УДК 57.08

Агаева Марианна Викторовна
студентка 6 курса
лечебный факультет
Северо-Осетинская государственная медицинская академия,
Россия, Владикавказ

Хинчагова Оксана Андреевна
студентка 6 курса
лечебный факультет
Северо-Осетинская государственная медицинская академия,
Россия, Владикавказ
e-mail: hinch.o.a@yandex.ru

ВИРУСНЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИПСК

Аннотация: *Получение человеческих индуцированных плюрипотентных клеток стало возможным с 2007 года, когда были использованы вирусные векторы для интеграции факторов Яманаки Oct3/4, Sox2, Nanog, and Lin28, запускающие процесс обратного развития клеток. Были различные препятствия в более масштабном исследовании и использовании этих клеток, в результате чего шел поиск более эффективного вирусного способа получения иПСК. РНК-вирус Сендай дал возможность приблизиться к желаемому результату, но многие вопросы все еще открыты.*

Ключевые слова: ИПСК, современные методы, клеточная инженерия, биотехнологии.

Agayeva Marianna Viktorovna
6th year student
Faculty of Medicine
North Ossetian State Medical Academy,
Russia, Vladikavkaz

Khinchagova Oksana Andreevna
6th year student
Faculty of Medicine
North Ossetian State Medical Academy,
Russia, Vladikavkaz

VIRAL METHODS FOR OBTAINING iPSCs

The production of human induced pluripotent cells has been possible since 2007, when viral vectors were used to integrate the Yamanaka factors Oct3/4, Sox2,

Nanog, and Lin28, which trigger the process of cell regression. There have been various obstacles in the larger scale research and use of these cells, resulting in a search for a more efficient viral method for obtaining iPSCs. The Sendai RNA virus made it possible to get closer to the desired result, but many questions are still open.

В наше время уже существует достаточно большой объём стратегий и методов, но начало положило улучшение уже имеющегося способа. Так в 2007 году, группа исследователей получила человеческие иПСК посредством векторной интеграции факторов Oct3/4, Sox2, Nanog, and Lin28[1, с. 1-4]. Нужно сказать, что используемый при этом ретровирусный вектор имел ряд недостатков, таких как интеграция в геном клетки хозяина, но зато было возможно клонирование больших последовательностей РНК. Неконтролируемая интеграция вирусного генома может вызвать нестабильность генома [2, с. 101-106], а также ряд ненужных и неисправимых изменений (мутагенез), таких как тератомы, на основе чего разработали анализ тератомы. В процессе, которого недифференцированные иПСК вводятся иммунодефицитной мыши и развиваются в гетерогенную опухоль, которая состоит из терминально дифференцированных клеток, представляющих все три зародышевых листка. Эта процедура может быть длительной, достаточно дорогостоящей, а используемые методологии и анализы непоследовательны. На данный момент начали использовать для моделирования болезней in vitro - иПСК, полученные в ходе трансдукции фибробластов кожи ретровирусным вектором, при этом клетки были взяты у людей страдающих синдромом Вильямса-Бёрена, таким же методом получили клетки для исследования такого заболевания как адренолейкодистрофия [1, с. 1-4].

Если говорить о лентивирусных векторах, то они считаются малоподходящими для доставки *in vivo*, потому что неоднократно увеличивают риск инсерционного мутагенеза, то есть мутационное изменение генетического аппарата вследствие вставок нуклеотидных последовательностей вирусов. Лентивирусное инфицирование выполняется с помощью вектора, содержащего все четыре фактора репрограммирования. Здесь преимуществом является

использование одного лентивирусного вектора, который повышает эффективность перепрограммирования, вместо использования пула из нескольких ретровирусов. Но данный метод все равно остается наиболее эффективным методом изучения репрограммирования плюрипотентности человека и нужно сказать, что производство ИПСК более эффективно и стабильно, когда осуществляется в среде с определенным химическим составом.

По результатам предыдущих исследований стали интересоваться более щадящими методами - неинтегрирующие аденовирусы, которые смогли снизить риск канцерогенеза, но кратковременной экспрессии трансгена (5-10 сут.), которая наступила из-за иммунного ответа организма-реципиента, такой способ не привел к обширному применению. Для решения этой проблемы было создано второе поколение аденовирусных векторов, у которых вместе с геном *E1* удалили еще гены, которые отвечали за ауторепродукцию (удвоение) вируса и оставили только элементы, определяющие начало и конец генома и вирусную пакующую последовательность. Такие векторы оказались способны к более длительной экспрессии генов, а что касается полученных иПСК, то они не несли в себе трансгенов, которые могут вызывать злокачественную трансформацию [3, с. 188-202], что делает этот способ уже более выгодным, нежели первоначальная стратегия Яманаки. Сейчас считается, что инфекция плюрипотентных стволовых клеток аденовирусным вектором в одноклеточной суспензионной культуре может привести к высокой эффективности переноса генов с низкой цитотоксичностью без потери недифференцированного состояния плюрипотентных стволовых клеток. Вектор Ad был идентифицирован как самый эффективный среди векторов, протестированных для обнаружения недифференцированных hiPSC. Со слов автора, этот вектор убивал большинство hiPSC-NPC зависимым от iCasp9 (индуцибельная каспаза 9 – суицидный ген) образом, позволяя проточной цитометрии обнаруживать недифференцированные hiPSC. Эти данные показывают, что вектор Ad выборочно устраняет hiPSC-NPC (нервных клеток-предшественников), в результате чего обеспечивая чувствительное обнаружение hiPSC.

Помимо этого были использованы аденоассоциированные векторы, минус которых состоял в небольшой емкости вектора (не более 5 тыс. пар оснований), зато с помощью этого метода можно интегрировать целевой ген в геном хозяина в нужное место, что предотвращает или лучше сказать уменьшает риск мутации, помимо этого возможно встраивание как в делящиеся, так и в покоящиеся клетки, что снижает оббьем времени затраченного на исследование, ну и в конец широкий профиль трансдукции с низким иммунным ответом, а также сильная и устойчивая экспрессия трансгена делает этот способ довольно хорошей базой для последующих исследований. На данный момент метод можно считать генетически выгодным и безопасным, его стали применять изначально для лечение наследственных дистрофий сетчатки, а затем для эффективной трансдукции органоидов сетчатки человека.

Помимо этого новые варианты с модифицированными последовательностями капсида были разработаны для улучшения трансдукции и преодоления ограничений, существующих в естественных вариантах. В принципе нужно сказать, что вирусные способы намного выгоднее в совей перспективе, нежели метод Яманаки с использование 4 основных факторов, исходя хотя бы исходя из эффективности, где около 0,001% входных клеток на основе белков, а у вирусных стратегий это около 0,01% входных клеток.

В ходе поиска «лучшего» вирусного метода был выявлен как способ и представлен РНК-вирус Сендай, который не проникал в ядро клетки-хозяина и не встраивается в его геном, причем мог легко быть удален методом негативной селекции антителами или инкубацией культуры клеток при повышенной температуре. Вирус от тепла погибает, при этом клеткам, которые уже преобразовались в иПСК, такая обработка не вредит. Отличается этот способ от тех же ретровирусных и эписомных векторов тем, что не наблюдалось дефектных клонов, которые были бы не способны к дифференцировке. Вирус Сендай является одним из наиболее подходящих и безопасных кандидатов для подобных процедур притом, что общая эффективность получения иПСК составляет около 0,1 % от вирусных способов получения иПСК, а в случае вируса

Сендай это 1%. Данный метод послужил началом для получения SkM-клетки (SkM - скелетные мышцы) с 80% -ной положительностью MHC и чувствительностью к электрической стимуляции. Также использовали вируса Сендай как систему доставки для создания иПСК из мононуклеарных клеток периферической крови пациента мужского пола, имеющего гетерозиготную мутацию UQCRC1 p.Y314S, в результате чего была создана платформу для дальнейших исследований паркинсонизма и полинейропатии, связанных с UQCRC1 [4, с. 1-4]. Помимо этого иПСК полученные данным способом стали использовать для понимания патофизиологии болезни Паркинсона и как платформу для скрининга лекарств.

«Идеального» метода получения иПСК с помощью вирусных векторов так и нет, хоть имеет преимущества метода Яманаки Синьи. Каждый несет в себе риски, вследствие чего, например, при высоком риске инсерционного мутагенеза вирусную трансдукцию все чаще заменяют невирусными методами для создания индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

Эту «вирусную» проблему решают и до сих пор, к примеру, в 2020 году было опубликовано исследование, где с помощью индуцибельной системы экспрессии генов, которая использует оперон p-cmt, за счет которого стало возможно создание индуцированных мышами иПСК. Клетки E6E7-MEF эмбрионального фибробласта мыши (MEF) трансфицировали одним вектором переключения гена, обеспечивающим сопутствующую экспрессию Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 и Gfp [5, с. 1-4].

Список литературы:

1. Юдзи Курамоти, Томоная Авая и др. Создание двух индуцированных человеком линий плюорипотентных стволовых клеток, полученных от двух пациентов с Х-сцепленной адренолейкодистрофией с мутациями ABCD1 // Sciencedirect. 2021. С. 1-4.

2. Масато Накагава и др. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток Мус из фибробластов мыши и человека // Nature biotechnology. 2008. С. 101-106.

3. Юин-Хан Ло, Джимми Чен Ян и др. Иссечение вирусной кассеты репрограммирования путем доставки синтетической мРНК Cre // PMD. 2012. С. 188-202.

4. Чжи-Синь Оу-Ян, и др. Создание линии индуцированных человеком плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) (IBMS-iPSC-057-05) от пациента с семейным паркинсонизмом и полинейропатией,имеющего гетерозиготную мутацию p.Y314S в гене UQCRC1 // Sciencedirect. 2020. С. 1-4.

5. Сугуру Сато и др. Генерация ИПСК мыши с использованием индуцируемой экспрессии трансгенов с помощью генного переключателя кумата // Sciencedirect. 2020. С. 1-4.