

Замещение β -клеток поджелудочной железы при сахарном диабете

^{1,2}Пеллегрини С., ¹Сорди В., ¹Пьемонти Л.

¹Исследовательский институт сахарного диабета, госпиталь Сан-Раффаэле, Милан, Италия
²Университет Инсубрия, Варезе, Италия

У пациентов, страдающих сахарным диабетом (СД), происходит разрушение или развивается недостаточность β -клеток поджелудочной железы, и их замещение функционально полноценными клетками, вырабатывающими инсулин, является единственным возможным способом излечения данного заболевания. Несмотря на успешную антигликемическую эффективность и снижение риска развития вторичных осложнений, пересадка клеток островков поджелудочной железы или самой поджелудочной железы у человека осложняется необходимостью поддержания пожизненной иммуносупрессии, а также сокращением числа доноров органов. В данной статье мы представили обзор современных подходов, направленных на поиск неограниченных источников, пригодных для пересадки чувствительных к глюкозе клеток, вырабатывающих инсулин. В частности, мы обсуждаем сложные аспекты механизмов пролиферации β -клеток и/или их неогенеза в условиях *in vivo*, трудности в использовании ксеногенных островков поджелудочной железы, а также текущие достижения в области дифференцировки эмбриональных и индуцированных полипотентных стволовых клеток (наиболее многообещающий и значимый источник β -клеток).

Ключевые слова: сахарный диабет; β -клетки поджелудочной железы; пролиферация; стволовые клетки

β -cell transplantation in diabetes mellitus

^{1,2}Pellegrini S., ¹Sordi V., ¹Piemonti L.

¹Diabetes Research Institute, Ospedale San Raffaele, Milano, Italy

²Università degli Studi dell'Insubria, Varese, Italy

Patients with diabetes mellitus suffer either from destruction of pancreatic β -cells or progressive deterioration of their function. Thus, transplantation of an intact β -cell population fully capable of insulin secretion is the only means to cure this disease. Despite glycemic benefits and decrease in risks for late complications, islet transplantation or complete pancreatic grafting in humans remains a challenge due to necessity of lifetime immunosuppression and increasingly sparse donor resources. Current paper presents a review of modern endeavours to obtain a limitless source for glucose-sensitive insulin secreting cells. We discuss, in particular, complex aspects of β -cell proliferation and/or neogenesis *in vivo*, issues with xenogenous pancreatic islets, and latest advances in controlled differentiation of embryonic and induced polypotent stem cells – the most promising and relevant source of β -cells.

Keywords: diabetes mellitus; pancreatic β -cells; proliferation; stem cells

DOI: <http://dx.doi.org/10.14341/2072-0351-812>

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2012 г. сахарным диабетом (СД) страдали примерно 347 миллионов человек во всем мире. Согласно прогнозам, это число к 2030 г. возрастет до 552 миллионов [1]. В это число включены пациенты с СД 1 и 2 типов (СД1, СД2), доля которых составляет соответственно 10% и 90% от общего числа пациентов с СД [2]. СД1 и СД2 характеризуются инсулиновой недостаточностью, которая служит причиной возникновения гипергликемии, что, в свою очередь, может привести к серьезным нарушениям здоровья, включая кетоацидоз, почечную недостаточность, сердечно-сосудистые заболевания, нейропатию и слепоту. СД1 является хроническим заболеванием, при котором в результате аутоиммунных процессов происходит разрушение инсулин-продуцирующих β -клеток поджелудочной железы. Обычно это заболевание возникает у лиц в возрасте до 30 лет. С другой стороны, СД2 обусловлен,

главным образом, наличием резистентности к инсулину, и в большинстве случаев сопровождается ожирением и возникает в пожилом возрасте. Основными способами лечения гипергликемии у пациентов, страдающих СД1, и у некоторых пациентов, страдающих СД2, являются введение экзогенного инсулина и регулярный контроль уровня глюкозы крови. Тем не менее, несмотря на возможность сохранить жизнь пациенту, инсулинотерапия не позволяет возобновить нормальную физиологическую регуляцию уровня глюкозы крови и устранить риск опасных гипогликемических состояний и отдаленных осложнений [3]. В течение последних лет, благодаря использованию новых технологий, были достигнуты успехи в разработке таких способов терапии, как инсулин с замедленным высвобождением или инсулиновые насосы (помпы), что позволило значительно улучшить контроль уровня глюкозы в крови и качество жизни у пациентов, страдающих СД. Однако эти методы не позволяют окон-

чательно излечить данное заболевание [4]. Единственным возможным способом излечения при СД является создание нового источника β -клеток, способных осуществлять две ключевые функции: оценку уровня сахаров в крови и зависимую от уровня глюкозы секрецию инсулина.

Замещение одних β -клеток другими β -клетками

Аллогенные клетки взрослого человека

В настоящее время единственным возможным способом излечения пациентов с СД1 является пересадка поджелудочной железы или островков поджелудочной железы. Пересадка цельного органа поджелудочной железы является очень эффективным способом в достижении и поддержании длительного физиологического контроля уровня глюкозы в крови. Однако вследствие различных рисков, связанных с выполнением хирургического вмешательства, данный метод довольно редко используется для лечения СД [5]. В отличие от этого пересадка островков поджелудочной железы требует минимального инвазивного хирургического вмешательства, поскольку она проводится в рамках чрескожного вмешательства под рентгенологическим контролем и заключается во введении препарата, содержащего островковые клетки, в печень реципиента через воротную вену [6]. Функционирующий трансплантат у пациента с СД1 позволяет устранить эпизоды гипогликемии, откорректировать уровень гликированного гемоглобина (HbA_{1c}), уменьшить или полностью устранить риск вторичных осложнений, связанных с данным заболеванием и, в наиболее оптимальных случаях, позволяет достичь независимости от инсулина [7]. Результаты и безопасность процедуры пересадки клеток островков поджелудочной железы постоянно совершенствуются. Согласно данным, представленным в «Общем регистре по пересадке островковых клеток поджелудочной железы» (Collaborative Islet Transplant Registry, CITR) [7], показатель независимости от инсулина в сроки через 3 года после пересадки постоянно улучшается. Он составлял на ранних этапах (1999–2002 гг.) 27%, затем на среднем этапе (2003–2006 года) – 37%, и в последние года (2007–2010 гг.) – 44%. Кроме того в пяти независимых центрах (Эдмонтон, Миннесота, Женева, Милан и Лилль) сообщалось о достижении показателей независимости от инсулина через 5 лет после операции, превышающих 50% [8], что практически соответствует результатам, достигаемым при пересадке всей поджелудочной железы, согласно данным в Международном регистре пересадок поджелудочной железы (International Pancreas Transplant Registry). В настоящее время в целом ряде стран, включая Канаду, Великобританию, Швецию и страны Скандинавии, Швейцарию и Австралию, пересадка β -клеток островков поджелудочной железы полностью переведена из разряда исследуемых технологий в клиническую практику. Тем не менее, в настоящее время процедура пересадки клеток поджелудочной же-

лезы не может считаться стандартным вмешательством по причине двух основных имеющихся проблем: необходимости пожизненной иммуносупрессии (что сопровождается целым рядом нежелательных побочных эффектов) и недостатка возможности забора поджелудочной железы от доноров с сохраненной сердечной деятельностью и констатированной смертью головного мозга. Последние являются единственным возможным источником клеток островков поджелудочной железы человека, пригодных для клинического использования. По этим причинам пересадка клеток островков поджелудочной железы осуществляется только тем пациентам, страдающим СД, у которых, несмотря на тщательно контролируемую инсулинотерапию, наблюдается необъяснимая метаболическая нестабильность, осложняющаяся рецидивирующими эпизодами гипогликемии [9]. В таких случаях возникает особая необходимость в разработке новых стратегий для решения проблемы восстановления эндокринной функции поджелудочной железы у пациентов, страдающих СД. В данной обзорной статье будут обсуждаться многие из интенсивно исследуемых в настоящее время лечебных подходов, в частности пролиферация/регенерация β -клеток, ксенотрансплантация и дифференцировка эмбриональных или полипотентных стволовых клеток (рис. 1).

Ауто трансплантация клеток у взрослых людей (пролиферация β -клеток или трансдифференцирование в условиях *in vivo/ex vivo*)

В отличие от крови, кожи или кишечника, ткани которых характеризуются относительно высокой скоростью смены клеток, β -клетки островков поджелудочной железы являются неактивной популяцией клеток, при этом у однолетних мышей скорость пролиферации этих клеток составляет 0,1–0,3%/сутки [10]. Тем не менее, в недавних исследованиях также было показано, что масса β -клеток находится под динамическим контролем и фактическую массу клеток определяет отношение между репликацией и апоптозом [11, 12]. У человека естественная экспансия пула β -клеток происходит в неонатальном периоде, постепенно угасая в раннем детском возрасте [13]; у взрослых людей усиление репликации β -клеток может происходить при определенных физиологических и патологических состояниях, таких как беременность [14], или при развитии резистентности к инсулину, вызванной ожирением [15]. Таким образом, у пациентов, страдающих СД, можно использовать специальные препараты для увеличения количества β -клеток в условиях *ex vivo* с целью трансплантации, а также можно стимулировать эндогенную клеточную пролиферацию в условиях *in vivo* с целью увеличения пула β -клеток. Фактически, у пациентов, страдающих СД1, регенерация β -клеток наблюдалась как на момент диагностики [16], так и через несколько лет после выявления заболевания [17, 18]. Более того, Y. Дог и соавт. в исследовании с отслеживанием клеточных линий у мышей, наблюдали значительное увеличение митотического индекса β -клеток после легкой травматизации поджелудочной железы путем

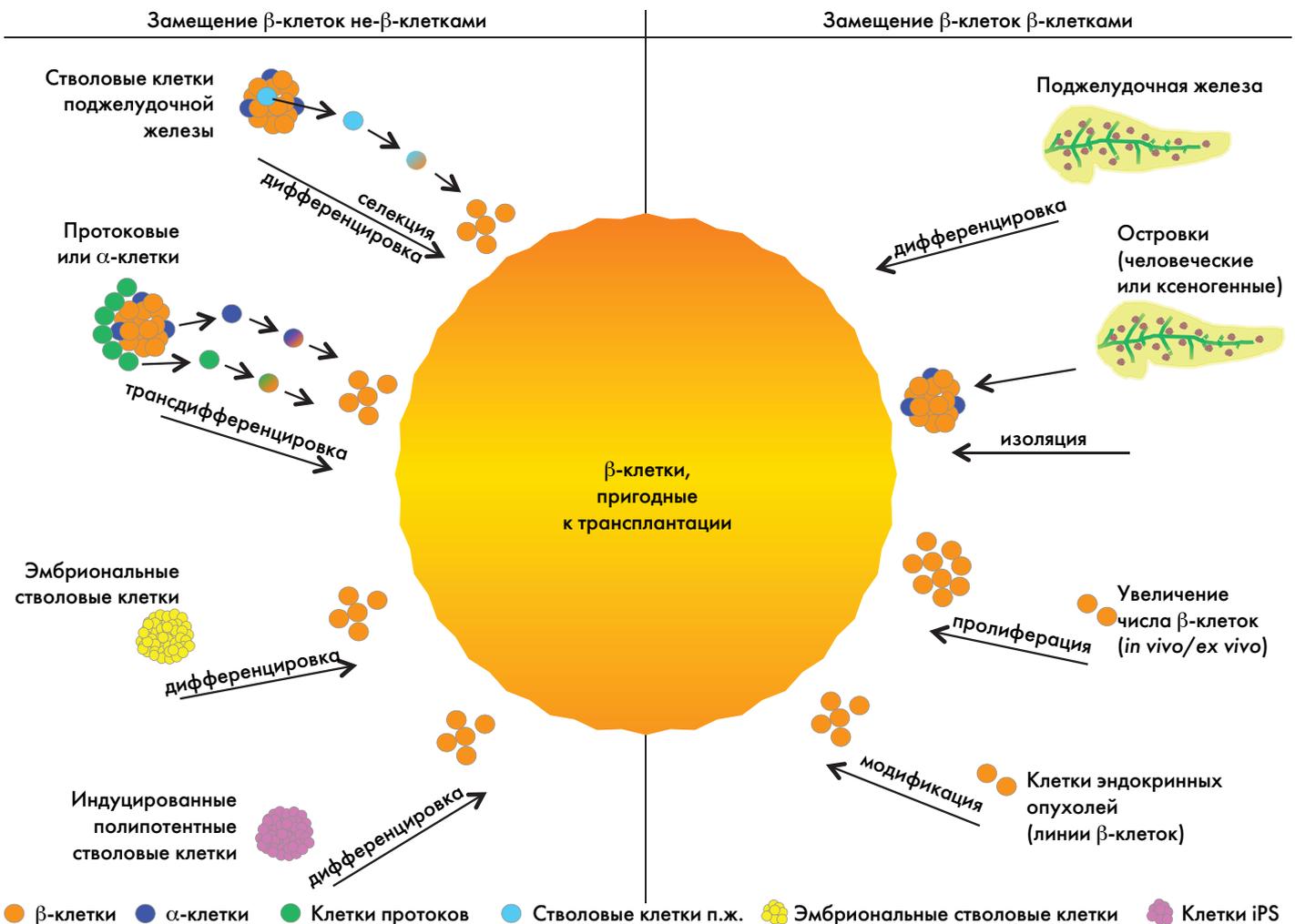


Рис. 1. Экспериментальные подходы к лечению сахарного диабета, направленные на увеличение числа β-клеток в организме пациента.

резекции 50~70% органа [19] или селективной генетической абляции β-клеток [20]. Трансфекция различных молекул, участвующих в регуляции клеточного цикла, таких как *cdks* и циклины в островки поджелудочной железы грызунов и человека в условиях *ex vivo*, приводит к увеличению скорости репликации β-клеток [21, 22], однако длительная экспрессия этих молекул также усиливает и риск онкогенеза. Более безопасным вариантом является добавление в культуру клеток различных ростовых факторов, таких как гормон роста (GH), глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) или фактор роста гепатоцитов (HGF), которые, как известно, способны увеличивать скорость репликации β-клеток у грызунов [23]; но, к сожалению, усиление пролиферации сопровождается потерей β-клетками их основных свойств, таких как способность экспрессировать Pdx-1 или инсулин [24]. Согласно результатам предварительных исследований клинической эффективности, проведенных с участием пациентов, получавших GLP-1, считается, что терапия в условиях *in vivo* с применением аналогов GLP-1 длительного действия (эксенатид или лираглутид), может стимулировать репликацию β-клеток у пациентов, страдающих СД2 [23, 25]. Однако, необходимо получить и отдаленные результаты, доказывающие наличие такого положительного эффекта у пациентов.

Недавно также было показано, что на пролиферацию β-клеток может оказывать влияние новый гормон — бетатрофин, который экспрессируется главным образом в печени и жировой ткани. Кратковременная экспрессия бетатрофина в печени у мышей вызывает значительную пролиферацию β-клеток, увеличение массы β-клеток и улучшает толерантность к глюкозе [26]. Механизм действия бетатрофина у мышей и человека до настоящего времени не изучен, однако возможность применения данного гормона представляет большой интерес.

В области вариантов воздействия на пролиферацию β-клеток также предпринимались попытки генной терапии посредством обратимого встраивания генов, способных продлить жизнеспособность β-клеток. За последние 30 лет был разработан целый ряд β-клеточных линий грызунов [27, 28], и предпринимались многочисленные попытки создать линии β-клеток человека, полученных из различных участков поджелудочной железы, однако эти клетки крайне слабо вырабатывали инсулин, либо эта способность ограничивалась лишь несколькими пассажами клеточной линии [29, 30]. В 2005 г. M. Narushima и соавт. [31] сообщили об успешном создании функционирующей линии β-клеток человека NAKT-15, которая в перспективе должна была позволить осуществлять клеточную терапию при СД, однако с 2005 г. новые со-

общения о применении данной клеточной линии не публиковались. В 2011 г. была разработана еще одна линия β -клеток человека [32] из модифицированных эмбриональных клеток поджелудочной железы с лентивирусным вектором, экспрессирующих SV40LT под контролем инсулинового промотора. Инсулиномы, возникавшие после имплантации мышам SCID, затем преобразовывали с помощью лентивирусного вектора, экспрессирующего обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT) и снова имплантировали другим мышам SCID с целью дальнейшего усиления пролиферации β -клеток. Также была описана еще одна клеточная линия – EndoC- β H1, способная секретировать инсулин в ответ на стимуляцию глюкозой. Данная клеточная линия сохраняла стабильность как минимум при 80 пассажах и экспрессировала многие специфические для β -клеток маркеры, при этом не экспрессируя в значимой степени маркеры других типов клеток поджелудочной железы. Рассматривая вопрос о клиническом использовании, следует сказать о том, что в настоящее время разрабатывается линия β -клеток человека второго поколения с применением методик обратимой «бессмертности» клеток, что позволяет избежать риска, связанного с применением клеток, массивно обработанных генами, потенциально связанными с онкогенезом.

Другая, совершенно отличающаяся точка зрения, заключается в предположении о том, что при таких состояниях, как беременность или ожирение, механизмом, отвечающим за рост числа β -клеток, является неогенез, а не пролиферация. В пользу данного предположения свидетельствует недавно выполненное патологоанатомическое исследование поджелудочной железы человека, взятой в период беременности или после него: Butler AE и соавт. [33] наблюдали увеличение числа новых малых островков, а не усиление репликации β -клеток, увеличение размера островков или изменение выраженности апоптоза. Авторы также наблюдали увеличение числа инсулин-положительных клеток в протоках, что свидетельствует о способности клеток протоков при определенных условиях дифференцироваться в β -клетки или о том, что стволовые/клетки-предшественники поджелудочной железы располагаются в протоках поджелудочной железы. В предыдущих исследованиях клетки, которые расценивались как стволовые клетки поджелудочной железы, также располагались среди экзокринных клеток и эндокринных островков, что говорит о широком распространении этих клеток в поджелудочной железе, а также об отсутствии их точного описания [34]. Эксперименты, в которых крысам выполняли резекцию 90% массы поджелудочной железы, показали наличие выраженной регенеративной способности данного органа у взрослых особей [19, 35]. При этом в недавно выполненном исследовании было показано, что данный тип регенерации согласуется с парадигмой «дифференцировка-повторная дифференцировка», согласно которой зрелые клетки протоков поджелудочной железы дифференцируются с переходом в состояние, подобное состоянию клеток-предшественников, а затем диффе-

ренцируются с формированием любого типа клеток поджелудочной железы, включая β -клетки [36]. В данном исследовании авторы также наблюдали усиленную скорость пролиферации сохранных β -клеток. Следовательно, репликация и неогенез не являются взаимоисключающими процессами, и вносят свой вклад в поддержание необходимой массы пула β -клеток после рождения. Однако в зависимости от вида и возраста особи каждый из этих механизмов может иметь разную степень значимости [37].

Была изучена способность α -клеток служить в качестве возможного источника образования клеток, вырабатывающих инсулин, поскольку у пациентов, страдающих СД, эти клетки сохраняются [38] и наряду с β -клетками являются наиболее многочисленными эндокринными клетками островков. Collombat P. и соавт. недавно установили, что эктопическая экспрессия Pax4 способна форсировать превращение зрелых α -клеток в β -клетки, позволяя вылечить химически индуцированный СД у мышей [39]. Кроме того, F Thorel и соавт. также подтвердили способность α -клеток к дифференцировке, поскольку в экспериментах с использованием модели с селективной аблацией β -клеток с помощью дифтерийного токсина авторы наблюдали возможность спонтанной конверсии α -клеток в новые функционирующие β -клетки [40]. Наличие такой возможности у человека не установлено, а результаты экспериментов с химически-индуцированным СД у низших приматов не выявили способности β -клеток к регенерации [41].

Ксеногенные клетки зародышей или взрослых

Одним из наиболее очевидных способов получения большого количества островков, необходимых для трансплантационной терапии при СД, является использование островков Лангерганса, полученных от других видов. Большинство попыток в данной области было направлено на использование островков поджелудочной железы свиньи, что обусловлено целым рядом причин: 1) поджелудочная железа свиньи, являясь побочным продуктом при производстве свинины, в течение многих лет, до того как был разработан рекомбинантный человеческий инсулин, использовалась в качестве экзогенного источника для получения инсулина; 2) островки поджелудочной железы свиньи осуществляют регуляцию уровня глюкозы в том же физиологическом диапазоне, что и у человека; 3) с помощью технологий, аналогичных тем, что применяются у человека для изоляции клеток островков, можно достичь высокой продуктивности при получении клеток островков свиньи и 4) свиньи пригодны к генетической модификации с целью сделать их островки поджелудочной железы более пригодными для пересадки человеку [42]. Однако широкое применение островковых клеток свиньи у человека ограничивают две основные проблемы. Первая заключается в риске развития сверхострой иммунологической реакции отторжения, поскольку у человека имеются естественные сформированные антитела, реагирующие с сахаридом Галактоза-альфа-1,3-Галактоза (Gal), экспрессируемым

на клетках низших млекопитающих, но не экспрессируемым на клетках человека или обезьян [43], а связывание антител с антигенами Gal приводит практически к немедленной активации системы комплемента, с последующим разрушением трансплантата. Вторая заключается в риске зооноза, поскольку свиные эндогенные ретровирусные геномы последовательности (PERV) в условиях *in vitro* способны вызывать инфицирование различных клеток млекопитающих [44, 45], и данные последовательности могут быть активированы после ксенотрансплантации [46]. Для преодоления проблемы, связанной со сверхострой реакцией иммунологического отторжения, было создано несколько трансгенных свиней, включая свиней, нокаутных по Gal [47], свиней с трансгенной экспрессией в клетках островков поджелудочной железы человеческого белка, регулирующего систему комплемента (hCD46) [48], свиней с трансгенной экспрессией LEA29Y (высокоаффинный вариант ингибитора T-клеточной стимуляции CTLA-4Ig) под контролем свиного гена инсулина [49]. Несмотря на полученные обнадеживающие результаты [50], в настоящее время очевидно, что при ксенотрансплантации требуется применение сильного режима иммуносупрессии [51]. Другой исследуемой в настоящее время стратегией по решению проблемы иммуногенности свиных клеток является микроинкапсуляция островковых клеток: клетки покрывают биологически совместимой мембраной (чаще всего это бария альгинат) и вследствие изменения молекулярной массы под действием капсульного вещества удается скрыть клетки от воздействия иммунной системы хозяина. В 2000 г. Rayat GR и соавт. показали, что инкапсуляция в условиях *in vitro* позволяет защитить островковые клетки новорожденных свиней от цитотоксического воздействия человеческих антител и системы комплемента, а также устранить и СД бестимусных мышей [52]. Были выполнены исследования на низших приматах [53] и исследования с участием людей [54], в которых не осуществлялось экзогенной иммуносупрессивной терапии. Несмотря на многообещающие результаты, полученные при использовании инкапсулированных островковых клеток свиньи, сохраняющих функциональную способность на протяжении 6 месяцев [53] и более [55], остается неясным, сохраняют ли они жизнеспособность и свою функцию в отдаленном периоде. Избежать возможности передачи эндогенной ретровирусной инфекции свиней при пересадке органов и тканей невозможно, поскольку кодирующие последовательности и вирусные элементы в разном количестве присутствуют в ядрах всех клеток свиньи [56]. Однако полученные данные указывают на то, что эти вирусы не представляют собой значимой опасности для лиц, контактирующих с пациентом (например, родственники, медицинский персонал). В других исследованиях по изучению данной проблемы признаков передачи PERVs от клеток свиньи клеткам человека, восприимчивым к этим вирусам в условиях *in vitro*, выявлено не было [57, 58], а также не было выявлено признаков ретровирусной инфекции у пациентов, ранее получав-

ших терапию с использованием тканей свиньи [58, 59]. Эти исследования снижают степень значимости этих проблем, однако для точного определения реального риска передачи PERV реципиентов трансплантата, существует необходимость проведения других доклинических исследований и получения большего опыта в условиях *in vivo*. Таким образом, в последнее время были получены многообещающие результаты в рамках увеличения сроков выживаемости и увеличения безопасности пересаженных островковых клеток свиньи, однако остается ряд нерешенных проблем, таких как создание оптимального трансгенного свиньи-донора, выбор иммуносупрессивных препаратов, инкапсуляция островковых клеток и избежание зооноза.

Замещение β -клеток другими не β -клетками

Дифференцировка эмбриональных стволовых клеток

В настоящее время методика дифференцировки стволовых клеток предоставляет много возможностей для клеточной терапии патологий, таких как СД, вызванных нарушением клеток одного типа. Было исследовано множество типов стволовых клеток [34], но наиболее перспективными считаются эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), поскольку они обладают практически неограниченной пролиферативной способностью и могут дифференцироваться практически в любой тип соматических клеток. Первые попытки дифференцировки ЭСК в β -клетки были обусловлены наличием преимущества в селекции и последующем росте недифференцированных клеток, которые спонтанно экспрессировали инсулин [60] или нестин [61], однако получаемое при этом количество инсулина было очень малым. Значительный шаг вперед был совершен группой Baetge, которая с целью разработки протокола дифференцировки исследовала сигналы, стимулирующие развитие и способные индуцировать органогенез поджелудочной железы в условиях *in vivo*, что в конечном итоге должно было позволить получить из ЭСК человека первые определенные эндодермальные клетки [62], а затем клетки, вырабатывающие инсулин [63]. Используя такой пятиэтапный протокол дифференцировки, который соответствует каждому из этапов формирования поджелудочной железы, авторам удалось достичь формирования примерно 7% клеток, способных вырабатывать инсулин в условиях *in vitro*. Позднее другие две группы исследователей, используя разные условия культивирования клеток, подтвердили данные о том, что ЭСК способны дифференцироваться в инсулин-продуцирующие клетки, хотя и обладают при этом меньшей эффективностью [64–66]. Позднее Baetge и коллеги улучшили свои результаты путем оптимизации протокола *in vitro* дифференцировки и путем трансплантации клеток-предшественников поджелудочной железы, полученных из ЭСК, мышам, так что по истечении трех месяцев в условиях *in vivo* имплантированные клетки дифференцировались в зрелые эндокринные клетки, способные регулировать уровни

глюкозы в крови после предшествующей экспериментальной индукции СД [67]. Та же группа исследователей путем дальнейшей оптимизации протокола дифференцировки для линии ЭСК СуТ49 недавно разработала масштабируемую и стандартизованную систему получения функционально полноценных клеток-предшественников из ЭСК человека [68], что также явилось большим шагом к клинической реализации. Несмотря на значительные успехи, три основные проблемы ограничивают применимость инсулин-продуцирующих клеток, полученных из ЭСК. Прежде всего, вследствие того, что эти клетки полипотентны, недифференцированные клетки в условиях *in vivo* служат источником для развития тератом, и их трансплантация неизбежно приведет к формированию опухоли по причине присутствия некоторого остаточного количества недифференцированных клеток [67]. Было предпринято несколько попыток поиска поверхностных маркеров, которые бы позволили осуществлять селекцию клеток-предшественников поджелудочной железы [69, 70] или удалять только полипотентные клетки [71], однако безопасность селектированных клеток также должна быть дополнительно изучена. Другая нерешенная проблема связана с данными о том, что все клеточные линии ЭСК обладают разной степенью склонности дифференцироваться в направлении клеток поджелудочной железы [72]. В связи с этим для идентификации линий ЭСК, способных облегчить определение генетического соответствия донорских клеток клеткам пациента и, таким образом, не допустить отторжение трансплантата и необходимость пожизненной иммуносупрессии, требуется изучить множество клеточных линий (и соответствующим образом оптимизировать протокол дифференцировки). Последней большой проблемой, которая в значительной степени ограничивает использование ЭСК во многих странах мира, является наличие этических аспектов, связанных с необходимостью разрушения человеческих эмбрионов для получения этих клеточных линий.

Дифференцировка индуцированных полипотентных стволовых клеток

В 2006 г. появилось возможное решение многих проблем, связанных с использованием ЭСК, когда Yamanaka и коллегам посредством форсированной экспрессии 4 генов (ОCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC) удалось перепрограммировать развитие соматических клеток взрослых особей мышей [73] и взрослого человека [74] с формированием индуцированных полипотентных стволовых клеток (iPSC). Эти клетки сохраняют основные свойства ЭСК, такие как полипотентность и способность к самоподдержанию, но при этом предоставляют возможность формирования аутологичных клеток, которые можно использовать для клеточной терапии. Недавно iPSC человека были получены путем перепрограммирования множества типов соматических клеток [75], при этом в результатах многих исследований сообщалось об успешной дифференцировке этих клеток в нейроны, кардиомиоциты, гепатоциты или кровяные

клетки [76]; однако дифференцированные клетки, получаемые из iPSC, также могут быть полезны при *in vitro* моделировании заболевания и/или исследовании препаратов. Таким образом, эти клетки могут служить в качестве альтернативного и более мощного источника стволовых клеток, используемых для лечения различных заболеваний, включая СД1. К. Tateishi и соавт. в 2008 г. впервые сообщили об успешной дифференцировке iPSC, в инсулин-вырабатывающие клетки [77] с использованием четырехэтапного протокола, описанного для дифференцировки ЭСК [64]. Клетки, полученные из iPSC были положительными на С-пептид и глюкагон и реагировали на глюкозу, однако секреция инсулина этими клетками была чрезмерно слабой. Впечатляющие результаты сообщались в нескольких *in vitro* исследованиях, в которых авторы использовали другие протоколы, имитирующие механизмы развития поджелудочной железы в условиях *in vivo*, с целью направления дифференцировки iPSC в β -подобные клетки [78–80]. Клетки, вырабатывающие инсулин, также были получены из iPSC, сформированных в результате перепрограммирования фибробластов двух пациентов, страдающих СД [81], что предоставило возможность не только для осуществления аутотрансплантационной клеточной терапии при СД1, но также и для *in vitro* моделирования данного заболевания. Также клетки iPSC человека удалось получить путем перепрограммирования β -клеток поджелудочной железы и последующей повторной дифференцировки в инсулин-продуцирующие клетки, которые обладали эффективностью, большей, чем эффективность, достигаемая в результате дифференцировки iPSC, полученных в результате перепрограммирования клеток, не являющихся β -клетками того же пациента [82]. Результаты этой работы показывают, что iPSC обладают эпигенетической памятью исходной клетки даже после перепрограммирования, и что не только ЭСК, но и линии клеток iPSC характеризуются разной степенью способности дифференцироваться в β -клетки. Тем не менее, в исследовании, выполненном J.M. Polo и соавт. с использованием клеточных линий iPSC, полученных в результате перепрограммирования различных соматических клеток мышей, было показано, что при первых пассажах iPSC сохраняют временную эпигенетическую память своих соматических клеток-предшественников, что влияет на генную экспрессию и способность к дифференцировке, и что при последующих пассажах этих клеток происходит значительное ослабление этих различий, что свидетельствует о том, что при высоком числе пассажей все линии клеток iPSC обладают равной степенью способности к дифференцировке [83]. Однако, кроме способности к дифференцировке, основной проблемой, связанной с использованием iPSC, является их безопасность. Фактически, кроме онкогенных свойств, обусловленных полипотентностью, использование онкогенов для перепрограммирования, а также тот факт, что онкогены необратимо встраиваются в геном клетки (вследствие использования ретровирусов и лентивирусов) может послужить причиной формиро-

вания злокачественных новообразований. Проводились исследования не интегрирующихся в геном клетки аденовирусных векторов, эписомальных векторов, а также стратегий без использования ДНК [84], однако для этих технологий требуется улучшение эффективности индукции и качества клеток iPSC. Более перспективным является использование химических веществ, которые не вызывают изменений клеточного генома, и способных функционально заменить экзогенные факторы транскрипции [85, 86]. В целом следует сказать, что на клетки iPSC возлагаются большие надежды в рамках клеточной заместительной терапии СД, однако необходимо провести еще целое множество исследований с целью увеличения безопасности и эффективности процессов перепрограммирования и дифференцировки.

Заключение

Попытки излечения СД посредством индукции функционирующих инсулин-продуцирующих клеток никогда не прекращались. Доступность неограниченного количества функционально пригодного трансплантационного материала позволит перевести пересадку островковых клеток из разряда ограниченного метода лечения в разряд более распространенного вмешательства; пересадка человеческих островковых клеток или целой поджелудочной железы не является реальным крупномасштабным решением проблемы, в результате чего в настоящее время исследуются различные подходы с целью решения проблемы сокращения численности доноров органов. Каждая из этих стратегий обладает своими достоинствами и недостатками, и на данном этапе сложно с достаточной точностью определить, какой из методов является наиболее перспективным. Клетки островков

поджелудочной железы свиньи обладают значительным преимуществом, поскольку полностью обладают функциями β -клеток и могут быть получены в значительном количестве, однако требуется решение проблем, связанных с PERV инфекцией и риском развития зооноза. В условиях *in situ* пролиферация β -клеток и/или их регенерация из стволовых клеток поджелудочной железы или α -клеток кажется более приемлемой, поскольку позволяют устранить необходимость иммуносупрессии; кроме того, ожидается, что конечный продукт будет секретировать инсулин глюкозозависимым образом. К сожалению, фактическая эффективность данного способа у человека окончательно доказана не была. В последние годы возрастает интерес к лечению с применением клеток, полученных при дифференцировке стволовых клеток. При этом наиболее перспективным источником стволовых клеток являются ЭСК и iPSC, по причине их способности к бесконечной пролиферации и выдающихся способностей к дифференцировке. Несмотря на то, что iPSC позволяют осуществлять аутотрансплантационную клеточную терапию, этапную систему оптимальной дифференцировки в условиях *in vitro* удалось разработать только для одной линии ЭСК, в связи с чем возможности терапии конкретных пациентов по-прежнему ограничены. Более того, при применении этого типа клеток такой аспект, как безопасность, сохраняет свою критическую роль, поскольку существует риск онкогенеза, что может препятствовать их применению в клинике. Несмотря на наличие таких существенных проблем, в настоящее время существует реальная возможность использования в ближайшем будущем клеточной терапии для лечения СД.

Авторы декларируют отсутствие двойственности (конфликта) интересов при написании данной рукописи.

Список литературы

- Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*. 2011; 94(3):311–321. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2011.10.029>
- Stanekzai J, Isenovic ER, Mousa SA. Treatment options for diabetes: Potential role of stem cells. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2012;98(3):361–368. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2012.09.010>
- Van Belle TL, Coppieters KT, Von Herrath MG. Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. *Physiological Reviews*. 2011;91(1):79–118. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00003.2010>
- Saudek CD, Duckworth WC, Giobbie-Hurder A, Henderson WG, Henry RR, Kelley DE, Edelman SV, Zieve FJ, Adler RA, Anderson JW, Anderson RJ, Hamilton BP, Donner TW, Kirkman MS, Morgan NA. Implantable insulin pump vs multiple-dose insulin for non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized clinical trial. Department of Veterans Affairs Implantable Insulin Pump Study Group. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 1996; 276(16):1322–1327. DOI: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1996.03540160044031>
- Ichii H, Ricordi C. Current status of islet cell transplantation. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*. 2009;16(2):101–112. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00534-008-0021-2>
- Venturini M, Angeli E, Maffi P, Fiorina P, Bertuzzi F, Salvioni M, et al. Technique, Complications, and Therapeutic Efficacy of Percutaneous Transplantation of Human Pancreatic Islet Cells in Type 1 Diabetes: The Role of US1. *Radiology*. 2005;234(2):617–624. DOI: <http://dx.doi.org/10.1148/radiol.2342031356>
- Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, Hering BJ, Wease S, Naziruddin B, et al. Improvement in Outcomes of Clinical Islet Transplantation: 1999–2010. *Diabetes Care*. 2012;35(7):1436–1445. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/dc12-0063>
- Shapiro AMJ. State of the Art of Clinical Islet Transplantation and Novel Protocols of Immunosuppression. *Current Diabetes Reports*. 2011;11(5):345–354. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11892-011-0217-8>
- Bertuzzi F, Verzaro R, Provenzano V, Ricordi C. Brittle type 1 diabetes mellitus. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(16):1739–1744. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/092986707781058922>

10. Teta M, Long SY, Wartschow LM, Rankin MM, Kushner JA. Very Slow Turnover of β -Cells in Aged Adult Mice. *Diabetes*. 2005;54(9):2557–2567. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.54.9.2557>
11. Butler PC, Meier JJ, Butler AE, Bhushan A. The replication of [beta] cells in normal physiology, in disease and for therapy. *Nature clinical practice Endocrinology End metabolism*. 2007;3(11):758–768. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ncpendmet0647>
12. Lipsett M, Aikin R, Castellarin M, Hanley S, Jamal A-M, Laganieri S, et al. Islet neogenesis: A potential therapeutic tool in type 1 diabetes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2006;38(4):498–503. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2005.08.022>
13. Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, Bhushan A, et al. β -Cell Replication Is the Primary Mechanism Subservicing the Postnatal Expansion of β -Cell Mass in Humans. *Diabetes*. 2008;57(6):1584–1594. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/db07-1369>
14. Parsons JA, Bartke A, Sorenson RL. Number and size of islets of Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect of lactogenic hormones. *Endocrinology*. 1995;136(5):2013–2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/en.136.5.2013>
15. Gupta RK, Gao N, Gorski RK, White P, Hardy OT, Rafiq K, et al. Expansion of adult beta-cell mass in response to increased metabolic demand is dependent on HNF-4alpha. *Genes and Development*. 2007;21(7):756–769. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1535507>
16. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Evidence of increased islet cell proliferation in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2010;53(9):2020–2028. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-010-1817-6>
17. Pipeleers D, Ling Z. Pancreatic beta cells in insulin-dependent diabetes. *Diabetes/Metabolism Reviews*. 1992;8(3):209–227. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/dmr.5610080303>
18. Keenan HA, Sun JK, Levine J, Doria A, Aiello LP, Eisenbarth G, et al. Residual Insulin Production and Pancreatic β -Cell Turnover After 50 Years of Diabetes: Joslin Medalist Study. *Diabetes*. 2010;59(11):2846–2853. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/db10-0676>
19. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic [beta]-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*. 2004;429(6987):41–46. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nature02520>
20. Nir T, Melton DA, Dor Y. Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(9):2553–2561. DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI32959>
21. Cozar-Castellano I, Takane KK, Bottino R, Balamurugan AN, Stewart AF. Induction of β -Cell Proliferation and Retinoblastoma Protein Phosphorylation in Rat and Human Islets Using Adenovirus-Mediated Transfer of Cyclin-Dependent Kinase-4 and Cyclin D1. *Diabetes*. 2004;53(1):149–159. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.53.1.149>
22. Fiaschi-Taesch NM, Salim F, Kleinberger J, Troxell R, Cozar-Castellano I, Selk K, et al. Induction of Human β -Cell Proliferation and Engraftment Using a Single G1/S Regulatory Molecule, cdk6. *Diabetes*. 2010;59(8):1926–1936. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/db09-1776>
23. Nauck MA, Kleine N, Ørskov C, Holst JJ, Willms B, Creutzfeldt W. Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7–36 amide) in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*. 1993;36(8):741–744. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00401145>
24. Parnaud G, Bosco D, Berney T, Pattou F, Kerr-Conte J, Donath MY, et al. Proliferation of sorted human and rat beta cells. *Diabetologia*. 2008;51(1):91–100. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-007-0855-1>
25. Rachman J, Barrow BA, Levy JC, Turner RC. Near-normalisation of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in subjects with NIDDM. *Diabetologia*. 1997;40(2):205–211. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s001250050664>
26. Yi P, Park J-S, Melton Douglas A. Betatrophin: A Hormone that Controls Pancreatic β Cell Proliferation. *Cell*. 2013;153(4):747–758. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.008>
27. Gazdar AF, Chick WL, Oie HK, Sims HL, King DL, Weir GC, et al. Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1980;77(6):3519–3523. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.77.6.3519>
28. Hohmeier HE, Newgard CB. Cell lines derived from pancreatic islets. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2004;228(1–2):121–128. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2004.04.017>
29. Levine F, Wang S, Beattie GM, et al. Development of a cell line from the human fetal pancreas. *Transplantation proceedings*. 1995;27:3410.
30. Dufayet de la Tour D, Halvorsen T, Demeterco C, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, Loy M, et al. β -Cell Differentiation from a Human Pancreatic Cell Line in Vitro and in Vivo. *Molecular Endocrinology*. 2001;15(3):476–483. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/me.15.3.476>
31. Narushima M, Kobayashi N, Okitsu T, Tanaka Y, Li S-A, Chen Y, et al. A human [beta]-cell line for transplantation therapy to control type 1 diabetes. *Nature Biotechnology*. 2005;23(10):1274–1282. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1145>
32. Ravassard P, Hazhouz Y, Pechberty S, Bricout-Neveu E, Armanet M, Czernichow P, et al. A genetically engineered human pancreatic beta cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(9):3589–3597. DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI58447>
33. Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, Rizza RA, Corradin A, Cobelli C, et al. Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia*. 2010;53(10):2167–2176. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-010-1809-6>
34. Jones PM, Courtney ML, Burns CJ, Persaud SJ. Cell-based treatments for diabetes. *Drug Discovery Today*. 2008;13(19–20):888–893. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2008.06.014>
35. Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes*. 1993;42(12):1715–1720.
36. Li WC, Rukstalis JM, Nishimura W, Tchpashvili V, Habener JF, Sharma A, et al. Activation of pancreatic-duct-derived progenitor cells during pancreas regeneration in adult rats. *Journal of Cell Science*. 2010;123(Pt 16):2792–2802. DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.065268>
37. Bonner-Weir S, Li WC, Ouziel-Yahalom L, Guo L, Weir GC, Sharma A. Beta-cell growth and regeneration: replication is

- only part of the story. *Diabetes*. 2010;59(10):2340–2348. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/db10-0084>
38. Gianani R. Beta cell regeneration in human pancreas. *Seminars in Immunopathology*. 2011;33(1):23–27. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-010-0235-7>
 39. Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N, et al. The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell*. 2009;138(3):449–462. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.035>
 40. Thorel F, Nepote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, et al. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature*. 2010;464(7292):1149–1154. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08894>
 41. Saisho Y, Manesso E, Butler AE, Galasso R, Kavanagh K, Flynn M, et al. Ongoing beta-cell turnover in adult nonhuman primates is not adaptively increased in streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*. 2011;60(3):848–856. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/db09-1368>
 42. Klymiuk N, Aigner B, Brem G, Wolf E. Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Molecular Reproduction and Development*. 2010;77(3):209–221. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.21127>
 43. Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CL, Macher BA. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(33):17755–17762.
 44. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature Medicine*. 1997;3(3):282–286.
 45. Wilson CA, Wong S, Muller J, Davidson CE, Rose TM, Burd P. Type C Retrovirus Released from Porcine Primary Peripheral Blood Mononuclear Cells Infects Human Cells. *Journal of Virology*. 1998;72(4):3082–3087.
 46. van der Laan LJW, Lockett C, Griffeth BC, Frasier FS, Wilson CA, Onions DE, et al. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature*. 2000;407(6800):90–94.
 47. McKenzie IFC, Koulmanda M, Mandel TE, Sandrin MS. Cutting Edge: Pig Islet Xenografts Are Susceptible to “Anti-Pig” But Not Gal α (1,3)Gal Antibody Plus Complement in Gal o/o Mice. *The Journal of Immunology*. 1998;161(10):5116–5119.
 48. van der Windt DJ, Bottino R, Casu A, Campanile N, Smetanka C, He J, et al. Long-term controlled normoglycemia in diabetic non-human primates after transplantation with hCD46 transgenic porcine islets. *American Journal of Transplantation*. 2009;9(12):2716–2726. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02850.x>
 49. Klymiuk N, van Buerck L, Bahr A, Offers M, Kessler B, Wuenesch A, et al. Xenografted islet cell clusters from INSLEA29Y transgenic pigs rescue diabetes and prevent immune rejection in humanized mice. *Diabetes*. 2012;61(6):1527–1532. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/db11-1325>
 50. Eksler B, Ezzelarab M, Hara H, van der Windt DJ, Wijkstrom M, Bottino R, et al. Clinical xenotransplantation: the next medical revolution? *The Lancet*. 379(9816):672–683. DOI: [http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61091-X](http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61091-X)
 51. Hering BJ, Wijkstrom M, Graham ML, Hardstedt M, Aasheim TC, Jie T, et al. Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates. *Nature Medicine*. 2006;12(3):301–303. DOI: http://dx.doi.org/http://www.nature.com/nm/journal/v12/n3/supinfo/nm1369_S1.html
 52. Rayat GR, Rajotte RV, Ao Z, Korbitt GS. Microencapsulation of neonatal porcine islets: protection from human antibody/complement-mediated cytotoxicity in vitro and long-term reversal of diabetes in nude mice. *Transplantation*. 2000;69(6):1084–1090.
 53. Dufrane D, Goebbels RM, Gianello P. Alginate macroencapsulation of pig islets allows correction of streptozotocin-induced diabetes in primates up to 6 months without immunosuppression. *Transplantation*. 2010;90(10):1054–1062. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e3181f6e267>
 54. Elliott RB, Escobar L, Tan PL, Muzina M, Zwain S, Buchanan C. Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2007;14(2):157–161. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3089.2007.00384.x>
 55. Sun Y, Ma X, Zhou D, Vacek I, Sun AM. Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;98(6):1417–1422. DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI118929>
 56. Takeuchi Y, Fishman J. Long life with or without PERV. *Xenotransplantation*. 2010;17(6):429–430. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3089.2010.00614.x>
 57. Langford GA, Galbraith D, Whittam AJ, McEwan P, Fernandez-Suarez XM, Black J, et al. In vivo analysis of porcine endogenous retrovirus expression in transgenic pigs. *Transplantation*. 2001;72(12):1996–2000.
 58. Elliott RB, Escobar L, Garkavenko O, et al. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts. *Cell transplantation*. 2000;9(6):895–901.
 59. Tacke SJ, Bodusch K, Berg A, Denner J. Sensitive and specific immunological detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2001;8(2):125–135. DOI: <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-3089.2001.00080.x-i1>
 60. Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*. 2000;49(2):157–162. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.49.2.157>
 61. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*. 2001;292(5520):1389–1394. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1058866>
 62. D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nature Biotechnology*. 2005;23(12):1534–1541. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1163>
 63. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*. 2006;24(11):1392–1401. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1259>
 64. Jiang J, Au M, Lu K, Eshpeter A, Korbitt G, Fisk G, et al. Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2007;25(8):1940–1953. DOI: <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2006-0761>
 65. Jiang W, Shi Y, Zhao D, Chen S, Yong J, Zhang J, et al. In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Research*. 2007;17(4):333–344. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2007.28>

66. Chen S, Borowiak M, Fox JL, Maehr R, Osafune K, Davidow L, et al. A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nature Chemical Biology*. 2009;5(4):258–265. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.154>
67. 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. *Nature Biotechnology*. 2008;26(4):443–452. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1393>
68. Schulz TC, Young HY, Agulnick AD, et al. (2012) A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS one* 7:e37004.
69. Kelly OG, Chan MY, Martinson LA, Kadoya K, Ostertag TM, Ross KG, et al. Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*. 2011;29(8):750–756. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1931>
70. Jiang W, Sui X, Zhang D, Liu M, Ding M, Shi Y, et al. CD24: a novel surface marker for PDX1-positive pancreatic progenitors derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2011;29(4):609–617. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/stem.608>
71. Ben-David U, Gan QF, Golan-Lev T, Arora P, Yanuka O, Oren YS, et al. Selective elimination of human pluripotent stem cells by an oleate synthesis inhibitor discovered in a high-throughput screen. *Cell Stem Cell*. 2013;12(2):167–179. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.015>
72. Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitzgerald CS, Sato Y, et al. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nature Biotechnology*. 2008;26(3):313–315. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1383>
73. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663–676. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
74. 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;131(5):861–872. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
75. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes and Development*. 2010;24(20):2239–2263. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1963910>
76. Wu SM, Hochedlinger K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nature Cell Biology*. 2011;13(5):497–505. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb0511-497>
77. Tateishi K, He J, Taranova O, Liang G, D'Alessio AC, Zhang Y. Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(46):31601–31607. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M806597200>
78. Zhang D, Jiang W, Liu M, Sui X, Yin X, Chen S, et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Research*. 2009;19(4):429–438. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2009.28>
79. Alipio Z, Liao W, Roemer EJ, Waner M, Fink LM, Ward DC, et al. Reversal of hyperglycemia in diabetic mouse models using induced-pluripotent stem (iPS)-derived pancreatic beta-like cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(30):13426–13431. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1007884107>
80. Thatava T, Nelson TJ, Edukulla R, Sakuma T, Ohmine S, Tonne JM, et al. Indolactam V/GLP-1-mediated differentiation of human iPS cells into glucose-responsive insulin-secreting progeny. *Gene Therapy*. 2011;18(3):283–293. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2010.145>
81. Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, et al. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(37):15768–15773. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0906894106>
82. Bar-Nur O, Russ HA, Efrat S, Benvenisty N. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell*. 2011;9(1):17–23. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2011.06.007>
83. Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*. 2010;28(8):848–855. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1667>
84. Okano H, Nakamura M, Yoshida K, Okada Y, Tsuji O, Nori S, et al. Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circulation Research*. 2013;112(3):523–533. DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.256149>
85. Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, et al. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell*. 2009;5(5):491–503. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2009.09.012>
86. Zhu S, Li W, Zhou H, Wei W, Ambasudhan R, Lin T, et al. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell*. 2010;7(6):651–655. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2010.11.015>

Пеллегрини С. (Pellegrini S.)

Исследовательский институт сахарного диабета, госпиталь Сан-Раффаэле, Милан, Италия, Университет Инсубрия, Варезе, Италия
(Diabetes Research Institute, Ospedale San Raffaele, Milano, Italy, Università degli Studi dell'Insubria, Varese, Italy)

Сорди В. (Sordi V.)

Исследовательский институт сахарного диабета, госпиталь Сан-Раффаэле, Милан, Италия
(Diabetes Research Institute, Ospedale San Raffaele, Milano, Italy)

Пьемонти Л. (Piemonti L.)

Исследовательский институт сахарного диабета, госпиталь Сан-Раффаэле, Милан, Италия
(Diabetes Research Institute, Ospedale San Raffaele, Milano, Italy)

E-mail: piemonti.lorenzo@hsr.it