

УДК 611.018.82:577.21

С.Ю. Масловский, К.Н. Золотько, В.А. Панасенко, Н.И. Клочко, О. А. Трач
Харьковский национальный медицинский университет

ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ, ВЫЯВЛЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ИНДУЦИРОВАННЫХ НЕЙРОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Обобщены последние открытия в области исследования клеточной пластичности и рассмотрены пути получения различных подтипов индуцированных нейрональных клеток. Выявлено пять наиболее важных факторов транскрипции для получения индуцированных нейрональных клеток из мышечных и человеческих фибробластов. Показано, что пул ВМ, включающий *Bmi2*, *Ascl1* и *Myt1L* транскрипционные факторы, имеет важное значение для индукции нервных клеток, обладающих как молекулярными, так и основными функциональными свойствами нейронов. Добавления подтип-специфических транскрипционных факторов в перепрограммирующую смесь может направить фибробласты к дифференциации в желаемые подтипы клеток нервной ткани.

Ключевые слова: индуцированные нейрональные клетки, транскрипционные факторы, трансдифференцировка.

Стволовые клетки (СК) являются самыми ранними типами клеток в последовательной цепи процессов, обеспечивающих образование и поддержание большинства клеточных линий взрослого человека. Эти процессы включают пролиферацию клеток, их миграцию, дифференцировку, созревание и апоптоз. Будучи предшественниками всех тканей организма, СК способны существовать *in vivo* в недифференцированном состоянии и самообновляться.

Эмбриональные СК (ЭСК) – это клетки внутренней массы бластоцисты, которые способны дифференцироваться во все виды клеток взрослого организма, развивающихся из трех зародышевых листков: экто- мезо- и энтодермы.

Способность СК дифференцироваться в любые виды клеток организма, кроме клеток внешних эмбриональных тканей, называется плюрипотентностью. Мультипотентность допускает дифференцировку в различные клетки в пределах только одного вида ткани.

Региональными СК являются мультипотентные клетки взрослого организма, способные к дифференцировке в зрелые клетки «своего» органа и к трансдифференцировке. Более дифференцированные клетки называются прогениторными, или транзиторными. Они активно пролиферируют, имеют некоторые

специфические маркеры зрелых клеток, однако уже не способны к самообновлению [1].

Региональные СК различных органов и тканей могут быть получены из эмбриональных в лабораторных условиях. В 2006 г. Синья Яманака впервые получил индуцированные плюрипотентные СК (иПСК) из мышечных фибробластов методом вирусной трансфекции генов: *oct 3/4*, *sox2*, *klf-4* и *c-myc*. По своим свойствам иПСК в значительной степени соответствовали ЭСК.

Индукцированные СК (иСК) – это клетки, полученные из каких-либо иных клеток путем эпигенетического перепрограммирования.

В настоящее время существует три пути перепрограммирования соматических клеток в плюрипотентные СК [2]:

- пересадка ядер, взятых из соматических клеток, в оплодотворенную яйцеклетку, из которой предварительно удалено ядро [3, 4];
- слияние соматических клеток с плюрипотентными СК [5];
- модификация соматической клетки, индуцирующая её превращение в стволовую с помощью генетического материала, кодирующего белковые репрограммирующие факторы [6–8], рекомбинантные белки [9, 10]; микроРНК [11–13]; синтетические самореплицирующиеся полицистронные РНК [14] и низкомолекулярные биологически активные веще-

© С.Ю. Масловский, К.Н. Золотько, В.А. Панасенко и др., 2014

ства [15–17]. Довольно перспективным является получение iPСК методом невирусной трансфекции самовоспроизводящейся полицистронной синтетической РНК (VEE-RF RNA), кодирующей четыре фактора транскрипции: KLF4, OCT4, SOX2 и c-MYC или GLIS1 [14].

Стволовые клетки нервной системы

В 60-х гг. прошлого столетия было установлено наличие делящихся клеток в гиппокампе зрелых крыс. Позже было доказано, что новые нейроны образуются не только в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа взрослого человека, но также и в субвентрикулярной зоне боковых желудочков. Основным источником СК ЦНС взрослых являются клетки эпендимы боковых желудочков [1].

Дальнейшие исследования, проведенные на взрослых млекопитающих, показали, что после экспозиции со специфическими факторами роста мультипотентные СК, способные к образованию глиальных клеток и нейронов, могут быть выделены из различных регионов ЦНС: коры мозга и обонятельного эпителия человека, спинного мозга крысы, полосатого тела головного мозга грызунов. Изучение прогениторных клеток из регионов мозга, находившихся в покое, позволило заключить, что нейрогенез в мозгу взрослых млекопитающих лимитируется не отсутствием клеток-предшественников, а, скорее, недостатком факторов, которые регулируют дифференцировку, и/или отсутствием возможности миграции клеток в ткани мозга. В связи с этим, несмотря на наличие СК в ткани головного мозга, возможность самостоятельной регенерации ЦНС крайне мала [1, 18]. Из-за крайне низкой способности к регенерации собственных прогениторных клеток возникает необходимость в получении таковых из других, более доступных источников, чем органы нервной системы, с последующим их введением в очаги поражения ЦНС.

Отечественными учеными была показана возможность дифференцировки *in vitro* клеток стромы костного мозга мыши в клетки нервной ткани под действием ретиноевой кислоты и фактора, подавляющего лейкемию (LIF) [19]. Была изучена эффективность трансплантации индуцированных нейрональных клеток (иНК) пациентам с болезнью Паркинсона и получены положительные резуль-

таты. Было выявлено, что использование клеток, индуцированных в нейрональном направлении из региональных СК стромы костного мозга, не приводило к реактивной гиперплазии глиии вокруг зон введения, что имело место при использовании эмбриональных нервных клеток [20].

Необходимо отметить, что, несмотря на уже достигнутые результаты, получение клеток костного мозга – сложная и болезненная процедура. Альтернативой может стать получение индуцированных нейронов из фибробластов или других дифференцированных клеток.

Рядом исследователей доказано, что эпигенетическое состояние предельно дифференцированных клеток не является статическим и может быть возвращено к менее дифференцированному состоянию [2, 4, 21]. Недавно были обнаружены пути прямого превращения фибробластов в иНК, что свидетельствует о возможности прямых межлинейных превращений между весьма отдаленными клеточными типами [22].

Превращение мышечных фибробластов в нейроны

В связи с тем, что факторы транскрипции играют определяющую роль в судьбе клетки, была выдвинута гипотеза, что усиленная экспрессия комбинации таких факторов может быть достаточной для прямого превращения мышечных фибробластов в нейрональные клетки [23].

При систематическом оценивании результатов воздействия различных комбинаций из 19 генов-кандидатов обнаружено пять транскрипционных факторов: *Ascl1*, *Bmi2*, *Olig2*, *Zic1*, *Myt1l*, которые являются наиболее важными генами для получения нейрональных клеток из фибробластов. Кроме того, оказалось, что пул ВМ, включающий *Bmi2*, *Ascl1* и *Myt1l*, необходим для индуцирования нейрональных клеток, которые содержат как молекулярные, так и главные, функциональные свойства нейронов. Введение ВМ-факторов методом ретровирусной трансфекции способствовало эффективному превращению эмбриональных фибробластов (20 % за 2 недели) в иНК. То есть превращение фибробластов в нейрональном направлении происходит значительно быстрее и более эффективно, чем формирование iPСК [24]. Могут ли быть разработаны методы, позволяющие создавать челове-

ческие иНК для трансплантации? Некоторые исследования позволяют приблизиться к ответу на этот вопрос.

иНК из человеческих фибробластов

При ретровирусной трансфекции ВМ-факторов в геном клетки человеческих фетальных фибробластов полученные нейрональные клетки оставались незрелыми и не могли генерировать потенциалы действия при деполяризации [25, 26]. Эта находка была подтверждена группой ученых, но была также отмечена пониженная выживаемость клеток [12]. Исследование 20 добавочных факторов в комбинации с ВМ показало, что при дополнительном воздействии фактора NeuroD1 из группы bHLH можно достигнуть появления функциональных нейрональных клеток. Полученные человеческие иНК экспрессируют множество нейрональных маркеров, включая Tuj1, MAP2, NeuN, нейрофиламенты и синапсин, а также проявляют такие свойства, как появление характерных потенциалов действия. Более того, при культивировании с кортикальными нейронами могут быть определены токи, как спонтанные, так и вызванные постсинаптические, что свидетельствует о созревании синапсов. Однако первые функционирующие синапсы были обнаружены лишь после 5–6 недель, а это значит, что для полного созревания человеческих иНК требуется много времени. Названные факторы (Brn2, Ascl1, Myt 11, NeuroD1) также могут превратить постнатальные фибробласты крайней плотности в синаптически зрелые иНК при том же времени воздействия и с той же эффективностью. После прекращения действия экзогенных транскрипционных факторов иНК сохраняли приобретенную структуру и функцию. Общая эффективность индуцирования человеческих иНК при воздействии названных четырех факторов составила 2–4 % [23].

Множество различных комбинаций факторов транскрипции могут индуцировать иНК. Возможно существование нескольких путей получения нейрональных линий.

Подавляющее большинство факторов перепрограммирования, известных сегодня, повышают транскрипцию генов. Однако микроРНК, которая, как известно, действует преимущественно понижая активность гена, оказывается очень мощным фактором перепрограммирования. Две независимые группы ис-

следователей получили человеческие и мышьиные иПСК при добавлении микроРНК при отсутствии каких-либо транскрипционных факторов [11, 27].

A.S. Yoo et al. [28] показали, что внося miR-9/9* и miR-124, человеческие фибробласты могут быть перепрограммированы в нейроноподобные клетки, экспрессирующие паннейральный маркер MAP2. Несмотря на то, что были достигнуты значительные фенотипические изменения, одних только микроРНК оказалось недостаточно для индуцирования функциональных иНК. Между тем, добавление транскрипционных факторов NEUROD2, ASCL1 и MYT1L значительно увеличивает конверсионную эффективность и ведет к формированию иНК из фетальных и взрослых человеческих фибробластов со всеми основными функциональными свойствами нейронов, включая формирование синапсов. В процессе индукции иНК факторами NeuroD1, Ascl1, Myt11 и Brn2 микроРНК может заменить транскрипционный фактор Brn2 [25], хотя эта идея еще не была проверена на практике. Возможно, микроРНК действует и через другой механизм. Позже группа ученых [29] обнаружила преимущества miR-124 в формировании человеческих иНК. МикроРНК использовалась ими совместно с BRN2 и MYT1L, что способствовало пониманию функции микроРНК как дополнительной к BRN2. Удивительно, что результаты получены без использования транскрипционных факторов bHLH, однако появившиеся клетки были перепрограммированы в меньшей степени [29].

На сегодняшний день эффективность трансфекции РНК в нейросферы путем электропорации и липофекции составляет 40–50 и 60–70 % соответственно [30]. Использование синтетической иРНК в качестве альтернативного вектора для доставки генов – более эффективный метод индуцирования экспрессии генов без генетической модификации, он может оказаться альтернативой вирусным методам введения для получения индуцированных плюрипотентных или нейрональных клеток.

Индукция специфических подтипов человеческих и мышьиных иНК

Для клинического и экспериментального использования иНК необходимо сначала разработать пути получения нейронов с нейротрансмиттерными и регион-специфическими

признаками. иНК, полученные из клеток печени или фибробластов теми же перепрограммирующими факторами, имели свойства, характерные для возбуждающих нейронов. Этот факт сам по себе не означает получения регион-специфического фенотипа, а лишь свидетельствует о глутаматэргическом направлении дифференцировки «по умолчанию», что также видно при дифференцировке ЭСК [31, 32]. Добавление подтип-специфических транскрипционных факторов в перепрограммирующую «смесь» может направить клетки в сторону дифференцировки в другие желаемые подтипы. Например, Hb9-позитивные клетки, идентичные мотонейронам, могут быть получены из фибробластов при воздействии Lhx3, Hb9, Isl1, Ngn2 и VAM-факторов с эффективностью до 10%. Индуцированные мотонейронные клетки (иМНК), кроме проявления электрофизиологических свойств, подобных таковым у мотонейронов, устанавливают функциональные синаптические связи с мышечными трубочками. При трансплантации в развивающийся куриный спинной мозг большая часть иМНК была внедрена в передний рог мозга. При этом аксоны простирались к передним корешкам. К тому же клетки вели себя в условиях болезни (амиотрофического бокового склероза) подобно мотонейронам, полученным из ЭСК [33]. Другим клинически значимым нейрональным подтипом, который был интенсивно исследован, является группа среднемозговых дофаминергических нейронов. Их поражение имеет место при болезни Паркинсона. В двух контрольно-проверочных экспериментах было описано образование иНК, экспрессирующих тирозиновую гидроксилазу (ТГ) – фермент, ограничивающий степень биосинтеза катехоламинов [34, 35]. Lmx1a и Foxa2 совместно с VAM-пулом могут генерировать иНК, экспрессирующие ТГ, декарбоксилазу ароматических L-аминокислот (AADC) и другие важнейшие ферменты для биосинтеза катехоламинов, а также маркер среднего мозга Nurr1. Однако клетки не экспрессировали другие маркеры среднего мозга и не были способны выделять дофамин в среду.

М. Caiazzo et al. [35] показали, что мышечные иНК с дофаминергическими свойствами образуются при экспрессии транскрипционных факторов Ascl1, Nurr1 и Lmx1a. ТГ-позитив-

ные клетки коэкспрессировали везикулярный моноамидный транспортер 2 (VMAT2), дофаминовый транспортер (DAT), альдегидную дегидрогеназу 1a1 (ALDH1A1) и кальбиндин. Полученные клетки были способны выделять дофамин, что было установлено методом амперометрии и жидкостной хроматографии высокого разрешения. Интересно, что подобные результаты могут быть получены и на человеческих фибробластах при использовании тех же перепрограммирующих факторов. Однако в этом случае клетки не выделяли ни одного регионального маркера, специфичного для среднего мозга, и имели незрелую морфологию [35].

Более того, не была исследована способность клеток получать импульсы через синапсы. Отсутствие среднемозговых характеристик является препятствием на пути клинического применения, так как только «аутентичные» человеческие среднемозговые нейроны способны восстановить функцию, что видно на моделях болезни Паркинсона [39–41]. Поэтому была предпринята попытка сгенерировать иНК, которые бы более походили на среднемозговые дофаминовые нейроны [38]. При комбинированном воздействии шести факторов (Ascl1, Pitx3, Nurr1, Lmx1a, Foxa2 и En1) в присутствии моделирующих факторов Shh и FGF8 наблюдалась экспрессия общих маркеров дофаминовых нейронов TH, DAT, AADC и VMAT2. В среду также выделялся дофамин. Однако при тестировании *in vivo* клетки только частично сохраняли дофаминовую функцию. При анализе серии среднемозговых маркеров иНК не достигали таких же транскрипционных уровней, как эмбриональные или взрослые среднемозговые дофаминергические нейроны. Таким образом, даже шести транскрипционных факторов может быть недостаточно для полного перепрограммирования фибробластов в этот специфический нейрональный подтип.

Прямое генерирование полностью дифференцированных нейронов может быть полезным в моделировании болезней и трансплантационных исследованиях. Однако явным ограничением выделения постмитотических иНК является их неспособность к делению после перепрограммирования. Большое количество клеток необходимо для клеточно-замещающей терапии в клинических условиях

или при исследовании лекарств. Таким образом, необходимо индуцировать размножающиеся нейрональные СК (НСК) непосредственно из фибробластов.

НСК являются трипотентными региональными СК нервной системы, которые способны дифференцироваться в нейроны, астроциты и олигодендроциты.

J. Kim et al. [42] успешно превратили мышинные фибробласты в индуцированные НСК (иНСК). Ими были использованы те же перепрограммирующие факторы, что и при получении иПСК, которые, однако, действовали короткое время. Клетки помещали в среду, способствующую росту нейрональных прогениторных клеток. После установления необходимого времени и культуральных условий стали появляться колонии, напоминающие нейрональные розетковые клетки, экспрессирующие несколько релевантных маркеров. При спонтанной дифференцировке иНСК могут давать рост множеству нейрональных подтипов и астроцитарных клеток, то есть иНСК проявили себя как минимум потенциальными нейрональными клетками-предшественниками, однако клетки с характеристиками олигодендроцитов не были обнаружены [37, 43]. Несмотря на некоторую привлекательность, этот метод показал низкую эффективность в формировании розеткообразующих колоний.

Недавно был разработан метод получения индуцированных нейрональных прогени-

торных клеток из мышинных эмбриональных фибробластов при использовании химического коктейля VCR (V, VPA, ингибитор гистондеацетилаз; C, CHIR9021, ингибитор киназы синтазы гликогена-3 (GSK-3) и R, Repsox, ингибитор TGF- β) в условиях физиологической гипоксии. Такие химически индуцированные нейрональные прогениторные клетки (НПК) имеют сходство с НПК из мозга мышей относительно их способности к пролиферации и самообновлению, характеристик экспрессии генов и мультипотентности относительно различных нейроэктодермальных линий *in vitro* и *in vivo*. Дальнейшие эксперименты показали, что и другие составы, включающие ингибиторы гистондеацетилаз, ингибиторы GSK и TGF- β , проявляют подобные эффекты индукции НПК. Более того, химически индуцированные НПК могут быть также получены из фибробластов кончика хвоста мыши и из клеток осадка мочи человека тем же самым коктейлем VCR [44].

Использование указанных методов в молекулярной биологии позволит получать НСК в количествах, необходимых для клинического применения. Принципиально важной является перспектива использования методов трансфекции РНК и химических коктейлей типа VCR, так как они позволят отказаться от вирусов в качестве векторов переноса генов, а следовательно, послужат толчком к клиническому применению иНСК.

Перепрограммирующие факторы, используемые для получения различных видов клеток нервной системы из зрелых клеток мышей и человека

Перепрограммирующие факторы	Тип получаемых клеток	Источники
<i>Человеческие фибробласты</i>		
Brn2, Ascl1, Myt1L (NeuroD1, Zic1, Olig2)	Возбуждающий нейрон	[25, 26]
ASCL1, MYT1L, NEUROD2, miR9*, miR124		[28]
BRN2, MYTL1, miR124		[29]
Ascl1, Lmx1a, (Brn2, Myt1L, Foxa2, Nurr1)	Дофаминэргический нейрон	[34, 35]
Brn2, Ascl1, Myt1L, NeuroD1, Lhx3, Hb9, Isl1, Ngn2	Мотонейрон	[33]
<i>Мышинные гепатоциты</i>		
Brn2, Ascl1, Myt1L	Возбуждающий нейрон	[36]
<i>Мышинные фибробласты</i>		
Sox2, Oct4, Klf4, c-Myc	Нейрональные прогениторные клетки	[37]
Brn2, Ascl1, Myt1L	Возбуждающий нейрон	[23]
Ascl1, Nurr1, Lmx1a [Pitx3, Foxa2, En1]	Дофаминэргический нейрон	[35, 38]
Brn2, Ascl1, Myt1L, Lhx3, Hb9, Isl1, Ngn2	Мотонейрон	[33]

Примечание. В скобках указаны альтернативные перепрограммирующие факторы из различных исследований, которые приводят к получению того же нейронального подтипа.

Литература

1. *Петренко А.Ю.* Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения : монография / А.Ю. Петренко, Ю.А. Хунов, Э.Н. Иванов. – Луганск: Пресс-экспресс, 2011. – 365 с.
2. *Yamanaka S.* Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches / S. Yamanaka, H. M. Blau // *Nature*. – 2010. – Vol. 465. – P. 704–712.
3. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer / T. Masahito, A. Paula, S. Michelle [et al.] // *Cell*. – 2013. – Vol. 153 (6). – P. 1228–1238.
4. *Gurdon J.B.* From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation / J.B. Gurdon // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2006. – Vol. 22. – P. 1–22.
5. *Do J.* Erasure of cellular memory by fusion with pluripotent cells / J. Do // *Stem Cells*. – 2007. – Vol. 25. – P. 1013–1020.
6. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors / K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki [et al.] // *Cell*. – 2007. – Vol. 131 (5). – P. 861–872.
7. *Wei Wang.* Rapid and efficient reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells by retinoic acid receptor gamma and liver receptor homolog / Wei Wang, Pentao Liu // *PNAS*. – 2011. – Vol. 108. – P. 18283–18288.
8. *Lapasset L.* Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state / L. Lapasset, L. Jean-Marc // *Genes Dev.* – 2011. – Vol. 25. – P. 2248–2253.
9. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins / Hongyan Zhou, Shili Wu, Jin Young Joo [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2009. – Vol. 4 (5). – P. 381–384.
10. Activation of innate immunity is required for efficient nuclear reprogramming / L. Jieun, S. Nazish, H. Arwen [et al.] // *Cell*. – 2012. – Vol. 151 (3). – P. 547–558.
11. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency / F. Anokye-Danso, C. M. Trinedi, D. Jukr [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2011. – Vol. 8. – P. 376–388.
12. *Norikatsu M.* Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs / M. Norikatsu, M. Masaki // *Cell Stem Cell*. – 2011. – Vol. 8(6). – P. 633–638.
13. MicroRNAs in somatic cell reprogramming / B. Xichen, Z. Xihua, L. Baojian, [et al.] // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2013. – Vol. 25 (2). – P. 208–214.
14. Efficient generation of human iPSCs by a synthetic self-replicative RNA / Y. Naohisa, G. Edwige, Li Hai-Ri [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2013. – Vol. 13(2). – P. 246–254.
15. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds / H. Pingping, Li Yanqin, Z. Xu [et al.] // *Science*. – 2013. – Vol. 341 (6146). – P. 651–654.
16. Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts / L. Julia, M. Jerome, K. Jaideep [et al.] // *Nature Methods*. – 2012. – Vol. 9. – P. 575–578.
17. *Pandian G.* Programmable genetic switches to control transcriptional machinery of pluripotency / G. Pandian, H. Sugiyama // *Biotechnology J.* – 2012. – Vol. 7 (6). – P. 798–809.
18. *Масловский С.Ю.* Концепция о стволовых клетках применительно к некоторым проблемам современной медицины / С.Ю. Масловский, Ю.П. Костеленко // *Актуальные проблемы учения о тканях : матер. научн. конф.* – СПб., 2006. – С. 59–60.
19. Индуцированная дифференцировка клеток стромы костного мозга мыши в нервные клетки / Е.А. Щегельская, Ю.Е. Микульский, А.В. Ревещин [и др.] // *Цитология*. – 2011. – Т. 44, № 7. – С. 637–641.
20. *П'ятикоп В.О.* Нейрохірургічна корекція рухових порушень при паркінсонізмі (експериментальне та клінічне дослідження) : автореф. дис. ... докт. мед. наук : 14.01.05 / В.О. П'ятикоп ; Ін-т нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України. – К., 2009. – 36 с.
21. *Jaenisch R.* Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming / R. Jaenisch, R. Young // *Cell*. – 2008. – Vol. 132. – P. 567–582.
22. *Vierbuchen T.* Direct lineage conversions: unnatural but useful? / T. Vierbuchen, M. Wernig // *Nat. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 892–907.
23. *Vierbuchen T.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors / T. Vierbuchen, A. Ostermeier, Z.P. Pang // *Nature*. – 2010. – Vol. 463. – P. 1035–1041.

24. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells / J. Utikal, J.M. Polo, M. Stadtfeld [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 460. – P. 1145–1148.
25. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors / Z.P. Pang, N. Yang, T. Vierbuchen [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 476. – P. 220–223.
26. Directed conversion of Alzheimer's disease patient skin fibroblasts into functional neurons / L. Qiang, R. Fujita, T. Yamashita [et al.] // *Cell*. – 2011. – Vol. 146. – P. 359–371.
27. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs / N. Miyoshi, H. Ishii, H. Nagano [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2011. – Vol. 8. – P. 633–638.
28. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons / A.S. Yoo, A.X. Sun, L. Li [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 476. – P. 228–231.
29. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions / R. Ambasudhan, M. Talantova, R. Coleman [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2011. – Vol. 9. – P. 113–118.
30. mRNA transfection of mouse and human neural stem cell cultures / S. McLenachan, D. Zhang, A. Palomo [et al.] // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8 (12). – Mode of access: e83596. doi:10.1371/journal.pone.0083596
31. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism / V. Tropepe, S. Hitoshi, C. Sirard [et al.] // *Neuron*. – 2001. – Vol. 30. – P. 65–78.
32. An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells / N. Gaspard, T. Bouschet, R. Hureuz [et al.] // *Nature*. – 2008. – Vol. 455. – P. 351–357.
33. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons / E.Y. Son, J.K. Ichida, B.J. Wainger [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2011. – Vol. 9. – P. 205–218.
34. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons / U. Pfisterer, A. Kirkeby, O. Torper [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2011. – Vol. 108. – P. 10343–10348.
35. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts / M. Caiazzo, M.T. Dell'Anno, E. Dvoretzka [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 476. – P. 224–227.
36. Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons / S. Marro, Z.P. Pang, N. Yang [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2011. – Vol. 9. – P. 374–382.
37. Conversion of mouse fibroblast into cardiomyocytes using direct reprogramming strategy / J.A. Efe, S. Hilcove, J. Kim [et al.] // *Nat. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 13. – P. 215–222.
38. Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts / J. Kim, S.C. Su, H. Wang [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2011. – Vol. 9. – P. 413–419.
39. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease / S. Kriks, J.W. Shim, J. Piao [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 480 (7378). – P. 547–551.
40. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes / N.S. Roy, C. Cleren, S.K. Singh [et al.] // *Nat. Med.* – 2006. – Vol. 12. – P. 1259–1268.
41. Human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in parkinsonian rats / D. Yang, Z.J. Zhang, M. Oldenburg [et al.] // *Stem Cells*. – 2008. – Vol. 26. – P. 55–63.
42. Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors / J. Kim, J.A. Efe, S. Zhu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2011. – Vol. 108. – P. 7838–7843.
43. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors / E. Szabo, S. Rampalli, R.M. Risueno [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 468. – P. 521–526.
44. Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia / C. Lin, H. Wenxiang, Q. Binlong [et al.] // *Cell Research*. – 2014. – Vol. 24. – P. 665–679.

С. Ю. Масловський, К.М. Золотько, В.О. Панасенко, Н.І. Клочко, О.О. Трач
ПЕРСПЕКТИВИ ОТРИМАННЯ, ВИЯВЛЕННЯ ТА ВИКОРИСТАННЯ ІНДУКОВАНИХ НЕЙРОНАЛЬНИХ
КЛІТИН (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Узагальнені останні відкриття, що стосуються клітинної пластичності, і розглянуті шляхи отримання різних підтипів індукованих нейрональних клітин. Виявлено п'ять найбільш важливих факторів транскрипції для отримання індукованих нейрональних клітин з фібробластів мишей та людини. По-

казано, що пул BAM, що включає Brn2, Ascl1 і Myt1L транскрипційні фактори, є важливим для індукції нервових клітин, що володіють як молекулярними, так і основними функціональними властивостями нейронів. Додавання підтип-специфічних транскрипційних факторів у перепрограмуючу суміш може направити фібробласти до диференціації в необхідні підтипи клітин нервової тканини.

Ключові слова: індуковані нейрональні клітини, транскрипційні фактори, трансдиференціювання.

S.Yu. Maslovsky, K.N. Zolotko, V.A. Panasenko, N.I. Klochko, O.A. Trach

THE OUTLOOK FOR MANUFACTURE, DETECTION AND APPLICATION OF INDUCED NEURONAL CELLS (REVIEW)

In this review the newest discoveries in the research of cellular plasticity are summarized and some approaches are proposed to make different subtypes of induced neuronal cells. It was revealed the five most important transcription factors for the obtaining of induced neuronal cells from mice and human fibroblasts. It was appeared that the pool BAM, comprising Brn2, Ascl1, and Myt1L transcription factors, was essential for the induction of neuronal cells that could contain both molecular and main functional properties of neurons. Adding subtype-specific transcription factors in the reprogramming mixture can direct cells differentiation into different desired cell subtypes.

Key words: induced neuronal cells, transcription factors, transdifferentiation.

Поступила 25.09.14