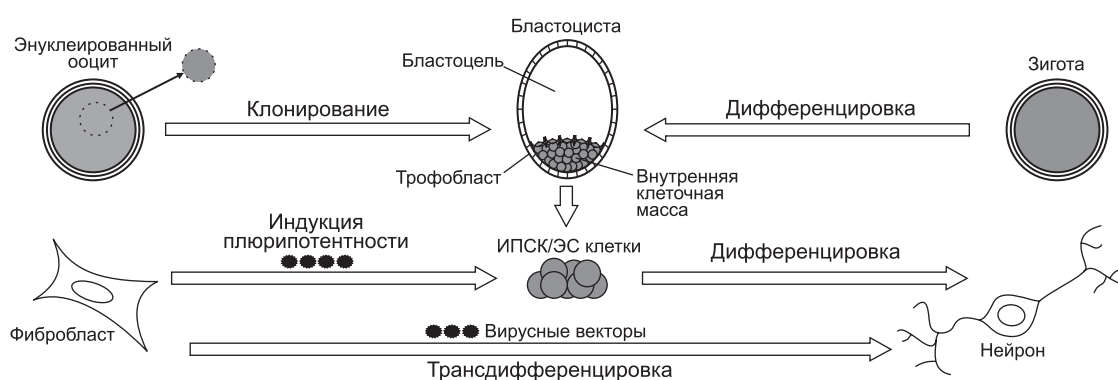


Рис. 2. Методы изменения судьбы клетки для клеточной терапии.

Получение плюрипотентных клеток с последующей дифференцировкой и трансдифференцировка позволяют получить нейроны из фибробластов.

Fig. 2. Methods of cell fate change for cell therapy.

Transdifferentiation and derivation of pluripotent cells with subsequent differentiation allow neuron production from fibroblasts.

ПОЛУЧЕНИЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Эксперименты по клонированию показали возможность дедифференцировки специализированных клеток. Считается, что цитоплазма ооцита содержит некие репрограммирующие факторы, которые могут изменить функционирование генома дифференцированной клетки и вернуть в плюрипотентное состояние. По-видимому, это какие-то транскрипционные факторы, необходимые для осуществления программы развития. На сегодняшний день не известно, какие факторы ооцита обладают репрограммирующей активностью и сколько их. Можно предположить, что это сложная многокомпонентная система.

Возможность репрограммирования генома дифференцированной клетки при клонировании заинтересовала японского исследователя Синъя Яманака. Он применил следующий методический подход: прямой перебор репрограммирующих факторов. Были проанализированы транскрипционные факторы, для которых известна экспрессия в ЭС клетках. Из них были выбраны 24 транскрипционных фактора и созданы ретровирусные векторы, несущие гены этих транскрипционных факторов. Эмбриональные фибробласты мыши *in vitro* были заражены ретровирусами и лишь незначительное число клеток дали начало росту колоний с морфологией ЭС клеток. Было показано, что эти клетки плюрипотентны. Затем исследователи убрали из коктейля репрограммирующих факторов по одному и установили, что для изменения клеточной судьбы необходимо лишь 4 транскрипционных фактора: Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc (Takahashi, Yamanaka, 2006). Полученные клетки по своим свойствам практически полностью соответствовали ЭС клеткам и были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК) (рис. 2). Уже через год после первой публикации были получены ИПСК человека (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). В дальнейшем была показана возможность изменения судьбы не только эмбриональных, но и полученных из кожи фибробластов взрослого человека, а также других типов клеток. В 2012 г. Джон Гёрдон и

Синъя Яманака получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за открытие возможности репрограммирования дифференцированных клеток в плюрипотентные.

Таким образом, в настоящее время есть возможность получения пациент-специфических плюрипотентных клеток из, например, клеток кожи. ИПСК практически не отличаются по своим свойствам от ЭС клеток, и в то же время их получение не связано с этическими запретами. Как и ЭС клетки, ИПСК можно дифференцировать во многие типы клеток, в том числе нейроны. Казалось бы, технология создания пациент-специфических плюрипотентных клеток позволит уже завтра использовать клеточную терапию, однако нерешенные проблемы еще остались.

Дифференцировка плюрипотентных клеток *in vitro* – крайне неэффективный процесс. Лишь незначительный процент дифференцированных клеток будет соответствовать ожидаемому клеточному типу. Дифференцировка *in vitro* имитирует нормальный процесс дифференцировки *in vivo*, знания о котором ограничены. При дифференцировке *in vitro* в среду для культивирования добавляют различные ростовые факторы. Для правильной дифференцировки необходимы также сигналы окружающих клеток, которые, в свою очередь, зависят от взаимодействия многих типов клеток, а в большинстве случаев *in vitro* не удастся моделировать клеточное окружение. Таким образом, даже получив нужную популяцию клеток, мы не можем быть полностью уверены в том, что дифференцировка прошла правильно. Это можно проверить при сравнении профилей экспрессии генов в норме и в полученном в результате дифференцировки типе клеток с последующей оценкой функциональности полученных клеток. Функциональность нейральных клеток проверяется на модельных животных, а не на человеке, что не гарантирует корректное функционирование их в организме человека.

Еще одна проблема – потенциальная онкогенность плюрипотентных клеток. Если плюрипотентные клетки ввести в организм без предварительной дифференцировки, они формируют доброкачественную опухоль, тератому, пытаясь обеспечить эмбриональное развитие, несмотря на отсутствие необходимых сигналов. Неполностью дифференцированные производные

плюрипотентных клеток также потенциально опасны, поэтому необходимо очень тщательно отделять клетки, прошедшие дифференцировку от сохранивших потенциал к развитию. Один из подходов, позволяющих обойти проблему онкогенности, представлен ниже.

ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА: ПОЛУЧЕНИЕ НЕЙРОНОВ ИЗ ДРУГИХ ТИПОВ КЛЕТОК

После того как были получены ИПСК, стало ясно, что для изменения судьбы клетки достаточно лишь нескольких транскрипционных факторов. Дальнейшее развитие технологии позволило получить ИПСК без интеграции трансгенов доставкой репрограммирующих факторов с помощью модифицированной РНК, безынтеграционными вирусами или, в недавней работе, с использованием для репрограммирования только набора химических веществ (Hou *et al.*, 2013). Таким образом, проблема инсерционного мутагенеза практически решена, однако индуцирование плюрипотентности увеличивает и онкогенный потенциал клеток. Возможно ли обойтись без шага индуцированной плюрипотентности и сразу получить желаемый тип клеток? Многие исследователи сосредоточили свое внимание на получении нейронов с использованием фибробластов в качестве исходного материала для трансдифференцировки. Выбор фибробластов как для дедифференцировки, так и для трансдифференцировки не случаен. Фибробласты – относительно гомогенная популяция клеток, их можно легко получить из взрослого организма при культивировании небольшого участка кожи и *in vitro*. Для получения нейронов был использован тот же методический подход, что и для ИПСК. Были отобраны 19 транскрипционных факторов, экспрессия которых выявлена в нейронах, сделаны лентивирусные векторы, несущие гены транскрипционных факторов, и проведено заражение фибробластов модельного животного – мыши. Получив клетки, имеющие маркеры нейронов, исследователи постепенно установили минимальный необходимый набор репрограммирующих факторов – Ascl1, Brn2 и Myt1l (Vierbuchen *et al.*, 2010). Полученные нейроны обладали способностью формировать

синапсы. Эффективность получения нейронов достигала 19,5 %. Нужно отметить, что в этих экспериментах была получена смесь нейронов нескольких типов, т. е. для использования в клеточной терапии такие нейроны не пригодны. В дальнейшем аналогичным методом были получены нейроны из фибробластов человека, в том числе моторные нейроны и дофаминергические (табл. 1). Можно отметить использование микроРНК для репрограммирования, а также увеличение эффективности репрограммирования с использованием различных химических веществ. Трансдифференцировка имеет несколько проблем. Одна из них – получение мультиклональной культуры клеток с различными характеристиками. При этом экспрессия нейрональных маркеров еще не говорит о функциональности даже *in vitro* и тем более *in vivo*. Кроме того, в большинстве работ эффективность получения нейронов не превышает процентов, что не позволяет получать нейроны в достаточном количестве. Следующая модификация метода решает эту проблему.

ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА: ПОЛУЧЕНИЕ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Итак, получение нейронов из фибробластов ограничено количеством фибробластов. Кроме того, использование функциональных нейронов для клеточной терапии затруднительно – нейроны формируют многочисленные отростки и их уже не удастся пересадить без гибели клеток, так как отростки при этом разрушаются. Получение нейральных стволовых клеток (НСК) может решить эти проблемы. НСК обладают потенциалом как к самообновлению, так и к дифференцировке в основные нейральные типы клеток: нейроны, глию и олигодендроглию. При получении НСК из ЭС клеток или ИПСК остается проблема онкогенности. Для трансдифференцировки дифференцированных клеток в НСК были использованы различные репрограммирующие факторы (табл. 2). Можно отметить возможность получения клеток нервного гребня, источника нейронов периферической нервной системы, а также возможность репрограммирования астроцитов, в том числе *in vivo*. Даже при получении НСК сохраняются

Таблица 1

Получение нейронов из фибробластов и астроцитов человека с помощью трансдифференцировки

Исходный тип клеток	Тип полученных клеток	Репрограммирующие факторы	Литературный источник
Кортикальные астроциты	Глутаматергические нейроны	<i>NeuroD1</i>	Guo <i>et al.</i> , 2014
Эмбриональные фибробласты и фибробласты взрослого	Дофаминергические нейроны	<i>Ascl1, Brn2, Myt1l, Lmx1a, FoxA2</i>	Pfisterer <i>et al.</i> , 2011
Фетальные фибробласты и фибробласты взрослого	Дофаминергические нейроны	<i>Mash1, Nurr1, Lmx1a</i>	Caiazzo <i>et al.</i> , 2011
Астроциты	Дофаминергические нейроны	<i>ASCL1, LMX1B, NURR1</i>	Addis <i>et al.</i> , 2011
Эмбриональные фибробласты	Моторные нейроны	<i>Ascl1, Brn2, Myt1l, Lhx3, Hb9, Isl1, Ngn2, NEUROD1</i>	Son <i>et al.</i> , 2011
Фибробласты взрослого	Нейроны	Экстракт НСК	Lee <i>et al.</i> , 2011
Фибробласты взрослого	Нейроны	<i>MiR-124, BRN2, MYTIL</i>	Ambasudhan <i>et al.</i> , 2011
Фетальные и постнатальные фибробласты	Нейроны	<i>Ascl1, Brn2, Myt1l, NeuroD1</i>	Pang <i>et al.</i> , 2011
Неонатальные фибробласты	Нейроны	<i>miR-9/9, miR-124, NEUROD2, ASCL1, MYTIL</i>	Yoo <i>et al.</i> , 2011
Постнатальные фибробласты и фибробласты взрослого	Нейроны	<i>Ascl1, Ngn2, SB-216763 и CHIR-99021</i>	Ladevig <i>et al.</i> , 2012
Астроциты	Нейроны	<i>Ascl1, Brn2, Myt1l</i>	Torper <i>et al.</i> , 2013
Фибробласты взрослого	Нейроны	<i>ASCL1, MYTIL, SOX2</i>	Wang <i>et al.</i> , 2014
Перициты коры головного мозга	Нейроны	<i>Sox2, Mash1</i>	Karow <i>et al.</i> , 2012
Фетальные фибробласты и фибробласты взрослого	Холинергические нейроны	<i>NGN2, SOX11</i>	Liu <i>et al.</i> , 2013

две проблемы трансдифференцировки. Полуляция клеток НСК мультиклональна, т. е. разные клетки могут обладать различными свойствами. Кроме того, необходимо убедиться в том, что полученные НСК по экспрессии генов и по функциональности соответствуют «нормальным» клеткам. Однако, по-видимому, именно за получением нейральных стволовых клеток – будущее клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний.

КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Несмотря на развитие клеточных технологий, нерешенные проблемы терапии заболеваний нервной системы остаются. Общая проблема

клеточной терапии – отторжение трансплантационного материала иммунной системой. Одно из решений – использование клеток самого пациента после дедифференцировки или трансдифференцировки. Для терапии заболеваний центральной нервной системы можно использовать и гетерологичные клетки, так как мозг является иммунопривилегированным органом. Следующая проблема связана с выбором клеток для трансплантации. *In vitro* можно получить дофаминергические нейроны для лечения болезни Паркинсона, но после трансплантации функциональные нейроны погибнут из-за поломки отростков. Возможное решение – трансплантация клеток-предшественников, которые пройдут последние стадии дифференцировки уже в месте трансплантации. Транс-

Таблица 2

Получение предшественников нейральных клеток человека с помощью трансдифференцировки

Исходный тип клеток	Тип полученных клеток; потенциал к дифференцировке	Репрограммирующие факторы	Литературный источник
Неонатальные меланоциты	Клетки нервного гребня; нейроны, астроциты, олигодендроциты, остеобласты, хондроциты, клетки гладкой мускулатуры	<i>NIC1</i>	Zabierowski <i>et al.</i> , 2011
Постнатальные фибробласты	Клетки нервного гребня; нейроны, глия, меланоциты, мезенхимальные клетки	<i>SOX10</i>	Zhu <i>et al.</i> , 2014
Фетальные фибробласты	Клетки-предшественники нейронов; нейроны	<i>Sox2, c-Myc, BRN2</i> (или <i>Sox2, c-Myc, BRN4</i>)	Zou <i>et al.</i> , 2014
Фетальные фибробласты крайней плоти	НСК; нейроны, астроциты, олигодендроциты	<i>SOX2</i>	Ring <i>et al.</i> , 2012
Кортикальные астроциты	НСК; нейроны, астроциты, олигодендроциты	<i>SOX2</i> или <i>OCT4</i> или <i>NANOG</i>	Corti <i>et al.</i> , 2012
Фибробласты взрослого	НСК; нейроны, астроциты, олигодендроциты	<i>OCT4</i>	Mitchell <i>et al.</i> , 2014

плантация нейральных клеток в мозг имеет и другие подводные камни. Не совсем понятно, сколько введенных клеток выживет после переноса. Кроме того, они трансплантируются в систему, в которой связи между клетками уже сформированы. Смогут ли введенные нейроны сформировать новые связи с окружением и корректно функционировать в этой системе? Кроме того, остается проблема возможной онкогенности вводимых клеток.

Таким образом, в настоящее время клеточная терапия все ближе продвигается к практическому применению. Современные клеточные технологии позволяют получать многие типы клеток *in vitro*. Эксперименты на модельных животных показывают принципиальную возможность использования клеточной терапии для лечения некоторых заболеваний. Однако для широкого применения новых технологий в медицине необходимо решить этические и методические проблемы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке проекта РНФ «Клеточные и молекулярные механизмы патогенеза хромосомных болезней» № 14-15-00772.

ЛИТЕРАТУРА

- Addis R.C., Hsu F.C., Wright R.L. *et al.* Efficient conversion of astrocytes to functional midbrain dopaminergic neurons using a single polycistronic vector // PLoS One. 2011. V. 6. No. 12. e28719.
- Ambasudhan R., Talantova M., Coleman R. *et al.* Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions // Cell Stem Cell. 2011. V. 9. No. 2. P. 113–118.
- Caiazzo M., Dell'Anno M.T., Dvoretzskova E. *et al.* Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts // Nature. 2011. V. 476. No. 7359. P. 224–227.
- Corti S., Nizzardo M., Simone C. Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons // Exp. Cell Res. 2012. V. 318. No. 13. P. 1528–1541.
- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos // Nature. 1981. V. 292. P. 154–156.
- Guo Z., Zhang L., Wu Z. *et al.* *In vivo* direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model // Cell Stem Cell. 2014. V. 14. No. 2. P. 188–202.
- Gurdon J.B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles // J. Embryol. Exp. Morphol. 1962. V. 10. P. 622–640.
- Hou P., Li Y., Zhang X. *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds // Science. 2013. V. 341. No. 6146. P. 651–654.
- Karow M., Sanchez R., Schichor C. *et al.* Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells // Cell Stem Cell. 2012. V. 11. No. 4.

- P. 471–476.
- Ladewig J., Mertens J., Kesavan J. *et al.* Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts // *Nat. Methods*. 2012. V. 9. No. 6. P. 575–578.
- Lee S.T., Chu K., Jung K.H. *et al.* Direct generation of neurosphere-like cells from human dermal fibroblasts // *PLoS One*. 2011. V. 6. No. 7. e21801.
- Liu M.L., Zang T., Zou Y. *et al.* Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. 2183.
- Mitchell R.R., Szabo E., Benoit Y.D. *et al.* Activation of neural cell fate programs toward direct conversion of adult human fibroblasts into tri-potent neural progenitors using OCT-4 // *Stem Cells Dev.* 2014. V. 23. No. 16. P. 1937–1946.
- Orkin S.H., Zon L.I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology // *Cell*. 2008. V. 132. No. 4. P. 631–644.
- Pang Z.P., Yang N., Vierbuchen T. *et al.* Induction of human neuronal cells by defined transcription factors // *Nature*. 2011. V. 476. No. 7359. P. 220–223.
- Pfisterer U., Kirkeby A., Torper O. *et al.* Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. No. 25. P. 10343–10348.
- Ring K.L., Tong L.M., Balestra M.E. *et al.* Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor // *Cell Stem Cell*. 2012. V. 11. No. 1. P. 100–109.
- Son E.Y., Ichida J.K., Wainger B.J. *et al.* Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons // *Cell Stem Cell*. 2011. V. 9. No. 3. P. 205–218.
- Tachibana M., Amato P., Sparman M. *et al.* Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer // *Cell*. 2013. V. 153. No. 6. P. 1228–1238.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell*. 2007. V. 131. No. 5. P. 861–872.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. V. 126. P. 663–676.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science*. 1998. V. 282. No. 5391. P. 1145–1147.
- Torper O., Pfisterer U., Wolf D.A. *et al.* Generation of induced neurons via direct conversion *in vivo* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. No. 17. P. 7038–7043.
- Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P. *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors // *Nature*. 2010. V. 463. No. 7284. P. 1035–1041.
- Vierbuchen T., Wernig M. Direct lineage conversions: unnatural but useful? // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. No. 10. P. 892–907.
- Wang P., Zhang H.L., Li W. *et al.* Generation of patient-specific induced neuronal cells using a direct reprogramming strategy // *Stem Cells Dev.* 2014. V. 23. No. 1. P. 16–23.
- Wilmot I., Schnieke A.E., McWhir J. *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // *Nature*. 1997. V. 385. P. 810–813.
- Wobus A.M., Boheler K.R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy // *Physiol. Rev.* 2005. V. 85. No. 2. P. 635–678.
- Yoo A.S., Sun A.X., Li L. *et al.* MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons // *Nature*. 2011. V. 476. No. 7359. P. 228–231.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells // *Science*. 2007. V. 318. No. 5858. P. 1917–1920.
- Zabierowski S.E., Baubet V., Himes B. *et al.* Direct reprogramming of melanocytes to neural crest stem-like cells by one defined factor // *Stem Cells*. 2011. V. 29. No. 11. P. 1752–1762.
- Zhu S., Ambasudhan R., Sun W. *et al.* Small molecules enable OCT4-mediated direct reprogramming into expandable human neural stem cells // *Cell Res.* 2014. V. 24. No. 1. P. 126–129.
- Zou Q., Yan Q., Zhong J. *et al.* Direct conversion of human fibroblasts into neuronal restricted progenitors // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. No. 8. P. 5250–5260.

DERIVATION OF NEURONS FOR CELL THERAPY

A.G. Menzorov

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia;
Institute of Medical Genetics SB RAMS, Tomsk, Russia;
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia,
e-mail: menzorov@bionet.nsc.ru

Summary

Life expectancy drastically increased lately. It caused an increase in the morbidity of age-associated neurodegenerative diseases. One of the promising treatments is cell therapy. Patient-specific cells are preferable for cell therapy to avoid immune response. This mini review is dedicated to contemporary knowledge of cell fate modification focusing on the derivation of neural cells by transdifferentiation. One of the approaches for neural cell derivation is the differentiation of embryonic stem cells into neurons. There are at least two problems: such neurons will be heterologous, and remaining pluripotent cells can lead to tumor formation. Therapeutic cloning allows derivation of autologous embryonic stem cells with subsequent neuronal differentiation, but it is ethically questionable. Induced pluripotent stem cells allow producing patient-specific neurons but the tumorigenicity remains. Transdifferentiation is a new technology of cell fate reprogramming that makes possible derivation of patient-specific neurons without the intermediate pluripotency stage. The completeness of reprogramming and functionality of such neurons remain doubtful. In addition, functional neurons may fail to survive transplantation and the number of neurons is limited. Currently, the best strategy for cell generation is to use neural stem cells. The sources of patient-specific neural stem cells can be induced pluripotent stem cells and transdifferentiation of fibroblasts or astrocytes. Contemporary data on transdifferentiation of different human cell types into neural precursors are presented in this mini review. In general, patient-specific neural stem cells are a candidate source of cell material for neurodegenerative disease treatment in the future.

Key words: embryonic stem cells, cloning, pluripotency, reprogramming, transdifferentiation, neurons.