

DOI: 10.31793/1680-1466.2021.27-1.43

# Генерування інсулін- продукуючих клітин зі стовбурових клітин. Перепрограмування соматичних клітин

**М.Д. Тронько,  
В.М. Пушкарьов,  
О.І. Ковзун,  
Л.К. Соколова,  
В.В. Пушкарьов**

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

**Резюме.** Сучасні стратегії створення інсулін-продукуючих клітин (insulin-producing cells, IPCs) в основному базуються на підходах, що імітують нормальний розвиток підшлункової залози (ПЗ). Отримані IPCs повинні експресувати специфічні біологічні маркери нормальних  $\beta$ -клітин, які ідентифікують кінцевий статус диференціації, та реагувати на зміни концентрації глюкози в середовищі.

Основні етапи розвитку ембріональної ПЗ включають розвиток дефінітивної ентодерми, примітивної кишкової трубки, попередника ПЗ, ендокринного попередника та ендокринних клітин, які експресують гормони. Додаючи на кожній стадії різноманітні цитокіни та модулятори сигналіну для активації або пригнічення специфічних шляхів передачі сигналів, які беруть участь у генерації дорослих  $\beta$ -клітин, досягають того, що плюрипотентні стовбурові клітини людини (human pluripotent stem cells, hPSCs) набувають фенотипу  $\beta$ -клітин.

Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (induced pluripotent stem cells, iPSCs) можна перепрограмувати із соматичних клітин пацієнта та диференціювати для застосування в ураженій тканині. Використання цього типу клітин має перевагу тому, що знижує ймовірність імунного відторгнення в реципієнта, а також дозволяє уникнути етичних проблем, пов'язаних із використанням ембріональних плюрипотентних стовбурових клітин (embryonic pluripotent stem cells, EPSCs). Використання iPSCs засноване на властивостях специфічних білків плюрипотентних стовбурових клітин (pluripotent stem cells, PSCs), які при надмірній експресії можуть перепрограмувати соматичні клітини. Це досягається за допомогою факторів транскрипції OCT4, KLF4, SOX2 і c-Myc, які відповідають за збереження плюрипотентності кінцевої клітини.

Генерування iPSCs проводиться методами, заснованими на вірусних та невірусних векторах. Методи з використанням вірусів призводять до високої ефективності інтеграції в геном, але мають обмеження щодо безпеки. Хоча iPSCs можуть бути застосовні в регенеративній медицині, для моделювання захворювань та скринінгу ліків, деякі проблеми, пов'язані з використанням iPSCs (такі як низька ефективність перепрограмування та ризик канцерогенезу), все ще не вирішені.

Також існують перешкоди для терапії стовбуровими клітинами (stem cells, SCs), такі як функціональна незрілість  $\beta$ -клітин, отриманих від SCs, ризик виникнення пухлини та імунне відторгнення трансплантата, які вимагають подальших досліджень.

**Ключові слова:** стовбурові клітини, інсулін-продукуючі клітини, перепрограмування соматичних клітин.

## Огляди

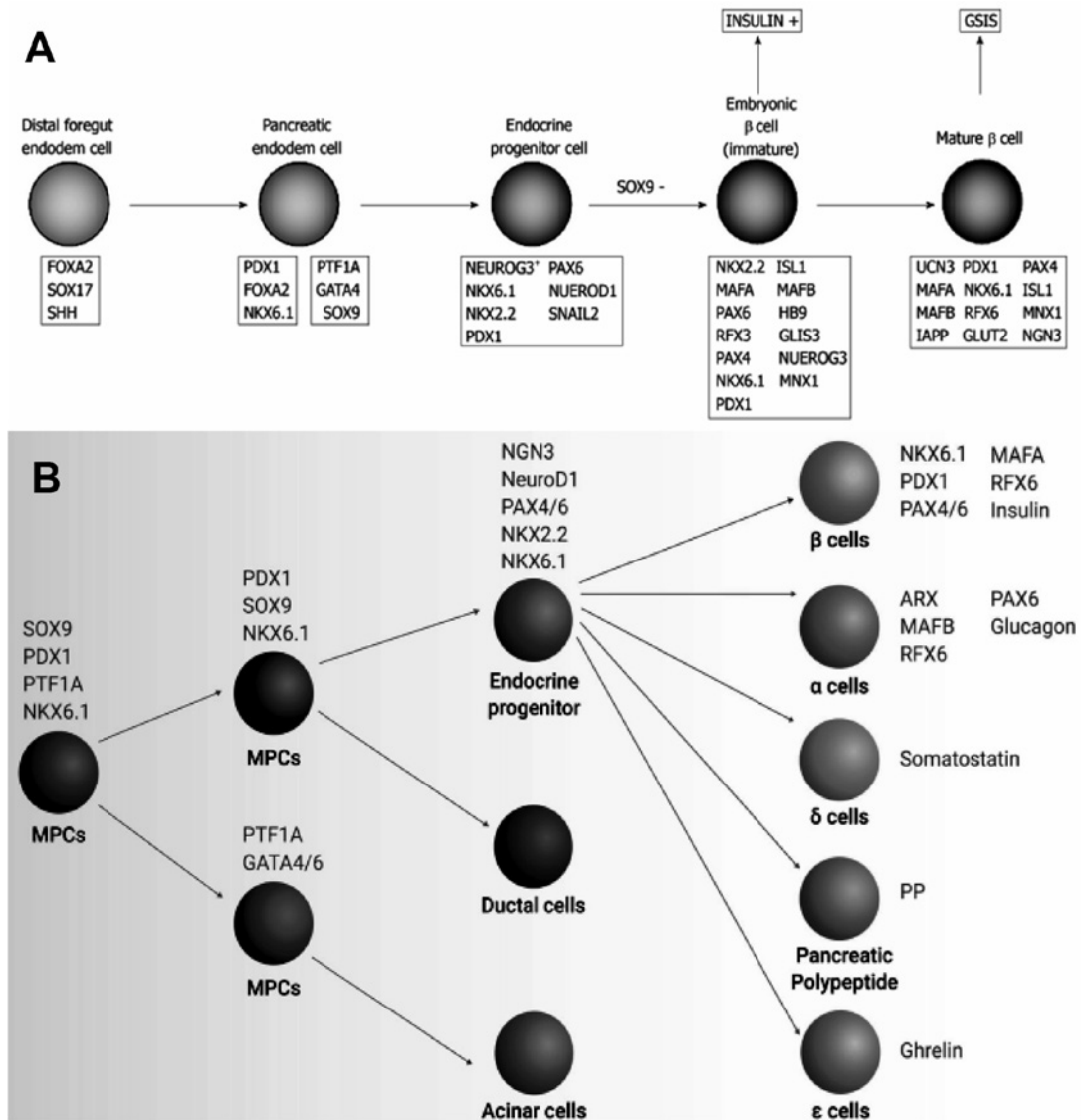
Використання методів регенеративної медицини для лікування цукрового діабету (ЦД) потребує точних знань щодо ембріонального розвитку ПЗ. ПЗ є одночасно органом травлення, який бере участь у засвоєнні нутрієнтів шляхом вироблення травних ферментів, і ендокринним органом, який регулює метаболізм клітин через контроль внутрішньоклітинного транспорту глюкози. Функцію травлення забезпечують ацинарні клітини, які виділяють травні ферменти в протоки ПЗ [1]. Ендокринні клітини ПЗ об'єднані в острівці Лангерганса, які складаються з різних функціональних клітин. Ендокринна ПЗ складається з 5 основних типів секреторних клітин:  $\alpha$ -клітин, які експресують глюкагон;  $\beta$ -клітин, які експресують інсулін;  $\delta$ -клітин, які експресують соматостатин;  $\gamma$ -клітин, які експресують поліпептид ПЗ; і  $\epsilon$ -клітин, які експресують грелін. У дорослих осіб 60% острівцевих клітин складають  $\beta$ -клітини, а 30% —  $\alpha$ -клітини. Різні типи ендокринних клітин в острівцях Лангерганса встановлюють паракринну мережу та взаємодіють з пептидами, які беруть участь у аутокринно-опосередкованій секреції гормонів [2].

Як було встановлено, ембріональний розвиток людини — це 23-стадійний процес. Розвиток ПЗ починається на 9 стадії Карнегі (Carnegie stage 9, CS9) від передньої кишки первісної ентодерми. Специфікація простору ПЗ визначається сигналами, які походять від мезодерми, включаючи трансформуючий фактор росту  $\beta$  (transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ), ретиноеву кислоту (retinoid acid, RA) та фактор росту фібробластів (fibroblast growth factor, FGF) [3]. Фактори росту ПЗ та гомеобокс ПЗ та дванадцятипалої кишки 1 (pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1), також відомий як insulin promoter factor 1) є ключовими для початкового розвитку ПЗ [4].

Перший крок — це інвагінація передньої кишки в спинний і черевний зачатки, які згодом зростаються з утворенням ПЗ. Зачатки ПЗ утворені багат шаровим епітелієм, який стохастично поляризується, утворюючи мікролюмени, що згодом формують протоки ПЗ. Дорсальні та вентральні зачатки ПЗ асоційовані з появою SOX9 (growth factors sex-determining region Y (SRY)-box 9), PDX1 та GATA-зв'язуючого білка 4 (GATA binding protein 4, GATA4), які необхідні для подальшого

росту ПЗ (стадії CS10-13) (рис. 1). Під час стадії CS13 у дорсальному зачатку починають з'являтися мікролюмени, що є першою ознакою мережі екзокринних каналців, які з часом зливаються з кишківником. У мишей та людей проліферація залежить від сигналів із мезенхіми, а також є результатом міжклітинної взаємодії, зокрема через шлях Notch, який активує фактор транскрипції HES1 [4, 5].

Ендокринна диференціація відбувається від мультипотентних або біпотентних попередників з ендокринних протоків і відзначається експресією фактора нейрогенін-3 (Neurogenin-3, NGN3), який контролює різні фактори транскрипції, що визначають ідентичність клітин в острівцях Лангерганса (рис. 1). Експресія NGN3 швидко зростає після ембріонального періоду, із початком появи фетальних  $\alpha$ -клітин, а потім  $\beta$ -клітин, які виробляють інсулін і є переважним типом острівцевих клітин при розвитку людини. Після тимчасового збільшення експресії NGN3 ці прогенітори зупиняють проліферацію і диференціюються в ендокринні клітини. Було помічено, що експресія NGN3 необхідна для спрямування клітин-попередників до ендокринної долі, оскільки NGN3-нульові миші повністю позбавлені ендокринного лінеажу кишківника та ПЗ [8]. Хоча результати досліджень щодо факторів, які контролюють диференціацію різних типів клітин в острівцях ПЗ, не є остаточними, такі фактори, як paired box 4 (PAX4), ядерний фактор гепатоцитів 4 альфа (hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ ), ядерний фактор гепатоцитів 3- $\beta$  (hepatocyte nuclear factor 3- $\beta$ /forkhead box protein A2, HNF3 $\beta$ /FOXA2), Nirenberg and Kim homeobox 6.1 (NKX6.1), motor neuron and pancreas homeobox-1 (MNX-1), V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A (MAFA) та PDX-1 відіграють важливу роль у формуванні, диференціації та функціонуванні  $\beta$ -клітин (рис. 1) [9, 10]. Експресія мРНК PDX-1 обмежена лише ендокринними клітинами ПЗ і зберігається у дорослих  $\beta$ -клітинах. PDX-1 містить три основні сайти ініціації транскрипції, і в  $\beta$ -клітинах кожен із цих сайтів може бути активований зв'язуванням певних факторів транскрипції. Такі тканини, як ПЗ та печінка, не здатні до регенерації, оскільки ендокринних попередників та дорослих SCs ПЗ немає у зрілих тканинах.



**Рис. 1.** Транскрипційні фактори, які беруть участь у розвитку і дозріванні  $\beta$ -клітин *in vivo*.

Примітки: А. Описано важливі етапи розвитку та дозрівання  $\beta$ -клітин *in vivo*, які в основному включають дистальну ентодерму передньої кишки, ентодерму ПЗ, ендокринний прогенітор, незрілі та зрілі  $\beta$ -клітини, а також ключові фактори транскрипції [6].

В. Експресія ключових факторів транскрипції на різних стадіях диференціювання мультипотентних попередників ПЗ (multipotent pancreatic precursors, MPC) у різні лінії клітин ПЗ; експресія NKX6.1 починається на стадії MPC, продовжується в ендокринній лінії і обмежується  $\beta$ -клітинами [7]. Деталі в тексті.

**Fig. 1.** Transcription factors involved in the development and maturation of  $\beta$ -cells *in vivo*.

Notes: A. Important stages of *in vivo*  $\beta$ -cell development and maturation are described, which mainly include distal foregut endoderm, pancreatic endoderm, endocrine progenitor, immature and mature  $\beta$ -cells, and key transcription factors [6].

B. Expression of key transcription factors at different stages of multipotent pancreatic precursors (MPC) differentiation into different pancreatic cell lines. Expression of NKX6.1 begins at the MPC stage, continues in the endocrine line and is limited to  $\beta$ -cells [7]. Details in the text.

Таким чином, регенерація  $\beta$ -клітин залежить головним чином від реплікації  $\beta$ -клітин, яка зменшується зі старінням [4, 11].

Сучасні стратегії створення IPCs в основному базуються на підходах, що імітують нормальний розвиток ПЗ. Отримані IPCs повинні експресувати специфічні біологічні маркери

нормальних  $\beta$ -клітин, які ідентифікують кінцевий статус диференціації, такі як MAFA (базовий фактор транскрипції з лейциновою застібкою, що експресується в зрілих  $\beta$ -клітинах і відсутній у клітинах-попередниках ПЗ та інших типах клітин), NEUROD1 (знаходиться нижче фактора NGN3 в регуляторному

## Огляди

ланцюгу, що експресується в більшості ендокринних клітин ПЗ, включаючи  $\beta$ -клітини), та PDX1/NKX 6.1 (обмежена спільна експресія в  $\beta$ -клітинах), а також основні функціональні особливості дорослих  $\beta$ -клітин, включаючи стимульовану глюкозою секрецію інсуліну (glucose-stimulated insulin secretion, GSIS) та секрецію С-пептиду (рис. 1). Так, було показано, що функціональні SC- $\beta$ -клітини можуть бути згенеровані з iPSCs людини (human iPSCs, hiPSCs), отриманих із фібробластів шкіри пацієнтів із ЦД 1-го типу (ЦД1) *in vitro*. Ці клітини дуже схожі на одержані з ембріональних стовбурових клітин людини (human embryonic stem cells, hESCs) і недиабетичних hiPSC та схожі, але не ідентичні дорослим  $\beta$ -клітинам. ЦД1 SC- $\beta$ -клітини експресують маркери, знайдені в  $\beta$ -клітинах, включаючи NKX6-1 і PDX1, і характеризуються глобальним патерном експресії генів, подібним до дорослих  $\beta$ -клітин. ЦД1 SC- $\beta$ -клітини функціонують *in vitro* та *in vivo*, реагуючи на рівень глюкози, посилюючи секрецію інсуліну людини та контролюючи після трансплантації рівень глюкози в діабетичних мишей. Після хімічно-індукованого стресу ЦД1 SC- $\beta$ -клітини втрачають експресію маркерів  $\beta$ -клітин. Ці клітини також реагують на цитокиновий стрес, якому можна частково запобігти лікуванням Alk5i. Нарешті, ці клітини також реагують на відомі протидіабетичні препарати, які посилюють секрецію інсуліну [12-20].

Зазвичай схеми формування функціональних IPCs з hPSCs були засновані на імітації розвитку *in vivo* ембріональної ПЗ. Основні етапи розвитку ембріональної ПЗ включають розвиток дефінітивної ентодерми (definitive endoderm, DE), примітивної кишкової трубки (primitive gut tube, PGT), попередника ПЗ (pancreatic progenitors, PP), ендокринного попередника (endocrine progenitor, EP) та ендокринних клітин, що експресують гормони. Додаючи на кожній стадії різноманітні цитокини (наприклад, епідермальний фактор росту, bFGF) та модулятори сигналіну (наприклад, кісткові морфогенетичні білки, інгібітори  $\gamma$ -секретази) для активації або пригнічення специфічних шляхів передачі сигналів (Notch, Wnt), які беруть участь у генерації дорослих  $\beta$ -клітин, досягають того, що клітини hPSCs набувають фенотипу  $\beta$ -клітин [16, 21, 22].

Було розроблено більш детальний протокол і створені зрілі та функціональні IPCs із hPSCs, які були порівнювані з  $\beta$ -клітинами людини. Протокол диференціації було поділено на 7 послідовних стадій. Отримані клітини експресували ключові маркери зрілих  $\beta$ -клітин, таких як MAFA, PDX1/NKX6.1 та INS, і демонстрували функціональну подібність із людськими острівцями після трансплантації *in vivo*. Ці  $\beta$ -подібні клітини швидко усували гіперглікемію в стрептозотоцин-діабетичних мишей, секретуючи С-пептид та інсулін [22].

Експресія NGN3 позначає початок ендокринної диференціації. Попередні дослідження підтвердили, що інгібування сигнального шляху Notch за допомогою інгібіторів  $\gamma$ -секретази або інгібіторів BMP має істотне значення для індукції NGN3, із подальшим додаванням фактора росту фібробластів-10 та фактора росту кератиноцитів (keratinocyte growth factor, KGF), що призводить до надійної генерації PDX1+-попередників ПЗ та збільшення експресії інсуліну в потомстві, похідному від hPSCs [16, 22]. Однак було показано, що застосування інгібіторів кісткового морфогенетичного білка (bone morphogenetic protein, BMP) сприяло передчасній індукції ендокринної диференціації в PDX1+ попередників ПЗ і може зменшити утворення полігормональних клітин. Наступне додавання RA та факторів росту епідермісу (epidermal growth factor, EGF)/KGF ефективно індукувало утворення клітин-попередників PDX1+/NKX6.1+, які диференціювалися в IPC *in vitro* [16]. Є дані, що додавання селективного інгібітора кінази глікогенсинтази-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK-3 $\beta$ ) (замінника Wnt3a) під час індукції дефінітивної ентодерми значно знижувало рівень загибелі ентодермальних клітин [12].

Методи диференціації hESCs до  $\beta$ -клітин включають культивування клітин протягом 5 днів у середовищі з низьким вмістом сироватки та активіном А в моношарових культурах із клітинами-фідерами. Так ці клітини диференціюються до дефінітивної ентодерми. Пізніше протокол було розширено для генерування ендокринних клітин, що секретують інсулін та які реагують на різну концентрацію глюкози [23]. Застосування RA, інгібування

sonic hedgehog (Shh) за допомогою циклоспаміну та додавання FGF10 дозволили отримати клітини, які експресували PDX1, NGN3 та інсулін і демонстрували хорошу реакцію на глюкозу [24]. Включення бутирата натрію, що посилює дію активіну А і модулює шляхи WNT, BMP та TGF- $\beta$  [25], покращило вихід  $\beta$ -клітин, отриманих зі SCs. Модифікація протоколів для специфічного продукування ендокринних клітин шляхом культивування клітин з EGF, Noggin та нікотинамідом дала популяцію з 70% клітин, що експресують NKX6.1 [26]. Введення вітаміну С покращувало продукцію клітин, які експресують MAFA, та підвищувало ефективність диференціювання шляхом епігенетичної модифікації. Відомо, що вітамін С має здатність модулювати гістонові деметилази та може посилювати експресію деяких генів [29]. Також вводили трийодтиронін ( $T_3$ ) та інгібітор рецептора 1 трансформуючого фактора росту  $\beta$  (activin receptor-like kinase-5/transforming growth factor beta receptor 1, ALK5/TGF- $\beta$ R1). За цим протоколом було одержано  $\beta$ -клітини, які реагували на глюкозу, але із затримкою [28]. Крім того, було застосовано антагоніст шляху Shh (SANT1), а після отримання панкреатичних клітин-попередників, вводили інгібітор рецептора BMP 1 типу (4-[6-[4-(1-Piperazinyl)phenyl]pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]-quinoline hydrochloride, LDN),  $T_3$ , інгібітор  $\gamma$ -секретази (XXI), гепарин, інгібітор рецептора II alk5 (alk5i) та  $\beta$ -целюлін (із сімейства EGF) [29]. Нещодавня ідентифікація клітин, отримана після диференціації PSCs, продемонструвала клітинну неоднорідність зі специфічними групами клітин на різних стадіях. Попередники клітин ПЗ було ідентифіковано на стадіях 3 та 4. Наприкінці стадії 4 спостерігали появу попередників із NKX6-1, а також перших клітини  $\alpha$ -типу. Нарешті, на стадіях 5 та 6 спостерігали три класи ендокринних клітин із маркером CHGA:  $\beta$ -клітини, що експресують Ins, NKX6-1, Isl1 та інші маркери  $\beta$ -клітин;  $\alpha$ -клітини, що експресують глюкагон (Gcg), Arx, Irx2 (Iroquois homeobox 2) та Ins; та тип ендокринних клітин, які експресують CHGA, триптофан-гідроксилазу 1 (Tph1), Lmx1 $\alpha$  (LIM homeobox transcription factor 1  $\alpha$ ) та Lc18a1 (C-type lectin domain family 18), що найбільше нагадує ентерохромафінні клітини [29-31].

Спостереження за ентерохромафіноподібними клітинами всередині острівців, які показали схожість з  $\beta$ -клітинами, свідчать про існування залежності між долею  $\beta$ -клітин та ентерохромафінних клітин. Це крок вперед у визнанні складного переплетіння клітинної фізіології в острівцях ПЗ. Опис стадій диференціації PSCs дозволив уточнити процес дозрівання  $\beta$ -клітин *in vivo*. Однак функція трансплантованих клітин вимагає подальшого вивчення подій, які призводять до тісної координації між секрецією інсуліну та рівнем глюкози в сироватці крові. Загалом, зрілі  $\beta$ -клітини виділяють однаковий рівень інсуліну у відповідь на глюкозу та калій, а в незрілих  $\beta$ -клітин така координація відсутня. Нещодавно було показано, що групування ендокринних клітин або експресія регуляторів мітохондріальної активності індукуює становлення метаболізму, стимулюючи окислювальне дихання мітохондрій, — ключовий процес для секреції інсуліну в зрілих  $\beta$ -клітинах, що дає надію на отримання зрілих  $\beta$ -клітин [30, 32].

iPSCs можна перепрограмувати зі соматичних клітин пацієнта (наприклад, із фіброblastів) та диференціювати для застосування в ураженій тканині [33]. Використання цього типу клітин має перевагу тому, що знижує ймовірність імунного відторгнення в реципієнта, а також дозволяє уникнути етичних проблем, пов'язаних із використанням EPSCs [34]. Використання iPSCs засноване на властивостях специфічних білків PSCs, які при надмірній експресії можуть перепрограмувати соматичні клітини. Це досягається за допомогою факторів транскрипції OCT4, KLF4, SOX2 та c-Myc, які відповідають за збереження плюрипотентності кінцевої клітини. Ці фактори підтримують здатність вже диференційованої клітини переходити в плюрипотентний стан. Більш того, фактори, пов'язані зі специфічними процесами різних зародкових ліній та певних клітинних груп, можна використати для покращення функції пошкодженої тканини [35, 36]. Кілька досліджень щодо iPSC показали, що вони можуть генерувати ангіогенний процес повністю, дозволяючи відновити нормальний кровотік в уражених тканинах, де вони були протестовані, а це вказує що вони є фундаментальним та альтернативним джерелом судинної

## Огляди

тканини, навіть для лікування ран в організмі людини [37].

Генерування iPSCs проводиться методами, заснованими на вірусних та невірусних векторах. Ефективність перепрограмування змінюється залежно від використовуваного методу. Загалом, методи з використанням вірусів призводять до високої ефективності інтеграції в геном, але мають обмеження щодо безпеки [38]. Більшість iPSCs продукуються з використанням ретровірусних векторів, які інтегрують фактори перепрограмування. Ретровірусні вектори можуть спонтанно інфікувати клітини й вставляти свої гени перепрограмування в геноми господаря за допомогою зворотної транскриптази, що дозволяє продовжувати трансгенну експресію. Експресія ретровірусного трансгена триває поки клітини не трансформуються в iPSCs, а потім ретровірусний промотор інактивується, можливо, через епігенетичні модифікації, такі як метилювання гістонів [39]. Ці механізми керування перепрограмування та автоматичного пригнічення вважаються дуже важливими для індукції iPSC з соматичних клітин. Були спроби налагодити методи перепрограмування, які не вимагають вірусних векторів і, водночас, не впливають на ефективність процесу [17, 40, 41]. З іншого боку, порівняно з EPSCs, iPSCs мають деякі відмінності в експресії генів. Епігенетичні модифікації iPSCs змушують ці клітини підтримувати «пам'ять» про соматичну клітину, з якої вони походять, що може потім впливати на диференціацію до клітин, які мають бути замінені [42].

Попередні спостереження продемонстрували певну обережність у дослідках із клітинами iPSC через можливість імунологічного відторгнення навіть при аутологічних трансплантах. Аномальна експресія кількох генів iPSCs призводила до індукції імунної відповіді, опосередкованої Т-клітинами. Попри ці результати [43], більшість даних свідчить про відсутність імуногенності при використанні аутологічних iPSCs для трансплантації. Крім проблем, які можуть виникнути під час трансплантації iPSCs, важливо забезпечити встановлення стандартних протоколів для процесів перепрограмування, оскільки більшість проблем з функціональністю або посиленням

канцерогенності iPSCs спричинені вторинними змінами геному клітини [44].

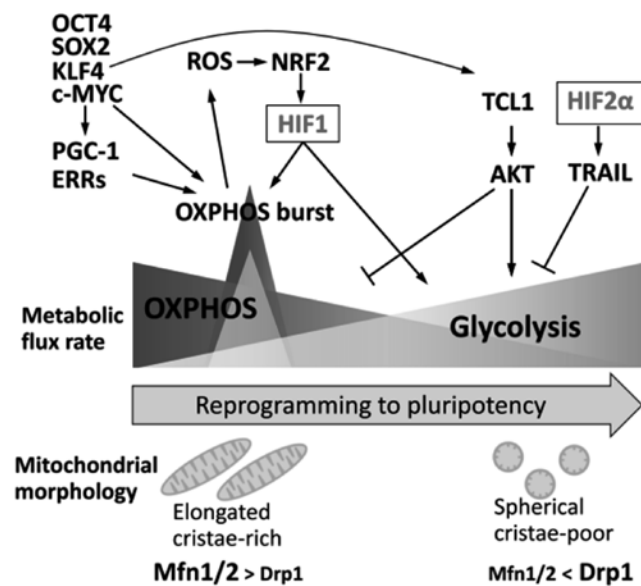
Перепрограмування соматичних клітин до стану плюрипотентності насправді є складним процесом, і цей процес не залежить від єдиного молекулярного шляху. Останні результати однозначно свідчать про те, що молекулярні шляхи для досягнення плюрипотентності можуть бути різноманітними, залежно від епігенетичного стану клітин-донорів та екзогенних факторів транскрипції [45, 46].

Тому модуляція епігеномів шляхом хімічного втручання та запровадження різних комбінацій факторів транскрипції в різних типах клітин-донорів, а також у різних видів може ще більше покращити наше розуміння механізмів перепрограмування.

Різні скринінги щодо збільшення та втрати функцій (gain- and loss-of-function screenings) привели до відкриття специфічних генів та молекулярних шляхів, які гальмують або посилюють процес перепрограмування [47, 48]. Наприклад, специфічні епігенетичні модифікації, включаючи метилювання ДНК, H3K9 та H3K79 та/або активність відповідних ферментів (наприклад, DNMT, HDAC, LSD1 та DOT1L) можуть виступати бар'єрами в процесі перепрограмування. Тому примусове усунення цих епігенетичних бар'єрів шляхом генетичної інактивації або шляхом гальмування хімічними сполуками може посилити або покращити процес перепрограмування [47, 48]. Навпаки, примусова експресія модуляторів хроматину, таких як асоційовані з плюрипотентністю розвитку білки 2 і 4 (developmental pluripotency associated 2 and 4, Dppa2 and Dppa4), може скинути епігеном соматичних клітин до плюрипотентної конфігурації, яка посилює ефективність і кінетику перепрограмування. Крім того, інші фактори транскрипції, включаючи ESRRB, GLIS1, NR5A2, PRDM14, RARG, SALL4, TBX3, FOXA2, FOXF1, FOXH1 і LHX1 (LIM homeobox 1), можуть суттєво посилити перепрограмування при надекспресії разом з OCT4, SOX2, KLF4 та c-Myc [47-50].

Хоча iPSC можуть бути застосовні в регенеративній медицині, для моделювання захворювань та скринінгу ліків, деякі проблеми, пов'язані з використанням iPSCs, такі як низька ефективність перепрограмування та

ризик канцерогенезу, все ще не вирішені. Крім того, тонкі молекулярні механізми, які беруть участь у перепрограмуванні соматичних клітин до стану плюрипотентності, ще не з'ясовані. Порівняно зі своїми соматичними аналогами, PSCs, включаючи ESCs та iPSC, демонструють високу швидкість гліколізу, подібну до аеробного гліколізу в ракових клітинах — явище відоме як ефект Варбурга (Warburg effect), яке є важливим для підтримки властивостей SCs (рис. 2). Цей унікальний гліколітичний метаболізм в iPSCs може забезпечити енергію та стимулювати пентозофосфатний шлях, який є необхідним для швидкої проліферації клітин. Під час перепрограмування соматичні клітини зазнають метаболічного зсуву від окисного фосфорилування (ОФ) до гліколізу, викликаного тимчасовою надактивністю ОФ, що призводить до ініціації та прогресування



**Рис. 2.** Метаболічний зсув і пов'язані з ним фактори під час перепрограмування клітин до плюрипотентності.

Примітка: DRP1 — динамін-споріднений білок 1; ERR — ядерні рецептори, пов'язані з естрогенами; HIF — фактор, індукований гіпоксією; Mfn — мітофузин; NRF2 — nuclear factor erythroid 2-related factor 2; OXPHOS — окисне фосфорилування; PGC-1 — peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1; ROS — активні форми кисню; TRAIL — TNF-related apoptosis-inducing ligand [51]. Деталі в тексті.

**Fig. 2.** Metabolic shift and related factors during cells reprogramming to pluripotency.

Note: DRP1 — dynamin-related protein 1; ERR — estrogen-related nuclear receptors; HIF — hypoxia-induced factor; Mfn — mitofuzin; NRF2 — nuclear factor erythroid 2-related factor 2; OXPHOS — oxidative phosphorylation; PGC-1 — peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1; ROS — reactive oxygen species; TRAIL — TNF-related apoptosis-inducing ligand [51]. Details in the text.

перепрограмування до iPSCs. Метаболічні проміжні продукти та мітохондрії також беруть участь в епігенетичній модифікації, необхідній для процесу перепрограмування iPSCs. Серед ключових регуляторних молекул, які беруть участь у метаболічних зрушеннях, фактор, індукований гіпоксією (HIF1), контролює транскрипцію багатьох таргетних генів, ініціює метаболічні зміни на ранній стадії та підтримує гліколітичний метаболізм у пізній фазі перепрограмування [51].

### Перешкоди для терапії SCs та способи їх подолання

ЦД1 — хронічне аутоімунне захворювання, що спричинене специфічним руйнуванням β-клітин острівців ПЗ і характеризується як абсолютна недостатність секреції інсуліну. Сучасна інсулінозамісна терапія забезпечує інсулін нефізіологічним шляхом і пов'язана з руйнівними ускладненнями. Було доведено, що експериментальна терапія шляхом трансплантації острівців відновлює гомеостаз глюкози в людей із тяжким ЦД1. Однак таке лікування обмежується багатьма факторами, такими як серйозна нестача донорських джерел, поступова втрата донорських клітин, висока вартість тощо. Оскільки PSCs мають потенціал щодо утворення всіх клітин, включаючи острівкові β-клітини в організмі, лікування ЦД SCs привернуло велику увагу. Трансплантація острівцевих β-подібних клітин, диференційованих від hPSCs, може стати альтернативою трансплантації острівців. У терапії SCs отримання β-клітин із повною секрецією інсуліну *in vitro* має вирішальне значення. Однак після тривалих досліджень було виявлено, що β-подібні клітини, отримані шляхом диференціювання *in vitro*, все ще мають багато дефектів, включаючи відсутність стимульованої глюкозою секреції інсуліну дорослого типу та мультигормональної секреції, що свідчить про те, що культура *in vitro* не дозволяє отримати повністю зрілі β-подібні клітини для трансплантації. Велика кількість досліджень виявила, що багато факторів транскрипції відіграють важливу роль у процесі трансформації незрілих β-клітин острівців людини в зрілі. Крім того, PDX1, NKX6.1, SOX9, NGN3, PAX4 тощо важливі для індукції диференціювання hPSCs *in vitro*. Відсутність або недостатня експресія будь-якого з цих ключових факторів може призвести до

## Огляди

дефекту розвитку острівців *in vivo* і нездатності SCs диференціюватися в справжні функціональні  $\beta$ -подібні клітини *in vitro* [6].

*Функціональна незрілість  $\beta$ -клітин, отриманих від SCs.*  $\beta$ -клітини в острівцях згруповані разом з альфа-, дельта-, епсилон- і панкреатичними поліпептидними клітинами та інтенсивно взаємодіють із різними типами клітин у своєму мікрооточенні, включаючи інші ендокринні та неендокринні клітини всередині острівця, а також з екзокринними клітинами поза острівцем. Численні сигнали, які отримують  $\beta$ -клітини, мають вирішальне значення для їхньої функціональності, виживання, диференціювання та проліферації. По-перше, взаємодії  $\beta$ -клітин із  $\beta$ -клітинами мають велике значення для належно скоординованої та синхронізованої секреторної реакції інсуліну на глюкозу, а також для експресії генів інсуліну, зберігання, біосинтезу та вивільнення гормону. Взаємодія паракринних клітин між різними типами ендокринних острівцевих клітин також має вирішальне значення для тонкого налаштування секреторної реакції острівців [52, 53]. Так, глюкагон є добре відомим регулятором секреції інсуліну, тоді як соматостатин пригнічує як інсулін, так і секрецію глюкагону [54]. Важливість міжендокринних контактів клітин для дозрівання  $\beta$ -клітин продемонстровано посиленням дозрівання  $\beta$ -клітин, отриманих із SCs людини, при імітації *in vitro* кластеризації клітин [55]. Таким чином, трансплантація острівцевих кластерів, а не лише  $\beta$ -клітин, швидше за все, буде сприяти контролю глікемії. Окрім взаємодії з іншими ендокринними клітинами,  $\beta$ -клітини також отримують сигнали від позаклітинного матриксу [56], ендотеліальних клітин [57], перичитів, нейронів та імунних клітин. Усі ці сигнали мікросередовища острівців необхідні для дозрівання  $\beta$ -клітин [58].

Примітно, що диференціація не тотожна дозріванню. Диференціацію можна визначити як якісну зміну клітинного фенотипу, що є наслідком початку синтезу нових генних продуктів, які в кінцевому підсумку призводять до функціональної компетентності. Дозрівання, навпаки, можна розглядати як кількісну зміну клітинного фенотипу або клітинних складових білків, що веде до функціональної компетентності. Це означає, що навіть коли

$\beta$ -клітини, отримані зі SCs, експресують усі відомі маркери  $\beta$ -клітин дорослих і виробляють високі рівні інсуліну, вони самі по собі не є функціонально зрілими, оскільки доказ функціональності слід шукати в тестах, які динамічно досліджують чутливість  $\beta$ -клітин до глюкози та механізм виділення інсуліну. Дуже важко, якщо взагалі можливо, забезпечити всі сигнали, які  $\beta$ -клітини отримують від свого мікрооточення за допомогою спрощених протоколів диференціювання *in vitro*, тому поточні протоколи для надбання функціональності  $\beta$ -клітинами покладаються на дозрівання *in vivo* [16, 22]. Альтернативний підхід, спрямований не на створення зрілих клітин, а на використання клітин ранньої дефінітивної ентодерми або клітин-попередників ПЗ і повністю залежить від самокерованої диференціації та дозрівання, щоб отримати з SCs функціональну масу  $\beta$ -клітин *in vivo* [59]. Однак при використанні цього підходу потрібно кілька місяців, щоб  $\beta$ -клітини стали функціональними, і ця чорна скринька дозрівання *in vivo* не дозволяє легко розпізнати її механізми [58].

Визначали профілі експресії генів у трансплантатах iPSC- та ESC-острівців людини, які були пересажені діабетичним мишам. Аналіз підтвердив, що  $\beta$ -клітини, отримані з трансплантованих SCs, здатні секретувати інсулін та експресують маркери дозрівання  $\beta$ -клітин INS, G6PC2, MAFA, MNX1, SIX2 та UCN3 [60]. Такі дослідження надають ресурс для розуміння дозрівання  $\beta$ -клітин людини та покращення стратегій диференціації. Забезпечення швидкої ревазуляризації острівців після трансплантації, ймовірно, сприятиме виживанню та функціональності  $\beta$ -клітин. Сигнали, отримані від ендотеліальних клітин, мають вирішальне значення для розвитку ембріональних  $\beta$ -клітин, а також для проліферації, виживання, диференціювання та функціонування дорослих  $\beta$ -клітин [57]. Гіповаскуляризація є не тільки одним із факторів, що сприяють втраті клітин острівців після трансплантації, але вона також може призвести до дедиференціації  $\beta$ -клітин, оскільки внутрішньопортальні імплантати первинних  $\beta$ -клітин людини втрачають свій зрілий фенотип та експресію ключових маркерів  $\beta$ -клітин [61]. Стратегії покращення ревазуляризації трансплантата зосереджені на постачанні проангіогенних факторів, насамперед фактора росту ендотелію



судин (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A), до клітин острівців. VEGF-A є ключовим ангіогенним фактором, який секритується  $\beta$ -клітинами, сприяючи міграції ендотеліальних клітин, проліферації та виживанню, а також для регулювання проникності судин [57]. Білок VEGF-A можна доставляти багатьма способами, але особливо цікавим підходом є трансфекція мРНК *Vegfa*. Цей підхід набагато безпечніший порівняно з методами доставлення генів на основі вірусних векторів, а властива йому короткочасна експресія є вигідною порівняно з довготривалою експресією, яка є шкідливою для функції острівців і виживання [58, 62].

Нещодавно було показано, що опосередкована ліпосомами трансфекція клітин острівців людини та миші синтетично модифікованою мРНК *Vegfa* покращує ревазуляризацію трансплантата та збільшує масу  $\beta$ -клітин [63]. У сукупності сигнали з мікрооточення острівців мають вирішальне значення для забезпечення належного дозрівання та функціональності  $\beta$ -клітин. Очікується, що трансляція цих ідей на протоколи диференціації SCs покращить результати трансплантації.

**Ризик виникнення пухлини.** Терапевтичний потенціал PSCs величезний і він може змінити медицину. Здатність SCs до самовідновлення та диференціювання в будь-який бажаний тип клітин лежить в основі цієї перспективи, але ці ж властивості несуть також небезпеку, наприклад, ризик розвитку пухлин. Тому було розроблено декілька методів та інструментів для гарантування безпеки в терапевтичних застосуваннях ESCs та iPSCs людини. По-перше, пухлиноутворенню можна запобігти шляхом трансплантації лише диференційованих клітин. Використовуючи такі методи, як кластеризація ендокринних клітин і таргетування на специфічну передачу сигналів, останні протоколи диференціації дають можливість створити більший відсоток зрілих функціональних  $\beta$ -клітин і мінімізувати кількість недиференційованих клітин-попередників. Таким чином, оптимізація протоколів із метою покращення диференціювання мінімізує ризик виникнення пухлин. По-друге, було розроблено підходи до елімінації або сортування недиференційованих PSCs людини *in vitro*, такі як використання хімічних інгібіторів,

імунологічне таргетування небажаних типів клітин або введення суїцидальних генів у геном SCs [64, 65].

Хімічна ерадикація недиференційованих SCs можлива шляхом додавання низькомолекулярних сполук у культуральне середовище для селективного знищення PSCs. Високопродуктивний скринінг ідентифікував інгібітори ключового ферменту біосинтезу олеату – стеароїл-КоА-десатурази (stearoyl-CoA desaturase, SCD1) як агентів, що специфічно порушують життєздатність SCs. Враховуючи, що SCD1 надекспресується в iPSC- $\beta$ -клітинах і є необхідною для ідентифікації  $\beta$ -клітин, вплив цих інгібіторів SCD1 на функцію  $\beta$ -клітин потребує подальшого дослідження [66]. Імунологічне таргетування щодо недиференційованих SCs базується на використанні цитотоксичних антитіл, які спрямовані проти специфічних маркерів SCs для їх елімінації, або відокремлення від диференційованих клітин. Наприклад, глікан SSEA-5 є поверхневим маркером ESCs людини, який використовувався перед трансплантацією для селективного видалення недиференційованих клітин, що утворюють тератоми. Редагування генів також може допомогти у видаленні недиференційованих hPSCs. У інноваційному підході до селективного видалення пухлиногенних клітин, у  $\beta$ -клітини, отримані з ESCs, було введено дві касети суїцидальних генів. Це була тимідинкіназа вірусу простого герпесу (herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK), яка керувалася промотором гена теломерази, селективно активного у недиференційованих клітинах, а також нітроредуктаза (NTR), оточена двома loxP-сайтами, яка видалається після експресії Cre (cyclization recombinase), під промотором гена інсуліну людини. HSV-TK і NTR чутливі відповідно до ганцикловіру (ganciclovir) та алкілюючого агента CB<sub>1954</sub> (5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide), що дозволяє еліминувати пухлиногенні недиференційовані клітини в будь-який потрібний момент, як *in vitro*, так і *in vivo* [64].

Нарешті, були сконструйовані iPSCs людини з індукбельним суїцидальним геном каспази-9, у яких низькомолекулярний хімічний індуктор димеризації може ефективно індукувати апоптоз у >99% клітин [65]. Хоча ці методи є інноваційними та перспективними,

## Огляди

вони ще не гарантують безпеку після клінічної трансплантації.

*Імунне відторгнення трансплантата.* Іншою серйозною перешкодою для клінічного застосування  $\beta$ -клітин, отриманих із SCs, є імунне відторгнення трансплантата через невідповідність лейкоцитарного антигена людини (HLA). Зараз пацієнти потребують введення імуносупресивних препаратів для запобігання імунній відповіді до алотрансплантата, які можуть мати побічні ефекти, як незначні (виразки в роті, діарея та акне), так і серйозні, що включають підвищений ризик важкої інфекції та злоякісних новоутворень. Відторгненню алотрансплантата можна запобігти, якщо пересадити специфічні для пацієнта похідні iPSC, які гарантують ідеальну відповідність HLA. Однак одержання таких персоналізованих клітин для окремих пацієнтів є дуже дорогим, тривалим і навряд чи стане універсальним рішенням для лікування ЦД у короткостроковій перспективі. З цією метою зараз створюються банки HLA, які містять селективні клітинні лінії з гомозиготними гаплотипами HLA, які були ретельно відібрані для відповідності більшості популяції. Створення банків клітинних ліній зменшує кількість клітинних ліній, необхідних для забезпечення трансплантації між генетично неспорідненим донором і реципієнтом, і, таким чином, зробить терапію SCs більш доступною [67].

Крім того, терапія регуляторними Т-клітинами є привабливим підходом для встановлення імунної толерантності до алогенних трансплантатів та для уникнення автоімунної реакції, що виникає після трансплантації. Введення регуляторних Т-клітин мишам із вперше виявленим ЦД може відстрочити розвиток автоімунного діабету і подовжити виживання алотрансплантату острівців. Клінічні випробування в пацієнтів із ЦД1 вже показали терапевтичну ефективність та безпеку цього підходу [68]. Регуляторні Т-клітини людини можна виділити, культивувати та розмножити *ex vivo* перед трансплантацією, однак продукція клітин у терапевтично значущих кількостях зі збереженням високої чистоти залишається складним завданням [69]. Регуляторні Т-клітини секретують численні протизапальні цитокіни, які використовуються в клінічній практиці. Нещодавно  $\beta$ -клітини

були модифіковані шляхом використання CRISPR/Cas9 для секретування протизапального інтерлейкіну-10 (interleukin-10, IL-10). Ген IL-10 був вбудований у С-пептидний локус гена *INS1*, що призводить до його транскрипції, трансляції та секреції залежно від рівня глюкози [70]. Відомо також, що IL-10, який вбудовується з використанням адено-асоційованого вірусного вектора, сприяє виживанню трансплантата острівців у діабетичних мишей. Інша стратегія індукції імунної толерантності включає спільне введення добраних типів клітин, таких як мезенхімальні стовбурові клітини (mesenchymal stem cells, MSCs), які мають корисні характеристики, включаючи ангіогенетичний потенціал і модуляцію імунної реакції. Спільна трансплантація острівців з MSCs покращує виживання трансплантата [71]. Дослідження, проведені на різних експериментальних моделях, починаючи від мишей [72], щурів і приматів, проілюстрували, що спільне приживлення острівців з MSCs запобігає імунному відторгненню через інгібування ефекторних Т-клітин, експансію регуляторних Т-клітин і зниження продукції прозапальних цитокінів [58].

В умовах клініки трансплантація острівців проводиться через ворітну вену печінки. Однак ця стратегія не допускає спільного приживлення з MSCs, оскільки трансплантовані острівці потраплять у мікроциркуляцію печінки, а MSCs внаслідок їх малого розміру — у легені. Тому клінічна застосованість цього підходу залишається обмеженою. Показано, що попередня обробка острівців безклітинною сумішшю з продуктів MSCs пригнічує імунну відповідь і сприяє позитивним результатам трансплантації [73]. Цю стратегію можна легко реалізувати в протоколах трансплантації, і вона перевершує логістичні та пов'язані з безпекою недоліки використання MSC [73-75]. Як альтернатива — порушення експресії гена HLA може надати PSCs людини гіпоімунногенності. Шляхом CRISPR/Cas9-опосередкованої делеції бічного ланцюга  $\beta$ -2-мікроглобуліну можуть утворюватися клітини без молекул HLA I класу. Крім того, інактивація гена *CIITA* (class II, major histocompatibility complex, transactivator), який кодує трансактиватор основного комплексу гістосумісності II класу, може інгібувати експресію HLA класу II [76].

На жаль, видалення  $\beta$ -2-мікроглобуліну також запобігає поверхневій експресії HLA-E та HLA-G, які є важливими для підтримки толерантності до природних клітин-кілерів (natural killer cells, NK). З цієї причини видаляли лише HLA-A/B- та C-гени, щоб запобігти опосередкованій CD8<sup>+</sup> Т-клітинами цитотоксичності, зберігаючи при цьому толерантність до NK [77]. Окрім вилучення генів HLA-A/-B/-C та *CITA* під час використання мультиплексного редагування геному, додатково вводили імуномодулювальні фактори PD-L1, HLA-G та CD47. CD47 є сигналом, який запобігає поглинанню клітин макрофагами [77].

## Висновки

Сучасні стратегії створення IPCs базуються на підходах, що імітують нормальний розвиток ПЗ. Додаючи на кожній стадії розвитку ембріональної ПЗ різноманітні цитокини та модулятори досягають того, що hPSCs набувають фенотипу  $\beta$ -клітин.

iPSCs можна перепрограмувати із соматичних клітин пацієнта з використанням вірусних та невірусних векторів. Застосуванню iPSCs у регенеративній медицині перешкоджають проблеми, пов'язані з низькою ефективністю перепрограмування, ризиком канцерогенезу, функціональною незрілістю  $\beta$ -клітин, отриманих із SCs та імунним відторгненням трансплантата.

## Список використаної літератури

- Cleveland MH, Sawyer JM, Afelik S, Jensen J, Leach SD. Exocrine ontogenies: on the development of pancreatic acinar, ductal and centroacinar cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Aug;23(6):711-9. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.06.008.
- Peloso A, Citro A, Zoro T, Cobiainchi L, Kahler-Quesada A, Bianchi CM, et al. Regenerative medicine and diabetes: targeting the extracellular matrix beyond the stem cell approach and encapsulation technology. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018 Aug 31;9:445. doi: 10.3389/fendo.2018.00445.
- Rankin SA, McCracken KW, Luedke DM, Han L, Wells JM, Shannon JM, et al. Timing is everything: Reiterative Wnt, BMP and RA signaling regulate developmental competence during endoderm organogenesis. *Dev Biol.* 2018 Feb 1;434(1):121-32. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.11.018.
- Arroyave F, Montaña D, Lizcano F. Diabetes mellitus is a chronic disease that can benefit from therapy with induced pluripotent stem cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 18;21(22):8685. doi: 10.3390/ijms21228685.
- Jennings RE, Berry AA, Gerrard DT, Wearne SJ, Strutt J, Withey S, et al. Laser capture and deep sequencing reveals the transcriptomic programmes regulating the onset of pancreas and liver differentiation in human embryos. *Stem Cell Reports.* 2017 Nov 14;9(5):1387-94. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.09.018.
- Sun ZY, Yu TY, Jiang FX, Wang W. Functional maturation of immature  $\beta$  cells: a roadblock for stem cell therapy for type 1 diabetes. *World J Stem Cells.* 2021 Mar 26;13(3):193-207. doi: 10.4252/wjsc.v13.i3.193.
- Aigha II, Abdelalim EM. NKX6.1 transcription factor: a crucial regulator of pancreatic  $\beta$  cell development, identity, and proliferation. *Stem Cell Res Ther.* 2020 Oct 29;11(1):459. doi: 10.1186/s13287-020-01977-0.
- Salisbury RJ, Blaylock J, Berry AA, Jennings RE, De Krijger R, Piper Hanley K, et al. The window period of NEUROGENIN3 during human gestation. *Islets.* 2014;6(3): e954436. doi: 10.4161/19382014.2014.954436.
- Lee K, Cho H, Rickert RW, Li QV, Pulecio J, Leslie CS, et al. FOXA2 is required for enhancer priming during pancreatic differentiation. *Cell Rep.* 2019 Jul 9;28(2):382-93.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.06.034.
- Villamayor L, Rodríguez-Seguel E, Araujo R, Carrasco M, Bru-Tari E, Mellado-Gil JM, et al. GATA6 controls insulin biosynthesis and secretion in adult  $\beta$ -cells. *Diabetes.* 2018 Mar;67(3):448-60. doi: 10.2337/db17-0364.
- Puri S, Roy N, Russ HA, Leonhardt L, French EK, Roy R, et al. Replication confers  $\beta$  cell immaturity. *Nat Commun.* 2018 Feb 2;9(1):485. doi: 10.1038/s41467-018-02939-0.
- Chen S, Du K, Zou C. Current progress in stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus. *Stem Cell Res Ther.* 2020 Jul 8;11(1):275. doi: 10.1186/s13287-020-01793-6.
- Millman JR, Xie C, Van Dervort A, Gürtler M, Pagliuca FW, Melton DA. Generation of stem cell-derived  $\beta$ -cells from patients with type 1 diabetes. *Nat Commun.* 2016 May 10;7:11463. doi: 10.1038/ncomms11463.
- Millman JR, Pagliuca FW. Autologous pluripotent stem cell-derived  $\beta$ -like cells for diabetes cellular therapy. *Diabetes.* 2017 May;66(5):1111-20. doi: 10.2337/db16-1406.
- Mu XP, Ren LQ, Yan HW, Zhang XM, Xu TM, Wei AH, et al. Enhanced differentiation of human amniotic fluid-derived stem cells into insulin-producing cells in vitro. *J Diabetes Investig.* 2017 Jan;8(1):34-43. doi: 10.1111/jdi.12544.
- Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu JH, et al. Generation of functional human pancreatic  $\beta$  cells in vitro. *Cell.* 2014 Oct 9;159(2):428-39. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.040.
- Path G, Perakakis N, Mantzoros CS, Seufert J. Stem cells in the treatment of diabetes mellitus – focus on mesenchymal stem cells. *Metabolism.* 2019 Jan;90:1-15. doi: 10.1016/j.metabol.2018.10.005.
- Russ HA, Parent AV, Ringler JJ, Hennings TG, Nair GG, Shveygert M, et al. Controlled induction of human pancreatic progenitors produces functional beta-like cells in vitro. *EMBO J.* 2015 Jul 2;34(13):1759-72. doi: 10.15252/embj.201591058.
- Tao T, Wang Y, Chen W, Li Z, Su W, Guo Y, et al. Engineering human islet organoids from iPSCs using an organ-on-chip platform. *Lab Chip.* 2019 Mar 13;19(6):948-58. doi: 10.1039/c8lc01298a.
- Yabe SG, Fukuda S, Takeda F, Nashiro K, Shimoda M, Okochi H. Efficient generation of functional pancreatic  $\beta$ -cells from human induced pluripotent stem cells. *J Diabetes.* 2017 Feb;9(2):168-79. doi: 10.1111/1753-0407.12400.
- Korytnikov R, Nostro MC. Generation of polyhormonal and multipotent pancreatic progenitor lineages from human pluripotent stem cells. *Methods.* 2016 May 15;101:56-64. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.10.017.
- Rezania A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A, et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2014 Nov;32(11):1121-33. doi: 10.1038/nbt.3033.
- Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol.* 2008 Apr;26(4):443-52. doi: 10.1038/nbt1393.
- Schulz TC, Young HY, Agulnick AD, Babin MJ, Baetge EE, Bang AG, et al. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One.* 2012;7(5): e37004. doi: 10.1371/journal.pone.0037004.
- Nostro MC, Sarangi F, Ogawa S, Holtzinger A, Corneo B, Li X, et al. Stage-specific signaling through TGF $\beta$  family members and WNT regulates patterning and pancreatic specification of human

## Огляди

- pluripotent stem cells. *Development*. 2011 Mar;138(5):861-71. doi: 10.1242/dev.055236.
26. Nostro MC, Sarangi F, Yang C, Holland A, Elefanty AG, Stanley EG, et al. Efficient generation of NKX6-1+ pancreatic progenitors from multiple human pluripotent stem cell lines. *Stem Cell Reports*. 2015 Apr 14;4(4):591-604. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.02.017.
  27. Lee Chong T, Ahearn EL, Cimmino L. Reprogramming the epigenome with vitamin C. *Front Cell Dev Biol*. 2019 Jul 16;7:128. doi: 10.3389/fcell.2019.00128.
  28. Bruin JE, Saber N, O'Dwyer S, Fox JK, Mojibian M, Arora P, et al. Hypothyroidism impairs human stem cell-derived pancreatic progenitor cell maturation in mice. *Diabetes*. 2016 May;65(5):1297-309. doi: 10.2337/db15-1439.
  29. Veres A, Faust AL, Bushnell HL, Engquist EN, Kenty JH, Harb G, et al. Charting cellular identity during human *in vitro*  $\beta$ -cell differentiation. *Nature*. 2019 May;569(7756):368-73. doi: 10.1038/s41586-019-1168-5.
  30. Helman A, Melton DA. A stem cell approach to cure type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2021 Jan 4;13(1):a035741. doi: 10.1101/cshperspect.a035741.
  31. Kotliar D, Veres A, Nagy MA, Tabrizi S, Hodis E, Melton DA, et al. Identifying gene expression programs of cell-type identity and cellular activity with single-cell RNA-Seq. *Elife*. 2019 Jul 8;8:e43803. doi: 10.7554/eLife.43803.
  32. Davis JC, Alves TC, Helman A, Chen JC, Kenty JH, Cardone RL, et al. Glucose response by stem cell-derived  $\beta$  cells *in vitro* is inhibited by a bottleneck in glycolysis. *Cell Rep*. 2020 May 12;31(6):107623. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107623.
  33. Kondo Y, Toyoda T, Inagaki N, Osafune K. iPSC technology-based regenerative therapy for diabetes. *J Diabetes Investig*. 2018 Mar;9(2):234-43. doi: 10.1111/jdi.12702.
  34. Apostolou E, Stadtfeld M. Cellular trajectories and molecular mechanisms of iPSC reprogramming. *Curr Opin Genet Dev*. 2018 Oct;52:77-85. doi: 10.1016/j.gde.2018.06.002.
  35. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
  36. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc*. 2007;2(12):3081-9. doi: 10.1038/nprot.2007.418.
  37. Gorecka J, Kostiuk V, Freydooni A, Gonzalez L, Luo J, Dash B, et al. The potential and limitations of induced pluripotent stem cells to achieve wound healing. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Mar 12;10(1):87. doi: 10.1186/s13287-019-1185-1.
  38. Hochedlinger K, Jaenisch R. Induced Pluripotency and Epigenetic Reprogramming. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Dec 1;7(12):a019448. doi: 10.1101/cshperspect.a019448.
  39. Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova IA, Miyachi H, Kimura H, et al. Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature*. 2010 Apr 8;464(7290):927-31. doi: 10.1038/nature08858.
  40. Tan S, Tao Z, Loo S, Su L, Chen X, Ye L. Non-viral vector based gene transfection with human induced pluripotent stem cells derived cardiomyocytes. *Sci Rep*. 2019 Oct 7;9:14404. doi: 10.1038/s41598-019-50980-w.
  41. Warren L, Lin C. mRNA-based genetic reprogramming. *Mol Ther*. 2019 Apr 10;27(4):729-34. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.12.009.
  42. Brix J, Zhou Y, Luo Y. The epigenetic reprogramming roadmap in generation of iPSCs from somatic cells. *J Genet Genomics*. 2015 Dec 20;42(12):661-70. doi: 10.1016/j.jgg.2015.10.001.
  43. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011 May 13;474(7350):212-5. doi: 10.1038/nature10135.
  44. Haworth R, Sharpe M. Accept or reject: the role of immune tolerance in the development of stem cell therapies and possible future approaches. *Toxicol Pathol*. 2021 Oct;49(7):1308-16. doi: 10.1177/0192623320918241.
  45. Kim KP, Han DW, Kim J, Schöler HR. Biological importance of OCT transcription factors in reprogramming and development. *Exp Mol Med*. 2021 Jun;53(6):1018-28. doi: 10.1038/s12276-021-00637-4.
  46. Kim KP, Wu Y, Yoon J, Adachi K, Wu G, Velychko S, et al. Reprogramming competence of OCT factors is determined by transactivating domains. *Sci Adv*. 2020 Sep 2;6(36):eaaz7364. doi: 10.1126/sciadv.aaz7364.
  47. Kim KP, Choi J, Yoon J, Bruder JM, Shin B, Kim J, et al. Permissive epigenomes endow reprogramming competence to transcriptional regulators. *Nat Chem Biol*. 2021 Jan;17(1):47-56. doi: 10.1038/s41589-020-0618-6.
  48. Ebrahimi A, Sevinç K, Gürhan Sevinç G, Cribbs AP, Philpott M, Uyulur F, et al. Bromodomain inhibition of the coactivators CBP/EP300 facilitate cellular reprogramming. *Nat Chem Biol*. 2019 May;15(5):519-28. doi: 10.1038/s41589-019-0264-z.
  49. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Sasaki A, Yamamoto M, et al. Induction of pluripotency in human somatic cells via a transient state resembling primitive streak-like mesendoderm. *Nat Commun*. 2014 Apr 24;5:3678. doi: 10.1038/ncomms4678.
  50. Zhang Z, Xiang D, Wu WS. Sodium butyrate facilitates reprogramming by derepressing OCT4 transactivity at the promoter of embryonic stem cell-specific miR-302/367 cluster. *Cell Reprogram*. 2014 Apr;16(2):130-9. doi: 10.1089/cell.2013.0070.
  51. Ishida T, Nakao S, Ueyama T, Harada Y, Kawamura T. Metabolic remodeling during somatic cell reprogramming to induced pluripotent stem cells: involvement of hypoxia-inducible factor 1. *Inflamm Regen*. 2020 May 12;40:8. doi: 10.1186/s41232-020-00117-8.
  52. Svendsen B, Larsen O, Gabe MBN, Christiansen CB, Rosenkilde MM, Drucker DJ, et al. Insulin secretion depends on intra-islet glucagon signaling. *Cell Rep*. 2018 Oct 30;25(5):1127-34.e2. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.018.
  53. Svendsen B, Holst JJ. Paracrine regulation of somatostatin secretion by insulin and glucagon in mouse pancreatic islets. *Diabetologia*. 2021 Jan;64(1):142-51. doi: 10.1007/s00125-020-05288-0.
  54. Van Der Meulen T, Donaldson CJ, Cáceres E, Hunter AE, Cowing-Zitron C, Pound LD, et al. Urocortin3 mediates somatostatin-dependent negative feedback control of insulin secretion. *Nat Med*. 2015 Jul;21(7):769-76. doi: 10.1038/nm.3872.
  55. Nair GG, Liu JS, Russ HA, Tran S, Saxton MS, Chen R, et al. Recapitulating endocrine cell clustering in culture promotes maturation of human stem-cell-derived  $\beta$  cells. *Nat Cell Biol*. 2019 Feb;21(2):263-74. doi: 10.1038/s41556-018-0271-4.
  56. Townsend SE, Gannon M. Extracellular matrix-associated factors play critical roles in regulating pancreatic  $\beta$ -cell proliferation and survival. *Endocrinology*. 2019 Aug 1;160(8):1885-94. doi: 10.1210/en.2019-00206.
  57. Staels W, Heremans Y, Heimberg H, De Leu N. VEGF-A and blood vessels: a beta cell perspective. *Diabetologia*. 2019 Nov;62(11):1961-68. doi: 10.1007/s00125-019-4969-z.
  58. Bourgeois S, Sawatani T, Van Mulders A, De Leu N, Heremans Y, Heimberg H, et al. Towards a functional cure for diabetes using stem cell-derived beta cells: are we there yet? *Cells*. 2021 Jan 19;10(1):191. doi: 10.3390/cells10010191.
  59. Bruin JE, Asadi A, Fox JK, Ererer S, Rezanian A, Kieffer TJ. Accelerated maturation of human stem cell-derived pancreatic progenitor cells into insulin-secreting cells in immunodeficient rats relative to mice. *Stem Cell Reports*. 2015 Dec 8;5(6):1081-96. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.10.013.
  60. Augsornworawat P, Maxwell KG, Velazco-Cruz L, Millman JR. Single-cell transcriptome profiling reveals  $\beta$  cell maturation in stem cell-derived islets after transplantation. *Cell Rep*. 2020 Aug 25;32(8):108067. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108067.
  61. Anderson SJ, White MG, Armour SL, Maheshwari R, Tiniakos D, Muller YD, et al. Loss of end-differentiated  $\beta$ -cell phenotype following pancreatic islet transplantation. *Am J Transplant*. 2018 Mar;18(3):750-5. doi: 10.1111/ajt.14521.
  62. Brissova M, Aamodt K, Brahmachary P, Prasad N, Hong JY, Dai C, et al. Islet microenvironment, modulated by vascular endothelial growth factor-A signaling, promotes  $\beta$  cell regeneration. *Cell Metab*. 2014 Mar 4;19(3):498-511. doi: 10.1016/j.cmet.2014.02.001.
  63. Staels W, Verdonck Y, Heremans Y, Leuckx G, De Groef S, Heirman C, et al. Vegf-A mRNA transfection as a novel approach to improve mouse and human islet graft revascularisation. *Diabetologia*. 2018 Aug;61(8):1804-10. doi: 10.1007/s00125-018-4646-7.
  64. Qadir MMF, Álvarez-Cubela S, Belle K, Sapir T, Messaggio F,

- Johnson KB, et al. A double fail-safe approach to prevent tumorigenesis and select pancreatic  $\beta$  cells from human embryonic stem cells. *Stem Cell Reports*. 2019 Mar 5;12(3):611-23. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.01.012.
65. Yagyu S, Hoyos V, Del Bufalo F, Brenner MK. An inducible caspase-9 suicide gene to improve the safety of therapy using human induced pluripotent stem cells. *Mol Ther*. 2015 Sep;23(9):1475-85. doi: 10.1038/mt.2015.100.
  66. Oshima M, Pechberty S, Bellini L, Göpel SO, Campana M, Rouch C, et al. Stearoyl CoA desaturase is a gatekeeper that protects human beta cells against lipotoxicity and maintains their identity. *Diabetologia*. 2020 Feb;63(2):395-409. doi: 10.1007/s00125-019-05046-x.
  67. De Rham C, Villard J. Potential and limitation of HLA-based banking of human pluripotent stem cells for cell therapy. *J Immunol Res*. 2014;2014:518135. doi: 10.1155/2014/518135.
  68. Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Dobyszuk A, Grabowska M, Derkowska I, Juścińska J, et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4(+)CD25(high)CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets — results of one year follow-up. *Clin Immunol*. 2014 Jul;153(1):23-30. doi: 10.1016/j.clim.2014.03.016.
  69. Ferreira LMR, Muller YD, Bluestone JA, Tang Q. Next-generation regulatory T cell therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Oct;18(10):749-69. doi: 10.1038/s41573-019-0041-4.
  70. Lim D, Srekanth V, Cox KJ, Law BK, Wagner BK, Karp JM, et al. Engineering designer beta cells with a CRISPR-Cas9 conjugation platform. *Nat Commun*. 2020 Aug 13;11:1-11. doi: 10.1038/s41467-020-17725-0.
  71. English K. Mesenchymal stem cells to promote islet transplant survival. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016 Dec;21(6):568-73. doi: 10.1097/MOT.0000000000000359.
  72. Ben Nasr M, Vergani A, Avruch J, Liu L, Kefaloyianni E, D'Addio F, et al. Co-transplantation of autologous MSCs delays islet allograft rejection and generates a local immunoprivileged site. *Acta Diabetol*. 2015 Oct;52(5):917-27. doi: 10.1007/s00592-015-0735-y.
  73. Arzouni AA, Vargas-Seymour A, Nardi N, J F King A, Jones PM. Using mesenchymal stromal cells in islet transplantation. *Stem Cells Transl Med*. 2018 Aug;7(8):559-63. doi: 10.1002/sctm.18-0033.
  74. Arzouni AA, Vargas-Seymour A, Rackham CL, Dhadha P, Huang GC, Choudhary P, et al. Mesenchymal stromal cells improve human islet function through released products and extracellular matrix. *Clin Sci (Lond)*. 2017 Nov 28;131(23):2835-45. doi: 10.1042/CS20171251.
  75. Rackham CL, Amisten S, Persaud SJ, King AJF, Jones PM. Mesenchymal stromal cell secretory factors induce sustained improvements in islet function pre- and post-transplantation. *Cytotherapy*. 2018 Dec;20(12):1427-36. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.07.007.
  76. Mattapally S, Pawlik KM, Fast VG, Zumaquero E, Lund FE, Randall TD, et al. Human leukocyte antigen class I and II knockout human induced pluripotent stem cell-derived cells: universal donor for cell therapy. *J Am Heart Assoc*. 2018 Dec 4;7(23):e010239. doi: 10.1161/JAHA.118.010239.
  77. Han X, Wang M, Duan S, Franco PJ, Kenty JH, Hedrick P, et al. Generation of hypoinmunogenic human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 May 21;116(21):10441-6. doi: 10.1073/pnas.1902566116.

## Список скорочень

**ПЗ** — підшлункова залоза

**ЦД** — цукровий діабет

**ЦД1** — цукровий діабет 1-го типу

**EPSCs** — ембріональні плюрипотентні стовбурові клітини (embryonic pluripotent stem cells)

**ESCs** — ембріональні стовбурові клітини (embryonic stem cells)

**hESCs** — ембріональні стовбурові клітини людини (human embryonic stem cells)

**hPSCs** — плюрипотентні стовбурові клітини людини (human pluripotent stem cells)

**IPCs** — інсулін-продукуючі клітини (insulin-producing cells)

**iPSCs** — індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (induced pluripotent stem cells)

**MSCs** — мезенхімальні стовбурові клітини (mesenchymal stem cells)

**PSCs** — плюрипотентні стовбурові клітини (pluripotent stem cells)

**SCs** — стовбурові клітини (stem cells)

## Generation of insulin-producing cells from stem cells. Somatic cell reprogramming

**M.D. Tronko, V.M. Pushkarev, O.I. Kovzun, L.K. Sokolova, V.V. Pushkarev**

State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

**Abstract.** Modern strategies for creating insulin-producing cells (IPCs) are mainly based on approaches that mimic the normal development of the pancreas. The obtained IPCs should express specific biological markers of  $\beta$ -cells, which identify the final status of differentiation and respond to changes in glucose concentration in the environment.

The main stages in the development of the embryonic pancreas include the development of the definitive endoderm, the primitive intestinal tube, the pancreatic precursor, the endocrine precursor, and hormone-expressing endocrine cells. By adding a variety of cytokines and signaling modulators to activate or inhibit specific signaling pathways involved in the generation of adult  $\beta$ -cells at each stage, human pluripotent stem cells (hPSCs) acquire the  $\beta$ -cell phenotype. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) can be reprogrammed from the patient's somatic cells and differentiated for use in the affected tissue. The use of this type of cell has the advantage that it reduces the likelihood of immune rejection by the recipient, as well as avoids the moral problems associated with the use of embryonic pluripotent stem cells (EPSCs). The use of iPSCs is based on the properties of specific proteins of pluripotent stem cells, which in overexpression can reprogram somatic cells. This is achieved through the transcription factors OCT4, KLF4, SOX2 and c-Myc, which are responsible for maintaining the pluripotency of the final cell.

iPSCs generation is performed by the methods based on viral and non-viral vectors. Viral methods result in high genome integration efficiency, but have security limitations.

Although iPSCs may be applicable to regenerative medicine, disease modeling, and drug screening, some problems associated with the use of iPSCs, such as low reprogramming efficiency and the risk of carcinogenesis, remain unresolved.

There are also barriers to stem cell therapy, such as functional immaturity of stem cell-derived  $\beta$ -cells, the risk of tumor formation, and immune graft rejection, which require further studies.

**Keywords:** stem cells, insulin-producing cells, somatic cell reprogramming.

## Огляди

**Для цитування:** Тронько МД, Пушкар'єв ВМ, Ковзун ОІ, Соколова ЛК, Пушкар'єв ВВ. Генерування інсулін-продуруючих клітин зі стовбурових клітин. Перепрограмування соматичних клітин. Ендокринологія. 2021;27(1):43-56. doi: 10.31793/1680-1466.2021.27-1.43.

**Адреса для листування:** Пушкар'єв Володимир Михайлович, pushkarev.vm@gmail.com, ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, Київ 04114, Україна.

**Відомості про авторів:** Тронько Микола Дмитрович, д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН України, акад. НАМН України, завідувач відділу фундаментальних і прикладних проблем ендокринології, директор Інституту, ORCID: 0000-0001-7421-0981; Пушкар'єв Володимир Михайлович, д-р біол. наук, старш. наук. співроб., головний науковий співробітник відділу фундаментальних і прикладних проблем ендокринології, ORCID: 0000-0003-0347-7771; Ковзун Олена Ігорівна, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАМН України, заступник директора Інституту з наукових питань, ORCID: 0000-0001-8164-7671; Соколова Любов Костянтинівна, д-р мед. наук, старш. наук. співроб., завідувачка відділу діабетології, ORCID: 0000-0003-0011-0106; Пушкар'єв Віктор Володимирович, канд. біол. наук, старш. наук. співроб. відділу фундаментальних і прикладних проблем ендокринології, ORCID: 0000-0001-5940-5510.

**Особистий внесок:** Тронько М.Д. — ідея роботи й консультація під час редагування статті; Пушкар'єв В.М., Ковзун О.І., Соколова Л.К., Пушкар'єв В.В. — аналіз літературних джерел, написання тексту, підготовка до друку і переклад резюме.

**Фінансування:** стаття підготовлена в рамках бюджетного фінансування НАМН України за планом науково-дослідних робіт ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України».

**Декларація з етики:** автори задекларували відсутність конфлікту інтересів і фінансових зобов'язань.

**Стаття:** надійшла до редакції 05.02.2022 р.; перероблена 14.02.2022 р.; прийнята до друку 21.02.2022 р.; надрукована 31.03.2022 р.

**For citation:** Tronko MD, Pushkarev VM, Kovzun OI, Sokolova LK, Pushkarev VV. Generation of insulin-producing cells from stem cells. Somatic cell reprogramming. Endokrynologia. 2021;27(1):43-56. doi: 10.31793/1680-1466.2021.27-1.43.

**Correspondence address:** Pushkarev Vladimir Mikhailovich, pushkarev.vm@gmail.com, State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Vyshgorodska Str., 69, Kyiv 04114, Ukraine.

**Information about the authors:** Tronko Mykola Dmytrovych, Dr. Sci. (Medicine), Prof., Cor. Member of the NAN of Ukraine, Acad. of the NAMS of Ukraine, Head of the Department of Fundamental and Applied Problems of Endocrinology, Director of the Institute, ORCID: 0000-0001-7421-0981; Pushkarev Volodymyr Mikhailovych, Dr. Sci. (Biology), Senior Scientist, Chief Research Fellow of the Department of Fundamental and Applied Problems of Endocrinology, ORCID: 0000-0003-0347-7771; Kovzun Olena Igorivna, Dr. Sci. (Biology), Prof., Cor. Member of the NAMS of Ukraine, Deputy Director of the Institute for Scientific Affairs, ORCID: 0000-0001-8164-7671; Sokolova Lyubov Kostyantynivna, Dr. Sci. (Medicine), Senior Research Fellow, Head of Diabetology Department, ORCID: 0000-0003-0011-0106; Pushkarev Viktor Volodymyrovych, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher of the Department of Fundamental and Applied Problems of Endocrinology, ORCID: 0000-0001-5940-5510.

**Personal contribution:** Tronko MD — idea of work and consultations when editing an article; Pushkarev VM, Kovzun OI, Sokolova LK, Pushkarev VV — analysis of literary sources and text writing, preparation for publishing and translation of abstract.

**Funding:** The article was prepared within the framework of budgetary funding of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine according to the plan of research work of the State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine».

**Declaration of ethics:** The authors have declared no conflicts of interest or financial obligations.

**Article:** received February 05, 2022; revised February 14, 2022; accepted February 21, 2022; published March 31, 2022.