

## ПОЛУЧЕНИЕ ИНСУЛИН-ПРОДУЦИРУЮЩИХ КЛЕТОК ИЗ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК



Л. А. Можейко

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

*В обзоре обсуждается проблема получения инсулин-продуцирующих клеток из эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Проанализированы результаты исследований крупных научных центров и лабораторий, работающих в этом направлении. Подробно рассмотрены сложные аспекты дифференцировки стволовых клеток в функционально зрелые инсулин-продуцирующие клетки. Показана необходимость дальнейшей оптимизации технологий их получения с целью использования генерированных клеток в клинической практике.*

**Ключевые слова:** инсулин-продуцирующие клетки, эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, сахарный диабет.

**Для цитирования:** Можейко Л. А. Получение инсулин-продуцирующих клеток из эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток / Л. А. Можейко // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2021. Т. 19, № 4. С. 376-381. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2021-19-4-376-381>.

### Введение

Сахарный диабет – одно из самых распространенных хронических заболеваний среди населения большинства стран мира. Предполагается, что к 2035 г. число заболевших им людей достигнет 592 млн [1]. Прогрессирующее снижение и окончательная утрата функции  $\beta$ -клеток эндокринных островков лежит в основе патогенеза сахарного диабета, в связи с чем восполнение  $\beta$ -клеток – основная задача при лечении заболевания. В отличие от ряда других органов, вопрос о наличии в поджелудочной железе взрослого организма тканевых источников, за счет которых может произойти регенерация эндокринных клеток, остается нерешенным. В течение многих лет учеными прилагаются огромные усилия по разработке методов с целью замещения инсулин-продуцирующих клеток островков Лангерганса. Трансплантация донорской поджелудочной железы показала, что это оперативное вмешательство может избавить пациентов от введения инсулина на протяжении нескольких лет, но сопряжено с необходимостью пожизненной иммуносупрессивной терапии, серьезными осложнениями и высокой смертностью [2]. В настоящее время в ряде стран Европы и Северной Америки введена в клиническую практику трансплантация изолированных островков Лангерганса, чему особенно способствовало внедрение Эдмонтонского протокола [3]. Однако недостаточное количество донорских эндокринных островков и проблемы, возникающие при трансплантации, ограничивают использование данного метода. Поиск источников для получения инсулин-продуцирующих клеток ведется в крупнейших мировых научных центрах и лабораториях по нескольким направлениям. В литературе обсуждается получение этих клеток путем дифференцировки стволовых эмбриональных или индуцированных плюрипотентных клеток, дифференцировки панкреатических прогениторных клеток, трансдифференцировки клеток других типов (ацинарных, печёночных и др.)

и увеличения количества собственных  $\beta$ -клеток пациента [4, 5]. Более перспективными в качестве объекта для терапии сахарного диабета рассматриваются инсулин-продуцирующие клетки, полученные в результате перепрограммирования стволовых (прогениторных) клеток [6, 7]. В образовании инсулин-секреторных  $\beta$ -подобных клеток достигнут значительный прогресс, что вселяет надежду на возможность их использования в будущем при лечении сахарного диабета [8, 9].

**Цель обзора:** анализ современных научных данных о возможностях получения инсулин-продуцирующих клеток из эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и перспективах их использования.

### Генерация инсулин-продуцирующих клеток из эмбриональных стволовых клеток

Выделение и культивирование стволовых клеток из клеточной массы эмбрионов человека открыло большие перспективы для регенеративной медицины [10]. Такие признаки эмбриональных стволовых клеток, как высокая пролиферация, низкая специализация и способность к дифференцировке в любой функциональный тип клеток, позволяют получить из них неограниченный и долгоживущий источник специализированных  $\beta$ -клеток, не требующий поиска донора. В первых попытках дифференцировки эмбриональных стволовых/прогениторных клеток в островковые клетки удалось получить небольшую популяцию клеток поджелудочной железы, экспрессирующих низкое количество инсулина [11].

Результаты последующих экспериментов на мышах показали, что генерация  $\beta$ -клеток из стволовых эмбриональных клеток *in vitro* – трудный и длительный процесс, требующий особых условий культивирования клеток и применения специфических сигналов, стимулирующих их развитие в нужном направлении [12]. Значительный прогресс осуществила группа ученых,

которым удалось получить инсулин-продуцирующие клетки из эмбриональных стволовых клеток человека, используя 5-этапную дифференцировку, основанную на онтогенезе поджелудочной железы (дефинитивная энтодерма, передняя кишка, задняя кишка, энтодерма поджелудочной железы) [13]. Исследования показали, что полученные *in vitro* клетки экспрессируют транскрипционный фактор PDX1 и способны вырабатывать инсулин в количестве, сходном с таковым в  $\beta$ -клетках островков плода, однако не зависящем от уровня гликемии. Это означает, что механизм регуляции уровня секреции инсулина не сформирован и генерированные  $\beta$ -клетки являются незрелыми, из-за чего такие клетки не подходят для заместительной терапии [8]. Изменение условий культивирования в аналогичных экспериментах других ученых также не позволило получить зрелые клетки [14]. В результате поисков был разработан протокол исследования, предусматривающий возможность *in vitro* индуцировать дифференцировку эмбриональных стволовых клеток человека в панкреатические клетки-предшественники, соответствующие панкреатической ткани 6-9-недельного плода, с последующей их трансплантацией в организм мышей. Это позволило продолжить процесс созревания клеток до нормального уровня функционирования [15]. Усовершенствование методов дифференцировки эмбриональных стволовых клеток способствовало созданию стандартизированной схемы получения функционально зрелых клеток [16]. Однако для их использования в клинической практике необходимо решение проблемы антигенной несовместимости и этической, связанной с разрушением человеческих эмбрионов для взятия материала.

### **Генерация инсулин-продуцирующих клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток**

Более перспективным объектом для клеточной терапии при повреждении островкового аппарата поджелудочной железы вступают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Они были получены в 2006 г. благодаря внедрению в зрелые соматические клетки мышей, а затем человека 4 генов, кодирующих следующие факторы транскрипции OCT4, KLF4, c-MYC, SOX2 [17, 18]. За это важное открытие S. Yamanaka удостоен Нобелевской премии в области физиологии и медицины (2012 г.). Многие зрелые клетки были трансформированы в плюрипотентные стволовые клетки, которые по таким свойствам, как полипотентность и способность к самоподдержанию, аналогичны эмбриональным стволовым клеткам, но при этом дают возможность генерации аутологичных специфических клеток. Репрограммирование развития соматических клеток взрослых особей можно добиться с помощью генетической модификации, путем подбора селективных сред или их сочетанием. В первом сообщении об успешной дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в ин-

сулин-секретирующие клетки использовался 4-этапный способ, предложенный для дифференцировки эмбриональных стволовых клеток [19]. Однако секреция инсулина полученными клетками была крайне низкой. Многочисленные клеточные и генетические исследования на экспериментальных животных способствовали усовершенствованию способа [20-22]. Для усиления действия индукторов применяли прямое введение в клетку белков или соответствующих генов, микроРНК и других агентов. Эффективность дифференцировки оценивалась по уровню экспрессии основных маркерных генов – PDX1, INS1, SDX17, NGN3 и других. Критерием функционально зрелой  $\beta$ -клетки считается ее способность синтезировать и секретировать инсулин в ответ на стимуляцию глюкозой. Однако не все протоколы исследований способствовали получению зрелых инсулин-продуцирующих клеток. В 2014 г. опубликованы способы, с помощью которых удалось получить *in vitro* инсулин-продуцирующие клетки путем последовательного многостадийного воздействия на индуцированные полипотентные стволовые клетки факторов клеточной дифференцировки, воспроизводящих регуляторные механизмы формирования  $\beta$ -клеток при эмбриональном развитии [23]. По способности выделять инсулин, изменять его уровень при увеличении концентрации глюкозы в среде полученные клетки были чрезвычайно близки к зрелым. В них наблюдали экспрессию генов PDX1 и NKX6.1. Эксперименты *in vivo* подтвердили способность этих клеток регулировать уровень глюкозы в крови животных с экспериментальным диабетом [24]. Представлено детальное описание больших и малых молекул, индуцирующих процесс дифференцировки плюрипотентных клеток в  $\beta$ -клетки [25]. Установлено, что эффективность панкреатической дифференцировки повышается в условиях трехмерного (3-D) клеточного культивирования [26, 27]. Однако сравнительная характеристика инсулин-продуцирующих клеток, полученных вследствие использования разных способов, показала, что в экспериментах *in vivo* не всегда достигается желаемый эффект из-за несоответствия этих клеток необходимым функциональным требованиям [28].

Впечатляющие результаты продемонстрировали американские ученые из Калифорнийского университета в Сан-Франциско, которым удалось создать эндокринные островки в лабораторных условиях [29]. Они разделили дифференцирующиеся стволовые клетки, преобразовав в островковые скопления – кластеры, что ускорило их развитие. Предполагается, что кластеризация эндокринных клеток стимулирует метаболическое созревание: окислительное дыхание в митохондриях – центральный процесс для обеспечения секреции в зрелых  $\beta$ -клетках. После пересадки полученных клеток здоровым мышам они стали реагировать на уровень сахара в крови так же, как зрелые инсулин-продуцирующие клетки. Ученые из университета Вашингтона в Сент-Луисе улучшили метод культиви-

рования  $\beta$ -клеток поджелудочной железы из стволовых клеток человека, адаптировав его к более общепринятым и традиционным условиям плоскостного культивирования [30]. Они показали, что искусственное изменение состояния цитоскелета не только направляет стволовые клетки на необходимый путь развития, но и усиливает эффективность полученных инсулин-секретируемых  $\beta$ -клеток при их пересадке мышам с тяжелой формой диабета, быстрее нормализуя метаболизм глюкозы. Путем использования метода одиночно-клеточного (single-cell) транскриптомного анализа, проведенного в шести стадиях дифференцировки эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток *in vitro* и *in vivo* в течение 6 месяцев после их пересадки мышам, показано, что после трансплантации экспрессия многих генов клеточной зрелости, включая MAFA, GPC2, MVX1, JMS, увеличивается [31].

Результаты исследований представляют доказательную базу для использования этих достижений в лечении диабета у людей. В то же время они свидетельствуют, что дифференцировка инсулин-продуцирующих клеток из эмбриональных или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток – длительный и сложный процесс, требующий создания идеально эффективной технологии, учитывающей комбинацию нужных условий среды, вводимых веществ и очередность их добавления [31]. Причем для формирования иммунной толерантности необходима многоэтапная система оптимальной дифференцировки для всех линий стволовых клеток. В ряде исследований для перепрограммирования стволовых клеток используются неинтегрированные в

геном векторные системы, неинтегрированные эписомальные конструкции, трансдукционные белки и малые химические агенты. Однако даже при успешном получении достаточного количества инсулин-продуцирующих аутологичных клеток их трансплантация с целью лечения сахарного диабета 1 типа может сопровождаться аутоиммунной реакцией организма. Чтобы отказаться от иммуносупрессивной терапии, предлагаются разные варианты защиты пересаженных клеток: покрытие специальным гидрогелем, создание особых устройств для вживления внутрь тела в биологически совместимой оболочке, использование методики редактирования генома CRISPR для изменения стволовых клеток и другие [32, 33]. При этом следует учитывать главную опасность трансплантируемых клеток – риск возникновения опухолевых заболеваний. В настоящее время продолжается разработка разных технологий, способных обеспечить выживаемость трансплантата и безопасность для реципиента.

### Заключение

Таким образом, для перспективного использования эмбриональных стволовых клеток или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в качестве объектов получения инсулин-продуцирующих клеток с целью последующей трансплантации человеку в случае поражения эндокринного аппарата поджелудочной железы необходимы дальнейшие исследования, которые позволят разработать способ для генерации больших количеств  $\beta$ -клеточной культуры с защитой от иммунного отторжения и онкогенеза.

### Литература

1. IDF diabetes atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040 / K. Ogurtsova [et al.] // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2017. – Vol. 128. – P. 40-50. – doi: 10.1016/j.diabres.2017.03.024.
2. Ryan, E. A. Current indications for pancreas or islet transplant / E. A. Ryan, D. Bigam, A. M. J. Shapiro // *Diabetes Obes. Metab.* – 2006. – Vol. 8, № 1. – P. 1-7. – doi: 10.1111/j.1463-1326.2004.00460.x.
3. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010 / F. Barton [et al.] // *Diabetes Care.* – 2012. – Vol. 35, № 7. – P. 1436-1445. – doi: 10.2337/dc12-0063.
4. Дедов, И. И. Современные возможности применения стволовых клеток при сахарном диабете / И. И. Дедов, И. А. Лисуков, Д. Н. Лаптев // *Сахарный диабет.* – 2014. – № 2. – С. 20-28. – doi: 10.14341/DM2014220-28.
5. Nostro, M. C. Generation of beta cells from human pluripotent stem cells: potential for regenerative medicine / M. C. Nostro, G. Keller // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2012. – Vol. 23, № 6. – P. 701-710. – doi: 10.1016/j.semcdb.2012.06.010.
6. Пеллигрини, С. Замещение  $\beta$ -клеток поджелудочной железы при сахарном диабете / С. Пеллигрини, В. Сорди, Л. Пьемонти // *Сахарный диабет.* – 2013. – № 3. – С. 11-20.
7. Chhabra, P. Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: from hype to hope / P. Chhabra, K. L. Brayman // *Stem Cells* *Transl. Med.* – 2013. – Vol. 2 (5). – P. 328-336. – doi: 10.5966/sctm.2012-0116.
8. Тронько, Н. Д. Достижения регенеративной медицины в терапии сахарного диабета 1 типа. I. Источники получения  $\beta$ -клеток / Н. Д. Тронько, И. П. Пастер // *Эндокринология.* – 2012. – Т. 17, № 2. – С. 66-73.
9. Research status and prospect of stem cells in the treatment of diabetes mellitus / X. Liu [et al.] // *Sci. China Life Sci.* – 2013. – Vol. 56 (4). – P. 306-312. – doi: 10.1007/s11427-013-4469-1.
10. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts / J. A. Thomson [et al.] // *Science.* – 1998. – Vol. 282 (5391). – P. 1145-1147. – doi: 10.1126/science.282.5391.1145.
11. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice / B. Soria [et al.] // *Diabetes.* – 2000. – Vol. 49, № 2. – P. 157-162. – doi: http://dx.doi.org/10.1038/nbt1259.
12. Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells: an *in vitro* model to study islet differentiation / B. W. Kahan [et al.] // *Diabetes.* – 2003. – Vol. 52 (8). – P. 2016-2021. – doi: 10.2337/diabetes.52.8.2016.
13. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells / K. A. D'Amour [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 1392-1401.
14. A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage / S. Chen [et al.] // *Nat.*

- Chem. Biol. – 2009. – Vol. 5, № 4. – P. 258-265. – doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.154>.
15. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo / E. Kroon [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 26, № 4. – P. 443-452. – doi: 10.1038/nbt1393.
  16. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells / T. C. Schulz [et al.] // *PloS One.* – 2012. – Vol. 7. – P. e37004. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037004>.
  17. Takahashi, K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors / K. Takahashi, S. Yamanaka // *Cell.* – 2006. – Vol. 126, № 4. – P. 663-676. – doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
  18. Abdelalim, E. M. Advances and challenges in the differentiation of pluripotent stem cells into pancreatic  $\beta$ -cells / E. M. Abdelalim, M. M. Emara // *World J. Stem Cells.* – 2015. – Vol. 7, № 1. – P. 174-181. – doi: 10.4252/wjsc.v7.i1.149.
  19. Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells / J. Jiang [et al.] // *Stem Cells.* – 2007. – Vol. 25, № 8. – P. 1940-1953. – doi: <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2006-0761>.
  20. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells / D. Zhang [et al.] // *Cell Res.* – 2009. – Vol. 19, № 4. – P. 429-438. – doi: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2009.28>.
  21. Reversal of hyperglycemia in diabetic mouse models using induced-pluripotent stem (iPS)-derived pancreatic beta-like cells / Z. Alipio [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107, № 30. – P. 13426-13431. – doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1007884107>.
  22. Indolactam V/GLP-1-mediated differentiation of human iPS cells into glucose-responsive insulin-secreting progeny / T. Thatava [et al.] // *Gene Ther.* – 2011. – Vol. 18, № 3. – P. 283-293. – doi: 10.1038/gt.2010.145.
  23. Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro / F. W. Pagliuca [et al.] // *Cell.* – 2014. – Vol. 159, № 2. – P. 428-439. – doi: 10.1016/j.cell.2014.09.040.
  24. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells / A. Reznia [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 32, № 11. – P. 1121-1133. – doi: 10.1038/nbt.3033.
  25. Recent developments in  $\beta$ -cell differentiation of pluripotent stem cells induced by small and large molecules / S. S. Kumar [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15, № 12. – P. 23418-23447. – doi: 10.3390/ijms151223418.
  26. Bose, B. In vitro differentiation of pluripotent stem cells into functional  $\beta$  islets under 2D and 3D culture conditions and in vivo preclinical validation of 3D islets / B. Bose, P. S. Sudheer // *Methods Mol. Biol.* – 2016. – Vol. 1341. – P. 257-264. – doi: 10.1007/7651\_2015\_230.
  27. Differentiation of human-induced pluripotent stem cells into insulin-producing clusters / A. Shaer [et al.] // *Exp. Clin. Transplant.* – 2015. – Vol. 13, № 1. – P. 68-75. – doi: 10.6002/ect.2013.0131.
  28. Rostovskaya, M. Towards consistent generation of pancreatic lineage progenitors from human pluripotent stem cells / M. Rostovskaya, N. Bredenka, A. Smith // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2015. – Vol. 370, № 1680. – P. 20140365. – doi: 10.1098/rstb.2014.0365.
  29. Recapitulating endocrine cell clustering in culture promotes maturation of human stem-cell-derived B cells / G. G. Nair [et al.] // *Nat. Cell Biol.* – 2019. – Vol. 21 (6). – P. 792. – doi: 10.1038/s41556-019-0316-3.
  30. Targeting the cytoskeleton to direct pancreatic differentiation human pluripotent stem cells / N. J. Hogrebe [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2020. – Vol. 38. – P. 460-470. – doi: 10.1038/s41587-020-0430-6.
  31. Single-cell transcriptome profiling reveals B-cell maturation in stem cell-derived after transplantation / P. Augsomworawat [et al.] // *Cell Rep.* – 2020. – Vol. 32, № 8. – P. 108067. – doi: 10.1016/j.celrep.2020.108067.
  32. Scharp, D. W. Encapsulated islets for diabetes therapy: history, current, progress, and critical issues requiring solution / D. W. Scharp, P. Marchetti // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2014. – Vol. 67-68. – P. 35-73. – doi: 10.1016/j.addr.2013.07.018.
  33. Шереметьева, М. Е. Инсулин-продуцирующие клетки в лечении инсулинозависимого сахарного диабета / М. Е. Шереметьева, Т. В. Бухарова, Д. В. Гольдштейн // *Гены и клетки.* – 2016. – Т. 11, № 1. – С. 24-34.

### References

1. Ogurtsova K, Da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, Cavan D, Shaw JE, Makaroff LE. IDF diabetes atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2017;128:40-50. doi: 10.1016/j.diabres.2017.03.024.
2. Ryan EA, Bigam D, Shapiro AMJ. Current indications for pancreas or islet transplant. *Diabetes Obes. Metab.* 2006;8(1):1-7. doi: 10.1111/j.1463-1326.2004.00460.x.
3. Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, Hering BJ, Wease S, Naziruddin B, Oberholzer J, Odorico JS, Garfinkel MR, Levy M, Pattou F, Berney T, Secchi A, Messinger S, Senior PA, Maffi P, Posselt A, Stock PG, Kaufman DB, Luo X, Kandeel F, Cagliero E, Turgeon NA, Witkowski P, Naji A, et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes Care.* 7;35(7):1436-1445. doi: 10.2337/dc12-0063.
4. Dedov II, Lisukov IA, Laptev DN. Sovremennye vozmozhnosti primeneniya stvolovykh kletok pri saharom diabete [Modern possibilities for using stem cells in diabetes mellitus]. *Saharnyj diabet [Diabetes mellitus].* 2014;2:20-28. doi: 10.14341/DM2014220-28. (Russian).
5. Nostro MC, Keller G. Generation of beta cells from human pluripotent stem cells: potential for regenerative medicine. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2012;23(6):701-710. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.06.010.
6. Pelligrini S, Cordi V, Piemonti L. Zameshhenie  $\beta$ -kletok podzheludochnoj zhelezy pri saharom diabete [ $\beta$ -cell transplantation in diabetes mellitus]. *Saharnyj diabet [Diabetes mellitus].* 2013;3:11-20. (Russian).
7. Chhabra P, Brayman KL. Stem Cell Therapy to Cure Type 1 Diabetes: From Hype to Hope. *Stem Cells Transl. Med.* 2013;2(5):328-336. doi: 10.5966/sctm.2012-0116.
8. Tronko MD, Pasteur IP. Dostizheniya regenerativnoj mediciny v terapii saharomogo diabeta 1 tipa. I. Istochniki poluchenija  $\beta$ -kletok [Advances of regenerative medicine in the therapy of type 1 diabetes mellitus. I. Sources of  $\beta$ -cell production]. *Endokrynologija.* 2012;17(2):66-73. (Russian).
9. Liu X, Wang Y, Li Y, Pei X. Research status and prospect of stem cells in the treatment of diabetes mellitus. *Sci. China Life Sci.* 2013;56(4):306-312. doi: 10.1007/s11427-013-4469-1.
10. Thomson JA, Jtskooitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swierarel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-1147. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.

11. 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/10.1038/nbt1259>.
12. Kahan BW, Jacobson LM, Hullett DA, Ochoada JM, Oberley TD, Lang KM, Odorico JS. Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells: an in vitro model to study islet differentiation. *Diabetes*. 2003;52(8):2016-2021. doi: 10.2337/diabetes.52.8.2016.
13. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG <https://www.nature.com/articles/nbt1259> - auth-Nora\_G-Smart, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2006;24:1392-1401.
14. Chen S, Borowiak M, Fox JL, Maehr R, Osafune K, Davidow L, Lam K, Peng LF, Schreiber SL, Rubin LL, Melton D. A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nat. Chem. Biol.* 2009;5(4):258-265. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.154>.
15. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazer S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat. Biotechnol.* 2008;26(4):443-452. doi: 10.1038/nbt1393.
16. Schulz TC, Young HY, Agulnick AD, Babin MJ, Baetge EE, Bang AG, Bhoumik A, Cepa I, Cesario RM, Haakmeester C, Kadoya K, Kelly JR, Kerr J, Martinson LA, McLean AB, Moorman MA, Payne JK, Richardson M, Ross KG, Sherrer ES, Song X, Wilson AZ, Brandon EP, Green CE, Kroon EJ, et al. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One*. 2012;7:e37004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037004>.
17. 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: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
18. Abdelalim EM, Emara MM. Advances and challenges in the differentiation of pluripotent stem cells into pancreatic  $\beta$ -cells. *World J. Stem Cells*. 2015;7(1):174-181. doi: 10.4252/wjsc.v7.i1.149.
19. Jiang J, Au M, Lu K, Eshpeter A, Korbitt G, Fisk G, Majumdar AS. 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>.
20. Zhang D, Jiang W, Liu M, Sui X, Yin X, Chen S, Shi Y, Deng H. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res*. 2009;19(4):429-438. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2009.28>.
21. Alipio Z, Liao W, Roemer EJ, Waner M, Fink LM, Ward DC, Ma Y. Reversal of hyperglycemia in diabetic mouse models using induced-pluripotent stem (iPS)-derived pancreatic beta-like cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107(30):13426-13431. doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1007884107>.
22. Thatava T, Nelson TJ, Edukulla R, Sakuma T, Ohmine S, Tonne JM, Yamada S, Kudva Y, Terzic A, Ikeda Y. Indolactam V/GLP-1-mediated differentiation of human iPS cells into glucose-responsive insulin-secreting progeny. *Gene Ther.* 2011;18(3):283-293. doi: 10.1038/gt.2010.145.
23. Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu JH, Peterson QP, Greiner D, Melton DA. Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro. *Cell*. 2014;159(2):428-439. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.040.
24. Rezania A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A, O'Dwyer S, Quiskamp N, Mojibian M, Albrecht T, Yang YHC, Johnson JD, Kieffer TJ. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(11):1121-1133. doi: 10.1038/nbt.3033.
25. Kumar SS, Alarfaj AA, Munusamy MA, Ranjith Singh AJA, Peng I-C, Priya SP, Hamat RA, Higuchi A. Recent developments in  $\beta$ -cell differentiation of pluripotent stem cells induced by small and large molecules. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15(12):23418-23447. doi: 10.3390/ijms151223418.
26. Bose B, Sudheer PS. In vitro differentiation of pluripotent stem cells into functional  $\beta$  islets under 2D and 3D culture conditions and in vivo preclinical validation of 3D islets. *Methods Mol. Biol.* 2016;1341:257-264. doi: 10.1007/7651\_2015\_230.
27. Shaer A, Azarpira N, Vahdati A, Karimi MH, Shariati M. Differentiation of human-induced pluripotent stem cells into insulin-producing clusters. *Exp. Clin. Transplant.* 2015;13(1):68-75. doi: 10.6002/ect.2013.0131.
28. Rostovskaya M, Bredenkamp N, Smith A. Towards consistent generation of pancreatic lineage progenitors from human pluripotent stem cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2015;370(1680):20140365. doi: 10.1098/rstb.2014.0365.
29. Nair GG, Liu JS, Russ HA, Tran S, Saxton MS, Chen K, Juang C, Li ML, Nguyen VQ, Giacometti S, Puri S, Xing Y, Wang Y, Szot GL, Oberholzer J, Bhushan A, Hebrok M. Recapitulating endocrine cell clustering in culture promotes maturation of human stem-cell-derived B cells. *Nat. Cell Biol.* 2019;21(6):792. doi: 10.1038/s41556-019-0316-3.
30. Hogrebe NJ, Augsornworawat P, Maxwell KG, Velazco-Cruz L, Millman JR. Targeting the cytoskeleton to direct pancreatic differentiation human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2020;38:460-470. doi: 10.1038/s41587-020-0430-6.
31. Augsornworawat P, Maxwell KG, Velazco-Cruz L, Millman JR. Single-cell transcriptome profiling reveals B-cell maturation in stem cell-derived after transplantation. *Cell Rep.* 2020;32(8):108067. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108067.
32. Scharp DW, Marchetti P. Encapsulated islets for diabetes therapy: history, current, progress, and critical issues requiring solution. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014;67-68:35-73. doi: 10.1016/j.addr.2013.07.018.
33. Sheremetieva MY, Bukharova TB, Goldstein DV. Insulin-producing cells in the treatment of insulin-dependent diabetes mellitus. *Geny i kletki [Genes and cells]*. 2016;11(1):24-34. (Russian).

## OBTAINING INSULIN-PRODUCING CELLS FROM EMBRYONIC AND INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

*L. A. Mozheiko*

*Grodno State Medical University, Grodno, Belarus*

---

*The review discusses the problem of obtaining insulin-producing cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. The results of studies of large scientific centers and laboratories working in this direction are analyzed. The complex aspects of differentiation of stem cells into functionally mature insulin-producing cells are considered in detail. The necessity of further optimization of technologies of their production for the use of the generated cells in clinical practice is shown.*

**Keywords:** *insulin-producing cells, embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, diabetes mellitus.*

**For citation:** *Mozheiko LA. Preparation of insulin-producing cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. Journal of the Grodno State Medical University. 2021;19(4):375-381. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2021-19-4-375-381>.*

---

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Об авторах / About the authors**

Можейко Лариса Андреевна / Mozheiko Larisa, e-mail: [mozheiko-hist@yandex.ru](mailto:mzheiko-hist@yandex.ru), ORCID: 0000-0001-6807-5402

---

*Поступила / Received: 19.02.2021*

*Принята к публикации / Accepted for publication: 02.07.2021*