

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.637000>

Пронейрональное репрограммирование: подходы, проблемы и перспективы

А.В. Сентябрева

Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Разработка технологических подходов и методов, позволяющих осуществлять репрограммирование клеток разной степени дифференцировки *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, стала одним из важнейших научно-технических достижений последних десятилетий. С каждым годом публикуется всё больше экспериментальных данных об успешном прямом репрограммировании дифференцированных клеток, включая получение специализированных нейронов из глиальных клеток *in vivo*. В перспективе такие технологии позволят вывести возможности регенеративной медицины на качественно новый уровень. Однако несмотря на постоянно углубляющееся понимание механизмов дифференцировки и фенотипической пластичности клеток, а также на расширение возможностей направления этих процессов, практическое применение клеточного репрограммирования пока остаётся нереализуемой задачей. В обзоре обсуждаются определения клеточной пластичности, передовые достижения в области пронейронального клеточного репрограммирования с помощью прямых и не прямых методов, а также сложности, препятствующие их внедрению в клиническую практику.

Ключевые слова: генная инженерия; генная терапия; прямое репрограммирование клеток; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; нейроны; глиальные клетки.

Как цитировать:

Сентябрева А.В. Пронейрональное репрограммирование: подходы, проблемы и перспективы // Морфология. 2024. Т. 162, № 4. С. 436–453.

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.637000>

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.637000>

Neuronal reprogramming: approaches, challenges, and prospects

Alexandra V. Sentyabreva

Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia

ABSTRACT

The development of technologies and methods for reprogramming cells at different stages of differentiation *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* has become one of the most significant scientific and technological advances of recent decades. Each year, an increasing number of experimental studies report successful direct reprogramming of differentiated cells, including the generation of specialized neurons from glial cells *in vivo*. These technologies hold the potential to advance regenerative medicine to a fundamentally new level. However, despite the growing understanding of differentiation mechanisms and phenotypic plasticity, as well as expanding capabilities to guide these processes, the clinical application of cellular reprogramming remains a major challenge. This review discusses the definitions of cellular plasticity, recent advances in neuronal cellular reprogramming approaches using direct and indirect methods, and the key barriers to their clinical implementation.

Keywords: genetic engineering; gene therapy; direct cellular reprogramming; induced pluripotent stem cells; neurons; glial cells.

To cite this article:

Sentyabreva AV. Neuronal reprogramming: approaches, challenges, and prospects. *Morphology*. 2024;162(4):436–453. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.637000>

Submitted: 14.10.2024

Accepted: 01.01.2025

Published online: 14.02.2025

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.637000>

前神经细胞重编程：方法、挑战与前景

Alexandra V. Sentyabreva

Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia

摘要

近几十年来，开发在in vitro、ex vivo和in vivo条件下对不同分化程度细胞进行重编程的技术手段，已成为生命科学领域的重要突破之一。近年来，关于通过直接重编程将分化细胞转化为特化神经元的实验数据逐年增加，包括在in vivo条件下由胶质细胞生成神经元的研究成果。未来，这类技术有望将再生医学的潜力提升到一个全新水平。尽管我们对细胞分化和表型可塑性机制的理解日益深入，且调控这些过程的手段不断丰富，但细胞重编程在临床中的实际应用仍面临诸多挑战。本文综述了细胞可塑性的概念，介绍了前神经细胞重编程的最新研究进展，包括直接和间接重编程方法，并分析了阻碍其转化为临床实践的主要难点。

关键词：基因工程；基因治疗；细胞直接重编程；诱导多能干细胞；神经元；胶质细胞。

To cite this article:

Sentyabreva AV. 前神经细胞重编程：方法、挑战与前景. *Morphology*. 2024;162(4):436–453. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.637000>

收到: 14.10.2024

接受: 01.01.2025

发布日期: 14.02.2025

ВВЕДЕНИЕ

Новейшие технологические подходы и методы, позволяющие осуществлять репрограммирование клеток разной степени дифференцировки, стали одним из важнейших научно-технических достижений последних десятилетий. С каждым годом появляется всё больше экспериментальных работ, в которых описаны результаты прямого клеточного репрограммирования в условиях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* [1–4]. Предполагается, что в будущем такие технологии позволят вывести возможности регенеративной медицины на качественно новый уровень, в том числе в области нейрорегенерации. Общемировые тенденции к увеличению продолжительности жизни и доли пожилого населения приводят к росту заболеваемости и распространённости возраст-ассоциированных заболеваний, в том числе нейродегенеративных, например болезни Альцгеймера, эффективного лечения которой на данный момент не существует [5]. Поэтому замещение утраченных нейронов при репрограммировании *in situ* или при интракраниальном введении клеток, репрограммированных *in vitro*, многими исследователями и инвесторами рассматривается как крайне перспективная технология. Потенциал использования пронеуронального репрограммирования, в частности для глиальных клеток, изучают на экспериментальных моделях травматического повреждения спинного и головного мозга [6, 7], инсульта [8], регенерации нейронов сетчатки [9, 10], болезни Паркинсона [11] и Хантингтона [12].

Однако, несмотря на постоянное расширение представлений о механизмах дифференцировки и фенотипической пластичности клеток и появление новых технологических возможностей для клеточного репрограммирования, в том числе *in situ*, скорое и повсеместное практическое применение этой технологии пока что остаётся нереализуемой задачей.

Цель обзора — обобщить результаты последних исследований в области пронеуронального клеточного репрограммирования с помощью прямых и непрямых методов, а также охарактеризовать сложности, препятствующие внедрению подобных технологий в клиническую практику.

РАЗВИТИЕ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА

В эмбриогенезе развитие нервной системы, или нейруляция, начинается с момента образования гастролы. Нервная пластинка, образованная из утолщения эктодермы, изгибается в вентромедиальном направлении и формирует нервные складки и желобок, которые в процессе нейруляции образуют нервную трубку. При дальнейшей дифференцировке из нервной трубки развиваются головной и спинной мозг. Поскольку нервная трубка формируется

из нейроэктодермы, все мультипотентные клетки-предшественники в центральной нервной системе (ЦНС) являются нейроэпителиальными или нейральными стволовыми клетками (Neural Stem Cells, NSCs) [13]. Их дальнейшее деление происходит двумя путями: симметрично — для создания пула NSCs; асимметрично — одна из новообразованных клеток сохраняет свойства NSCs, а другая становится постмитотическим предшественником нейрона и прекращает деление [14]. В дальнейшем большинство NSCs дифференцируется в клетки радиальной глии (Radial Glial Cells, RGCs). Для RGCs характерна высокая экспрессия специфических транскрипционных факторов: *Pax6* (семейство Paired Box) — тканеспецифичный координатор развития нервной системы и глаз в эмбриональном периоде; *Sox2* (семейство SRY-related HMG-box) — один из основных регуляторов поддержания плюрипотентности в стволовых клетках; *Ascl1/Mash1* (Achaete-scute family bHLH transcription factor 1/Mammalian achaete-scute homolog 1); семейства NEUROD (Neurogenic Differentiation Factors) и *Dlx* (Distal-less homeobox genes) — гены, кодирующие белки-регуляторы миграции и дифференцировки нейронов. У крыс клетки, экспрессирующие маркеры RGCs [15] появляются на 8–10 сутки эмбриогенеза [14], а у человека — на 5–8 неделе антенатального развития [16]. Тела этих клеток располагаются преимущественно в зонах, образующихся в процессе формирования переднего мозга: в субвентрикулярной зоне (Subventricular zone, SVZ) в латеральных стенках боковых желудочков и в субгранулярной зоне (Subgranular zone, SGZ) зубчатой извилины гиппокампа [17]. RGCs также могут делиться симметрично и асимметрично с образованием промежуточных предшественников (Intermediate progenitor cells, IPCs) всех основных клеток ЦНС — нейронов, астроцитов и олигодендроцитов, а также узкоспециализированных популяций: клеток Мюллера (наиболее распространённых глиальных клеток в сетчатке) [18] и глиоцитов Бергманна в мозжечке [19]. Глиальные клетки в отличие от нейронов не генерируют потенциал действия, но выполняют важнейшие поддерживающие функции: участвуют в синаптогенезе, процессах синаптической пластичности и миелинизации нервных волокон для быстрого проведения нервного импульса; синтезируют нейротрофические соединения и факторы, необходимые для пролиферации, выживания, миграции и дифференцировки нейронов; обеспечивают трофику нейронов и регенерацию ткани мозга [20]. Во время эмбрионального развития IPCs непрерывно мигрируют в направлении коры, где участвуют в формировании гистоархитектоники неокортекса и образуют сеть интернейронов. В конце эмбрионального развития большинство RGCs, не дифференцировавшихся к этому моменту, утрачивают контакт с желудочковой зоной и также мигрируют в кору, где трансформируются в астроциты (рис. 1) [13].

Однако в субвентрикулярных областях (SVZ) и субгранулярной области зубчатой извилины гиппокампа (SGZ)

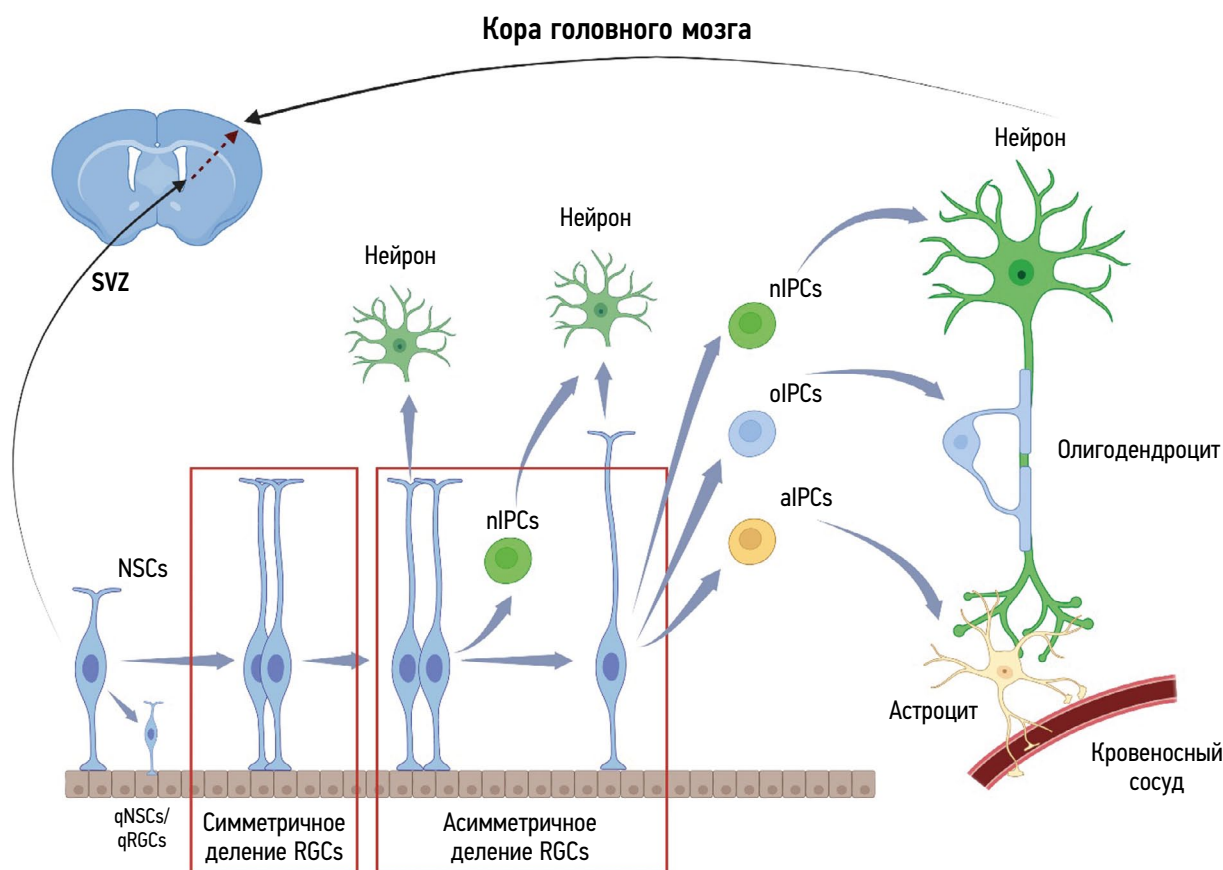


Рис. 1. Схема эмбрионального развития головного мозга. Стволовые нейроэпителиальные клетки (NSCs) в субвентрикулярной зоне (SVZ) делятся симметрично и формируют пул клеток радиальной глии (RGCs). В результате симметричного и асимметричного деления RGCs образуются промежуточные клетки-предшественники — нейрональные (Neuronal intermediate progenitor cells, nIPCs), олигодендроцитарные (Oligodendrocyte intermediate progenitor cells, oIPCs) и астроцитарные (Astrocyte intermediate progenitor cells, aIPCs). По мере дифференцировки клетки мигрируют из нейрогенной области SVZ, формируя гистоархитектуру неокортекса (обозначено красной пунктирной стрелкой) и становятся зрелыми нейронами, олигодендроцитами и астроцитами. На самых ранних этапах эмбриогенеза формируется ниша покоящихся NSCs и RGCs (Quiescent NSCs/RGCs, qNSCs/qRGCs), за счёт которых происходит нейрогенез во взрослом головном мозге.

Fig. 1. Schematic representation of embryonic brain development. Neural stem cells (NSCs) in the subventricular zone (SVZ) divide symmetrically, generating a pool of radial glial cells (RGCs). Through both symmetric and asymmetric division, RGCs give rise to intermediate progenitor cells: neuronal intermediate progenitor cells (nIPCs), oligodendrocyte intermediate progenitor cells (oIPCs), and astrocyte intermediate progenitor cells (aIPCs). As differentiation progresses, these cells migrate from the neurogenic SVZ, contributing to neocortical histoaarchitecture (indicated by the red dashed arrow) and maturing into neurons, oligodendrocytes, and astrocytes. During the earliest stages of embryogenesis, a niche of quiescent NSCs and RGCs (Quiescent NSCs/RGCs, qNSCs/qRGCs) is established, which contribute to neurogenesis in the adult brain. (Illustration by the author)

сохраняется пул покоящихся RGCs и NSCs [21]. Именно эти популяции мультипотентных клеток на протяжении всего постнатального периода онтогенеза участвуют в нейрогенезе — процессе дифференцировки функционально активных нейронов из клеток-предшественников [22].

Нейрогенез в уже полностью сформированном головном мозге необходим для регенерации обонятельных клеток — сенсорных нейронов, располагающихся в обонятельной области слизистой оболочки полости носа и образующих первый нейрон обонятельного пути первого черепного нерва [23]. Процессы нейрогенеза также обеспечивают поддержание нейропластичности и образование новых нейронов в структурах, ответственных в основном за память и другие когнитивные

процессы [24]. У взрослых грызунов SVZ регион в основном связан с образованием обонятельных интернейронов в обонятельной луковице (Olfactory bulb, OB). Кроме того, небольшие популяции нейробластов могут мигрировать в префронтальную кору и полосатое тело (Striatum) [25]. У человека, канонический ростральный миграционный путь SVZ–OB и менее изученный медиальный миграционный путь, направляющий нейробласты в префронтальную кору, предположительно существуют только в непродолжительный период новорождённости [26]. SGZ регион отвечает за нейрорегенерацию в гиппокампе [22]. Нейроны, происходящие из SGZ, у взрослого человека участвуют в функционировании пространственной и социальной памяти, обеспечивают способность различать схожие

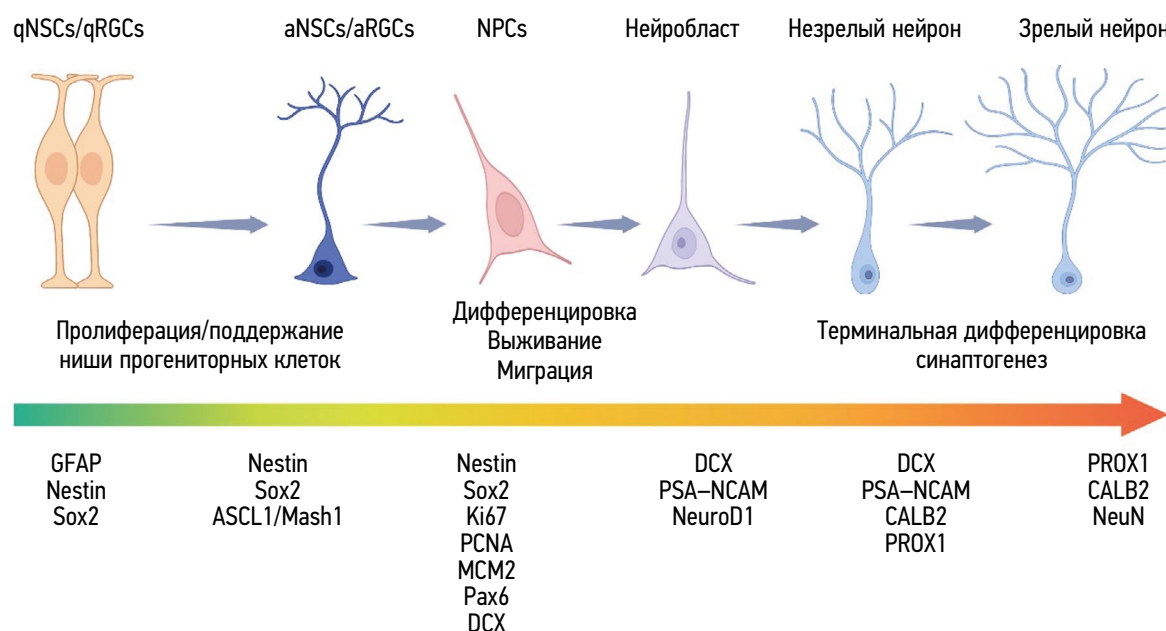


Рис. 2. Этапы нейрогенеза во взрослом мозге грызунов и человека. Покоящиеся стволовые нейроэпителиальные клетки и клетки радиальной глии (qNSCs/qRGCs) под воздействием сигналов от микроокружения активируются (aNSCs/aRGCs) и возобновляют асимметричное деление. При постнатальном нейрогенезе новые нейроны не образуются напрямую из клеток радиальной глии (RGCs), что отличает его от эмбрионального нейрогенеза. Происходит последовательная дифференцировка в нейрональные клетки-предшественники (NPCs), нейробласты, незрелые и дифференцированные нейроны, которые функционально активны и способны встраиваться в существующую нейронную сеть. В нижней части рисунка, под стрелкой, обозначены основные гены, экспрессирующиеся на разных стадиях дифференцировки клеток при нейрогенезе.

Fig. 2. Stages of neurogenesis in the adult brain of rodents and humans. Quiescent neural stem cells and radial glial cells (qNSCs/qRGCs) become activated (aNSCs/aRGCs) in response to microenvironmental signals and resume asymmetric division. Unlike embryonic neurogenesis, postnatal neurogenesis does not involve the direct generation of new neurons from radial glial cells (RGCs). Instead, a sequential differentiation process occurs, giving rise to neuronal progenitor cells (NPCs), neuroblasts, immature neurons, and finally, functionally active, mature neurons that integrate into the existing neuronal network. The lower part of the figure (below the arrow) indicates key genes expressed at different stages of cell differentiation during neurogenesis. (Illustration by the author)

события, а также поддерживают стойкое кодирование информации для консолидации кратковременной памяти в долговременную [27].

При постнатальном нейрогенезе под влиянием окружающих глиальных клеток покоящиеся RGCs активируются и возобновляют симметричное и асимметричное деление, в результате чего образуются прогениторные клетки. В процессе миграции в различные отделы головного мозга они дифференцируются в нейробласты, а затем в незрелые нейроны и, наконец, в дифференцированные нейроны. По мере дифференцировки спектр экспрессирующихся генов в клетках значительно меняется, что позволяет определить на каком этапе созревания находятся те или иные клетки-предшественники. Однако это непростая задача, так как ряд маркеров характерен для клеток на разных стадиях созревания (рис. 2) [28].

РЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ВЗРОСЛОГО ГОЛОВНОГО МОЗГА

RGCs, являясь мультипотентными клетками, экспрессируют одновременно как маркеры клеток-предшественников нейронов разной степени дифференцировки, такие

как PAX6, DLX, ASCL1 и NEUROD1, так и белки, специфичные для астроцитов — глиальный фибриллярный кислый белок (glial fibrillary acidic protein, GFAP), астроцит-специфический транспортер глутамата (astrocyte-specific glutamate transporter, GLAST) и белок, связывающий липиды мозга (brain lipid-binding protein, BLBP) [29]. Было показано, что у взрослых мышей нейрогенез так же как и в эмбриогенезе, регулируется генами *Pax6*, *Dlx*, *Ascl1* и *Neurod1* [30]. Однако, в период эмбрионального развития при делении RGCs нейроны образуются как первично, так и через клетки-предшественники. Созревание же новых нейронов во взрослом мозге происходит только через образование промежуточных предшественников и под влиянием уже зрелого микроокружения — в основном астроцитов и эпендимокитов [31]. В результате RGCs в большей степени предрасположены к глиогенезу, чем к нейрогенезу и для образования новых функциональных нейронов из этих прогениторных клеток экспрессия пронейрональных факторов (*Pax6*, *Dlx*, *Ascl1*, *Neurod1* и других) должна быть значительно выше, чем для глиогенеза. Уровень экспрессии пронейрональных факторов, как и переход прогениторных клеток из покоящегося состояния в активированное, — строго регулируемый процесс.

По-видимому, такой физиологический механизм служит для предотвращения преждевременного истощения пула NSCs и RGCs в нейрогенных нишах. В то же время само уменьшение пула стволовых и прогениторных клеток в нейрогенных зонах, прогрессирующее с возрастом, негативно влияет на нейрогенез: чем меньше остаётся дремлющих NSCs и RGCs, тем ниже вероятность их активации и эффективность дифференцировки в зрелые нейроны [32]. G. Kalamakis и соавт. [33] показали, что у мышей C57Bl/6-TLX-CreERT2YFP, у которых возможна прижизненная флуоресцентная визуализация белков-маркеров NSCs, к возрасту 7 месяцев количество NSCs в зоне SVZ значительно уменьшается по сравнению с мышами в возрасте 2 месяца; при этом между возрастными группами 7 и 22 месяца различий обнаружено не было. Аналогичную динамику наблюдали в субпопуляции активированных NSCs, в которых были инициированы процессы деления для дальнейшего нейрогенеза: по сравнению с мышами в возрасте 2 месяца их количество значительно снизилось к 7 месяцам жизни [33]. Свою роль в подавлении активации прогениторных клеток также играет провоспалительный фон, формирующийся при старении и получивший название инфламэйджинг. В том же исследовании было установлено, что провоспалительные цитокины IL-33 и IFN- γ и хемокин CXCL10, повышение экспрессии которых часто наблюдается при старении, ингибируют Wnt-зависимый сигнальный путь, являющийся одним из основных механизмов, поддерживающих процессы нейрогенеза [33].

Важно отметить, что несмотря на общность процессов нейрогенеза в SVZ и SGZ новые нейроны, образующиеся в этих зонах, значительно различаются. В отличие от SVZ, в зубчатой извилине гиппокампа NSCs и RGCs находятся глубоко в паренхиме головного мозга, где они окружены зрелыми нейронами и глиальными клетками, значительно удалены от стенок желудочков и потоков цереброспинальной жидкости, но в то же время расположены вблизи кровеносных сосудов [34, 35]. Как было упомянуто ранее, у человека в постнатальном онтогенезе новые нейроны в обонятельной луковице, вероятно, не образуются. По-видимому, NSCs и RGCs в этой области преимущественно дифференцируются в олигодендроциты [25]. Литературные данные о продолжительности нейрогенеза в SGZ гиппокампа несколько противоречивы. Одни исследователи выявляют незрелые нейроны на стадии дифференцировки у детей 7–13 лет, но не обнаруживают их у взрослых [36]. Другие же сообщают о наличии RGCs с нейрогенным потенциалом, а также более дифференцированных клеток-предшественников у людей среднего, пожилого и старческого возраста [37, 38]. Однако, учитывая непосредственную близость нейрогенной ниши SGZ к зрелым структурам гиппокампа, резонно предполагать, что нейрогенез в этой зоне продолжается с высокой степенью эффективности даже в отдалённом постнатальном периоде. Вероятно, различия в данных обусловлены не только

пространственным и секреторным контекстом микроокружения, но и эпигенетическими изменениями, предрасполагающими клетки-предшественники к приобретению определённого фенотипа в различных областях мозга.

Нейрогенный потенциал прогениторных ниш сохраняется на протяжении всей жизни, а пролиферация и дифференцировка NSCs и RGCs в нейроны строго регулируются и активируются только при необходимости. Некоторые заболевания, не связанные с генетическими нарушениями, а также травмы ЦНС сопровождаются гибелью значительного количества нейронов, что приводит к когнитивным нарушениям, неврологическим дефицитам и, следовательно, к снижению качества и продолжительности жизни. Такие события могут происходить одновременно, например, при травматических повреждениях или инсультах — ишемических, вызванных тромбозом и нарушением кровоснабжения тканей мозга, либо геморрагических, сопровождающихся кровоизлиянием в ткани мозга, между его оболочками или внутри желудочков [39]. На модели транзиторной ишемической атаки у мышей было показано, что при инсульте активируются процессы нейрогенеза, миграции и дифференцировки нейробластов, а введение мышам провоспалительного цитокина IL-1 β , усиливающего острую воспалительную реакцию, способствовало выживаемости новых нейронов [40]. Кроме того, за счёт дифференцировки прогениторных клеток в глиальные активируются процессы ангиогенеза, необходимые для нейрорегенерации [41]. При черепно-мозговых травмах также зарегистрирована активация дремлющих прогениторных клеток и инициация их дифференцировки, причём не только в SGZ, но и в единичных клетках коры головного мозга, где они, по-видимому, находились в дремлющем незрелом состоянии [42, 43]. Важно отметить, что эффективность процессов нейрогенеза при черепно-мозговых травмах и инсультах различного генеза зависит от широкого спектра факторов, включая локализацию и распространённость повреждений мозга, возраст, сопутствующие заболевания и их терапию. Так, например, при нейropsychиатрических расстройствах, таких как аффективные тревожно-депрессивные расстройства, показано угнетение процессов нейрогенеза в гиппокампе [44].

Снижение количества функционально активных нейронов в тех или иных областях мозга может происходить постепенно и на протяжении долгого времени не иметь клинических проявлений. В первую очередь это характерно для возраст-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. У таких пациентов умеренные когнитивные нарушения манифестируют в возрасте старше 60 лет и постепенно прогрессируют, приводя к развитию деменции [45]. К нейродегенеративным заболеваниям, в большей степени обусловленным генетической предрасположенностью, относятся болезнь Хантингтона [46], лобно-височная деменция и боковой амиотрофический склероз, но возраст также является фактором риска их развития.

Важным аспектом при таких заболеваниях является истощение пула прогениторных клеток в нейрогенных нишах и снижение эффективности нейрогенеза в процессе старения. С другой стороны, в течение длительного времени происходит адаптация к постепенному уменьшению количества функционально активных нейронов. В результате, для поддержания когнитивных функций необходимо, чтобы больше прогениторных клеток дифференцировались в зрелые нейроны. Однако этому препятствуют провоспалительный фон инфламэйджинга, повышенный порог активации дремлющих NSCs и RGCs и недостаток нейротрофических факторов, вызванный старением и дисфункцией глиальных и резидентных иммунных клеток — астроцитов и микроглии [38, 47, 48].

Таким образом, несмотря на колоссальные адаптивные регенеративные возможности головного мозга, широкий спектр патологических состояний ЦНС приводит к утрате большого количества нейронов и заместить эти потери за счёт собственных ресурсов невозможно. Однако, можно предположить, что терапевтические подходы, направленные на стимуляцию имеющегося нейрогенного потенциала или на замещение утраченных нейронов новыми, полученными *in vitro* или *in situ*, имели бы значимую клиническую эффективность.

КЛЕТОЧНОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ: ТЕРМИНЫ И МЕХАНИЗМЫ

Приобретение дифференцированными клетками и состоящими из них тканями признаков других дифференцированных клеток и тканей, обозначенное термином «метаплазия», было описано и обсуждалось еще в XIX веке Рудольфом Вирховым и его учениками [49, 50]. В современной клеточной биологии и гистологии метаплазией принято называть потенциально обратимое изменение фенотипа дифференцированной эпителиальной ткани, то есть появление признаков, характерных для другого типа эпителия [51], тогда как соответствующие процессы в пределах клетки называют трансдифференцировкой или клеточной метаплазией [52]. Метапластические процессы могут быть инициированы или ускорены каким-либо аномальным, чаще всего повреждающим стимулом, к воздействию которого дифференцированные клетки адаптируются путём смены фенотипа [53]. Таким стимулом могут быть: повреждающие внешние химические агенты, например, кислоты или основания, опосредующие изменение pH [54]; табачный дым или алкоголь [55–57]; повышенные концентрации гормонов или гормоноподобных веществ, например, бисфенола А и его производных [58, 59]; вирусные инфекции; хроническое воспаление; окислительный стресс [60–62]. До сих пор нет единого мнения относительно того, смогут ли клетки и ткани вернуться к нормальному для их локализации типу дифференцировки после прекращения действия повреждающего стимула, а также как долго должны персистировать

неблагоприятные условия среды, чтобы привести к диспластическим процессам и повышению риска малигнизации [63]. Невозможно определить распространённость или частоту возникновения метаплазии тканей любого типа в общей популяции, так как большинство популяционных исследований затрагивают лишь несколько наиболее часто встречающихся патологий. Например, кишечная метаплазия эпителия пищевода, известная как пищевод Барретта, нередко сопровождается гастроэзофагеальную рефлюксную болезнь. При постоянном забросе желудочного сока в пищевод многослойный плоский эпителий в нём замещается однослойным цилиндрическим. Ранее считалось, что у пациентов с диагнозом «пищевод Барретта» относительный риск развития аденокарциномы пищевода в 30–125 раз выше, чем в среднем в популяции, а средний годовой риск малигнизации составляет 0,5% (диапазон 0,1%–3,5%). Однако последующие исследования показали более низкие годовые оценки риска развития аденокарциномы — в диапазоне 0,12%–0,18% [64]. При этом описано, что очаги разных типов метаплазии в некоторых локализациях могут исчезать после прекращения воздействия раздражающего стимула, но не в случае пищевода Барретта, где клетки эпителия сохраняют призматический кишечный фенотип и не возвращаются к плоскоклеточному даже при эффективном терапевтическом лечении [65].

В тканях человека метаплазия рассматривается преимущественно в контексте отдельных типов эпителия и подразделяется на плоскоклеточную, кишечную и ацинарно-протоковую [63]. Процессы, происходящие в организме человека, относятся к прямой метаплазии, при которой фенотипические изменения в клетках не сопровождаются снижением уровня дифференцировки, а возникают при активации или деактивации генов в комбинациях, не характерных для данного типа эпителия в норме. Такие же механизмы лежат в основе прямого репрограммирования *in vivo*, что позволяет рассматривать его как индуцированную метаплазию. Отсутствие этапа дедифференцировки — ключевое отличие прямого репрограммирования от методов, основанных на получении индуцированных плюрипотентных клеток (Induced pluripotent stem cells, iPSCs) и дальнейшей регуляции их дифференцировки для получения клеток с необходимым фенотипом [66]. По своим морфофункциональным и молекулярно-биологическим характеристикам iPSCs наиболее близки к эмбриональным стволовым клеткам, обладающим наименьшей степенью дифференцировки [67]. Различные соматические клетки могут быть репрограммированы в iPSCs: кератиноциты [68], меланоциты [69], стволовые клетки жировой ткани и адипоциты [67], нейрональные прогениторные клетки (Neural Progenitor Cells, NPCs) [70] и др. Однако, для получения популяции iPSCs человека чаще всего используют фибробласты [71, 72]. К настоящему времени уже разработаны и апробированы с разной степенью успешности сотни

протоколов дифференцировки iPSCs в различные типы клеток. Они основаны на сверхэкспрессии транскрипционных факторов, активных только в низкодифференцированных клетках, или на добавлении белков и малых молекул, характерных для плюрипотентных клеток. В результате клетки утрачивают признаки дифференцировки, «возвращаясь» к состоянию стволовых. Далее путём регуляции экспрессии различных генов или при культивировании с определёнными белками и низкомолекулярными соединениями, характерными для микроокружения таргетных клеток, *in vitro* iPSCs проходят все этапы дифференцировки, которые при физиологических условиях в организме проходят клетки, фенотип которых необходимо воспроизвести.

Получение нейронов методами прямого репрограммирования и при дедифференцировке до iPSCs возможно из клеток не-нейроэктодермального происхождения, например, фибробластов и моноцитов периферической крови. Можно и следует ли считать данный процесс примером мезенхимально-эпителиального перехода — вопрос, который пока остаётся открытым [73, 74]. Эмбриональный экто-, мезо- или энтодермальный цитогенез, по-видимому, является ограничивающим, но не запрещающим фактором для репрограммирования в клетки другого дифферона. Это, предположительно, может быть обусловлено тем, что клетки, подвергающиеся контролируемому воздействию, в большей мере при получении iPSCs и в меньшей при прямом репрограммировании, по мере культивирования утрачивают свои уникальные эпигенетические свойства, особенно на поздних (10 и более) пассажах [75]. Тем не менее, в ряде работ отмечено, что часть эпигенетических изменений всё же сохраняется, что может обуславливать тенденцию к более успешному репрограммированию в пределах ткани происхождения [67, 76]. Это касается и нейронов. Как показали G. Hargus и соавт. [77], iPSCs, полученные из фетальных NSCs и дермальных фибробластов, значительно различаются по уровню экспрессии маркеров нейронов. iPSCs, полученные из низкодифференцированных клеток нейроэктодермального происхождения, по спектру экспрессируемых генов были значительно ближе к нейронам, а при интракраниальном введении в кору головного мозга мышей их выживаемость была значительно выше [77].

Дифференцировка и полноценное функционирование клеток, особенно нейронов, в значительной степени зависят от микроокружения, включая динамику его пространственно-временного и секреторного контекста, который определяет уникальные эпигенетические изменения клеток в конкретном типе дифференцированной ткани [78]. Утрата этих изменений, необходимость экстракции клеток из организма для *in vitro* репрограммирования и введение обратно полученной популяции клеток — факторы, которые делают iPSCs менее предпочтительными для широкого клинического применения по сравнению с методами прямого репрограммирования *in situ* [79]. Несмотря

на то, что применение iPSCs до сих пор не реализовано на практике, ведутся исследования, в которых для стимуляции нейрогенеза или нейрорегенерации используют не сами iPSCs, а выделенные из них внеклеточные везикулы [80]. Однако это сложная технологическая задача, которая пока не апробирована для клинического применения.

ПРОНЕЙРОНАЛЬНОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ: МЕТОДОЛОГИЯ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ

Один из наиболее эффективных и часто используемых методов индукции перехода дифференцированных клеток в состояние плюрипотентности — использование вирусных векторов, несущих плазмиды с генами классических факторов репрограммирования OSKM (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*) в разных комбинациях. Лентивирусная или ретровирусная доставка плазмид характеризуется их интеграцией в геном, что теоретически должно обеспечивать стабильную экспрессию генов, необходимых для индукции iPSCs [66, 81]. Однако, подобная интеграция вирусного вектора в геном может привести к инсерционному мутагенезу и нежелательной реактивации трансгена в уже дифференцированных клетках [82]. Альтернативой стало использование неинтегрирующихся вирусных векторов, таких как аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV) или парамиксовирус Сендай [83]. Развитие злокачественных новообразований при использовании генно-инженерных препаратов на основе AVV-векторов зарегистрировано лишь в немногочисленных экспериментальных исследованиях — у новорождённых мышей и у собак с гемофилией. Совершенствование протоколов репрограммирования и подбор оптимальной дозы вирусных частиц позволяют минимизировать риски инсерционного мутагенеза [82]. Неинтегрирующиеся вирусные векторы постепенно выводятся из пролиферирующих и созревающих iPSCs, что позволяет достичь целей репрограммирования без перманентной интеграции OSKM в геном клетки. Факторы OSKM также можно доставлять в клетки, используя невирусные векторы, такие как транспозоны [84], эписомальные плазмиды [85], мПНК [86] и др. Кроме того, индукция плюрипотентности может быть инициирована с помощью миПНК [87] и химических индукторов [88–90] как без использования OSKM, так и в комбинации с ними, что повышает эффективность дедифференцировки и последующего репрограммирования. Как уже было упомянуто, эффективность репрограммирования значительно варьирует в зависимости от экто-, мезо- или энтодермального происхождения клеток, трансфицируемых в iPSCs, а также от базального уровня экспрессии генов, используемых для индукции плюрипотентности. Показано, что iPSCs мыши и человека можно

получить из NSCs, используя только *Oct4* и *Klf4* или даже один *Oct4*, поскольку базальная экспрессия *Sox2*, *c-Myc* и ряда других генов в NSCs достаточно высока и не требует стимуляции [70, 91, 92].

Для прямого репрограммирования часто используют те же подходы и методики, за исключением этапа дедифференцировки. При помощи различных комбинаций транскрипционных факторов, малых молекул, мРНК, миРНК и других индукторов потенциально возможно получить клетки любого уровня дифференцировки, кроме эмбриональных стволовых, из любых клеток. В настоящее время таким способом из фибробластов и моноцитов мыши и человека *in vitro* были получены клетки-предшественники, образующиеся на разных этапах эмбрионального и взрослого нейрогенеза: NSCs [93, 94], промежуточные прогениторные клетки [95, 96] и RGCs [97].

Протоколы для прямого *in vitro* и *in vivo* репрограммирования различных клеток в специализированные нейроны (Induced neurons, iNs) — глутамат-, серотонин-, ацетилхолинергические, моторные и другие подробно описаны и систематизированы [98, 99]. Так, например, фибробласты человека *in vitro* были трансдифференцированы в клетки, демонстрировавшие морфологические признаки, экспрессию генов и белков, а также электрофизиологические особенности, характерные для дофаминергических нейронов. Такой результат был достигнут с помощью комбинации нескольких лентивиральных векторов, несущих гены *hAscl1*, *hNurr1*, *hLmx1a* и *hmiR-124* [100]. Также дофаминергические нейроны из фетальных фибробластов человека удалось получить без использования вирусных векторов, при культивировании клеток в присутствии малых молекул и ростовых факторов: вальпроевой кислоты; ароматических гетероциклических соединений — Repsox (ингибитор TGFβR1 (Transforming Growth Factor Beta Receptor 1)), кенпауллона (ингибитор гликогенсинтазы-киназы 3β), форсколина (активатор аденилатциклазы), пурморфамин (активатор сигнального пути SHH (Sonic Hedgehog)); белков — Wnt1, Wnt5a, факторов роста фибробластов и белка, кодируемого геном *SHH* [101]. Фибробласты из лёгких эмбрионов человека на 7–9 неделе развития были успешно репрограммированы *in vitro* в кортикальные глутаматергические нейроны с помощью лентивирального вектора, несущего гены *Fezf2*, *Ctip2*, *Ngn2* и *NeuroD1*. Репрограммированные клетки идентифицировали как iNs, а именно как кортикальные нейроны, по электрофизиологической активности и содержанию нейрональных маркеров SOX5, FEZF2, CTIP2, OTX1, TBR1 и SATB2. Полученные iNs формировали синаптические контакты при совместном культивировании с клетками первичной культуры кортикальных нейронов человека, что подтверждалось образованием дендритных шипиков и наличием постсинаптического структурного белка PSD95, ассоциированного с проведением возбуждающего потенциала [102].

При введении вектора с таргетными генами в соматические клетки *in vitro* можно получить индуцированные нейроны как напрямую, так и через предварительное получение iPSCs. Полученные таким образом репрограммированные клетки вводятся в организм непосредственно в область, куда они должны интегрироваться. При генной терапии препараты на основе вирусного вектора вводят локально или системно в зависимости от заболевания (рис. 3). Клеточное репрограммирование *in vivo* апробировано только на моделях с использованием лабораторных животных, однако исследованы преимущества и недостатки как локального, так и системного введения вирусных векторов.

Как из соматических клеток, так и из прогениторных и глиальных клеток можно путём прямого репрограммирования получить трансдифференцированные iNs различных субпопуляций, а также клетки с более низким уровнем дифференцировки. Например, P. Rivetti di Val Cervo и соавт. [103] удалось не только получить индуцированные дофаминергические нейроны из астроцитов человека *in vitro*, но и у мышей *in vivo* при моделировании болезни Паркинсона [103]. Для моделирования заболевания в одно из полушарий головного мозга мышам вводили 6-гидроксидофамин, что вызывало гибель дофаминергических нейронов в вентральной области среднего мозга ипсилатерального полушария, а также денервацию и реактивный глиоз. Затем в область ипсилатерального стриатума транскраниально вводили вирусный вектор с плазмидой, несущей гены *Neurod1*, *Ascl1* и *Lmx1a*, а также миРНК miR218, экспрессировать которые могут только GFAP-положительные клетки. L. Todd и соавт. [9] осуществили у мышей *in vivo* репрограммирование клеток глии Мюллера в нейроноподобные клетки сетчатки путём интравитреальной инокуляции лентивирусного вектора с плазмидой, несущей гены *Atoh1:Ascl1* [9].

Помимо введения векторов непосредственно в определённый регион мозга свою эффективность показали интратекальные и интравентрикулярные инъекции препаратов на основе вирусных векторов доставки транскрипционных факторов [104]. Были также исследованы возможности системной доставки плазмиды в составе AAV-вектора в ЦНС. При внутривенном введении вирусных частиц, промоторами для активации которых являлись специфические маркеры клеток радиальной глии и астроцитов (GFAP) и нейронов (синаптофизин), экспрессия трансгенов, отслеживаемая по флуоресценции маркера GFP (Green Fluorescent Protein), была зарегистрирована только в пределах ЦНС, хотя и в небольшом количестве таргетных клеток [105].

Таким образом, существует широкий спектр технических и методологических подходов для прямого пронеуронального репрограммирования. В доклинических экспериментальных исследованиях именно для этого типа репрограммирования наиболее широко изучаются, совершенствуются и применяются протоколы с использованием AAV-векторов.

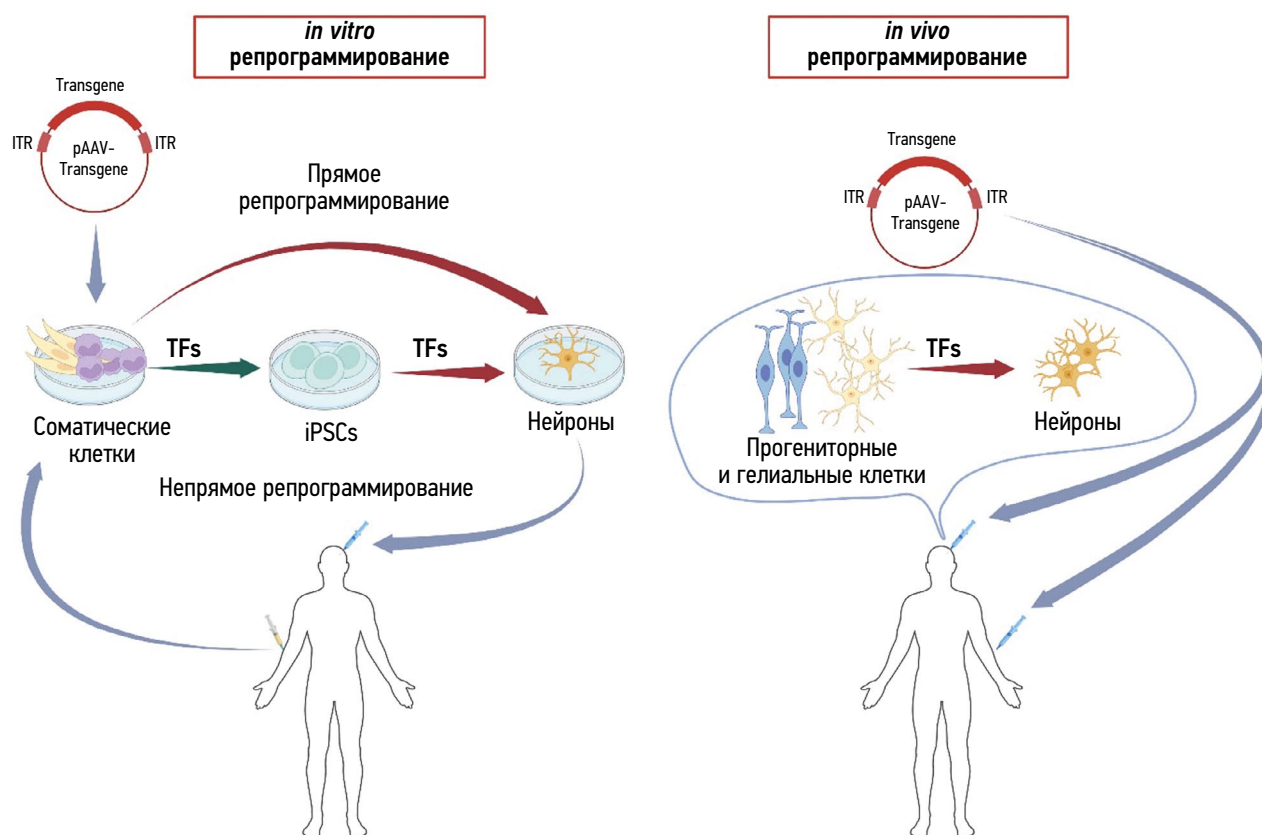


Рис. 3. Схематическое изображение клеточного репрограммирования в условиях *in vitro* и *in vivo*: TFs — факторы транскрипции (Transcription factors); pAAV-transgene — вирусный вектор с таргетными генами; iPSCs — индуцированные плюрипотентные клетки.

Fig. 3. Schematic representation of cellular reprogramming *in vitro* and *in vivo*: TFs, transcription factors; pAAV-transgene, viral vector carrying target genes; iPSCs, induced pluripotent stem cells. (Illustration by the author)

По сравнению с иными вирусными системами и невирусными подходами к репрограммированию, использование AAV-векторов для доставки генного материала обеспечивает высокие краткосрочные показатели безопасности и стабильности. Тем не менее, ряд серьезных ограничений пока не позволяет приблизиться к клиническим испытаниям терапевтических систем, основанных на методах прямого пронеуронального репрограммирования.

ОГРАНИЧЕНИЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ ПРЯМОГО ПРОНЕЙРОНАЛЬНОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ *IN VIVO*

Генная терапия, в том числе на основе AAV-векторов, уже используется в клинической практике. На текущий момент Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA, Food and Drug Administration) и другими регуляторами для использования *in vivo* одобрены 26 препаратов на основе вирусных векторов [104]. Все эти препараты позволяют при редких генетических заболеваниях встроить в ДНК клеток

пациента функционирующие нуклеотидные последовательности вместо дефектных, включая те, которые затрагивают нервную систему. Так, например, в препарате онасемноген абепаровек используются капсиды AAV серотипа 9 с плазмидами, содержащими копию гена *SMN* (Survival of motor neuron), дефект которого приводит к развитию спинальной мышечной атрофии [106]. Аналогичным образом был разработан препарат эладокаген эксупаровек¹ (eladocagene exuparvovex), применяемый для генной терапии дефицита ароматической декарбоксилазы (Aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC) — фермента, отсутствие которого нарушает синтез серотонина и дофамина, что приводит к летальному исходу в раннем детском возрасте [107]. Однако, ни один из одобренных препаратов не воздействует на степень дифференцировки клеток и их фенотип. Несмотря на постоянное углубление понимания механизмов пронеуронального репрограммирования и расширение спектра протоколов для его осуществления, в том числе *in situ*, ещё предстоит решить

¹ Лекарственное средство не зарегистрировано в Российской Федерации

ряд фундаментальных проблем, не позволяющих перейти к клиническим испытаниям.

Большое количество работ, касающихся исследований прямого пронейронального репрограммирования *in vivo*, проводится на линиях трансгенных мышей, клетки которых способны экспрессировать Cre-loxP или Flp-FRT рекомбиназы. Именно за счёт этих рекомбиназ запускается экспрессия таргетных генов, встроенных в плазмиду [108]. Кроме того, активация рекомбиназ индуцирует синтез флуоресцентного белка GFP, что позволяет с помощью систем визуализации *in vivo* обнаружить клетки, в которых происходит экспрессия таргетных генов и синтезируются необходимые белки [109]. Однако даже в экспериментальной работе на мышах это не всегда удаётся [110]. Аналогичным образом экспрессия факторов прямого репрограммирования *in situ* теоретически может быть инициирована и у человека, но оценить эффективность репрограммирования *in vivo* с помощью имеющихся методов визуализации, предназначенных для клеточных линий и небольших организмов, включая мышей, в настоящее время не представляется возможным.

Полностью безопасных способов доставки генных конструкций также пока не существует. Как уже упоминалось ранее, риск возникновения злокачественных новообразований после применения генной терапии на основе AAV-векторных систем достаточно низок. Однако нежелательные реакции возникают нередко как при локальном, так и при системном введении таких препаратов. В доклинических исследованиях на мышах, крысах и приматах было выявлено поражение нейронов в спинномозговых ганглиях (Dorsal root ganglia, DRG), сопровождавшееся атаксией и нарушением проприоцептивных сенсорных функций [111–113]. Описан клинический случай дорзальной корешковой ганглиопатии при внутривенном введении препарата AAV-miR-SOD1 двум пациентам для лечения бокового амиотрофического склероза, вызванного мутацией в гене супероксиддисмутазы-1. У одного из пациентов после введения препарата появилось покалывание в руках и сильная стреляющая боль в левой ступне, которая коррелировала с электрофизиологическими изменениями и контрастным усилением DRG при проведении магнитно-резонансной томографии. Второму пациенту была предварительно назначена иммуносупрессивная терапия, и клинических проявлений поражения DRG у него зарегистрировано не было [114]. Токсические поражения печени разной степени тяжести при системной генной терапии препаратами на основе AAV-векторов, например, онасемноген абепарвовек, могут достигать 60% случаев [115]. Тромбозы микроциркуляторного русла (Thrombotic microangiopathy, TMA) также являются частым осложнением (8,2 [0,5–75]%), которое может приводить к летальному исходу в краткосрочном периоде, тогда как выживаемость через 1 год после терапии при купировании симптомов TMA варьирует от 16 до 80% [116, 117]. Подобные нежелательные реакции чаще всего связаны

с системным иммунным ответом на введение большого количества вирусных частиц. Подавляющее большинство людей в течение жизни инфицируется широким спектром различных вирусов, поэтому до начала терапии необходимо проводить тщательное многоэтапное тестирование на наличие антител к AAV-капсидам. В случае, когда у пациента присутствуют антитела к определённым типам вирусов, адаптивный иммунный ответ активируется раньше, чем препарат успевает оказать терапевтическое действие [118].

Существующие генно-инженерные препараты на основе вирусных векторов используют преимущественно в раннем детском возрасте для терапии тяжёлых врождённых заболеваний. До шести месяцев у детей могут присутствовать антитела, передавшиеся от матери трансплацентарно. В дальнейшем их титры снижаются, но, чем старше пациент, тем выше вероятность наличия антител к аденовирусным капсидам [119]. Однако, даже при отсутствии таких антител до начала терапии, введение большого количества вирусных копий неизбежно активирует врождённый и собственный адаптивный иммунитет, что также коррелирует с развитием побочных эффектов. Благодаря совершенствованию терапевтических схем применения генной терапии частоту случаев возникновения побочных эффектов и их тяжесть удаётся снижать, в том числе путём уменьшения количества вирусных копий в дозе препарата и увеличения кратности введения [120]. Однако, такой подход сопряжён со значительным ростом финансовых затрат, а для достижения необходимого терапевтического эффекта основного заболевания по-прежнему требуется интенсивная иммуносупрессивная терапия. При этом сами иммунодепрессанты — кортикостероиды, сиролимус, такролимус, ингибиторы системы комплемента и различные моноклональные антитела [114, 117, 121] вызывают широкий спектр системных побочных эффектов и имеют множество противопоказаний. С учётом большого количества хронических заболеваний у пожилых людей и необходимости приёма медикаментов для купирования симптомов и контроля течения соматических патологий, использование AAV-векторных препаратов для пронейронального репрограммирования глиальных клеток, в частности, у пациентов с нейродегенеративными расстройствами, вряд ли будет одобрено для клинических испытаний в ближайшее время.

Стоит отметить, что в настоящий момент невозможно точно и с высокой степенью воспроизводимости направлять дифференцировку в сторону желаемого подтипа дифференцированных клеток. Использование одного из ключевых в репрограммировании транскрипционных факторов Sox2 описано для получения низкодифференцированных RGCs, NPCs и нейробластов в ткани головного и спинного мозга, в том числе *in vivo* [53, 74–76]. Несмотря на то, что результат репрограммирования зависит от количества копий вводимого вектора, сложно с высокой степенью уверенности утверждать, какая именно

популяция клеток будет получена *in situ* и в каком количестве, поскольку клетки-предшественники нейронов на разных этапах дифференцировки экспрессируют множество идентичных маркеров [28]. Важно также отметить, что при нейрогенезе в эмбриональном периоде цикл деления стволовых нейрональных клеток крайне короткий и занимает 10–18 часов [122], а во взрослом мозге созревание нейрона из NSCs или NPCs при физиологических условиях может занимать до двух недель [123, 124]. Поэтому в условиях патологии в частности, нейродегенеративной, скорость образования зрелых специализированных нейронов из глиальных клеток *in situ* и эффективность их функциональной интеграции для восстановления утраченных нейронных связей будет крайне сложно прогнозировать и контролировать.

Важно отметить, что в большинстве экспериментальных работ исследователи сталкиваются с феноменом, называемым «утечкой экспрессии» (leaky expression), то есть детектируют экспрессию целевых генов нецелевыми клетками [125]. При введении извне транскрипционных факторов, активность которых ограничена начальными этапами дифференцировки клеток, по-видимому, запускается сложный каскад процессов, связанных с развёртыванием ДНК и взаимодействием с энхансерами и промоторами целевых генов в клетках, которые должны быть репрограммированы. При этом, как показали T. Katsuda и соавт. [126] при системном введении мышам AAV-вектора, несущего гены транскрипционных факторов *Sox4* и *Sox9*, была выявлена гепатобилиарная метаплазия [126]. Аналогичные изменения возникают при токсическом поражении органа и могут приводить к развитию аденокарциномы [127]. Самопроизвольная метаплазия глиальных клеток у млекопитающих не описана, однако отсроченные последствия их репрограммирования в нейроны *in vivo* так же не изучены. Учитывая неопределённость вероятности перехода метаплазии в дисплазию с последующей малигнизацией, особенно у пожилых коморбидных пациентов с возрастным повышением риска развития онкологических заболеваний, на текущем этапе исследований и развития технологий AAV-векторов возможные побочные эффекты перевешивают потенциальный терапевтический эффект.

Эпигенетические изменения, которые человек неизбежно приобретет в течение жизни, также значимо влияют на эффективность репрограммирования. В некоторых транскриптомных single-cell исследованиях iPSCs, полученных из коммерческих линий зрелых фибробластов, наблюдали экспрессию молекулярно-генетических сигнатур, характерных для NSCs [128]. В то же время при прямом репрограммировании было показано, что трансдифференцированные iNs, полученные из клеток молодых и пожилых людей, за счёт уникальных эпигенетических изменений сохраняют транскрипционные сигнатуры возраста [129]. Следовательно, учитывая влияние возраста и сопровождающего его инфламэйджинга, тормозящего

процессы нейрогенеза, высока вероятность того, что даже успешное прямое репрограммирование астроцитов в нейроны *in situ* у людей с возраст-ассоциированными нейродегенеративными заболеваниями может оказаться терапевтически неэффективным из-за сенесцентного фенотипа глиальных клеток.

Многие из описанных методологических и терапевтических проблем с высокой вероятностью будут разрешены в ближайшее время. Однако для значимого и стойкого терапевтического эффекта при лечении различных заболеваний ЦНС необходима интеграция новых нейронов не только в непосредственной близости к таким нейрогенным зонам, как гиппокамп, но и на большом отдалении от них. Нейрогенез — сложный процесс, жёстко регулируемый с одной стороны, внутренними генетическими программами клеток-предшественников и зрелых нейронов, а с другой — внешними факторами микроокружения. По мере дифференцировки нейроны утрачивают способность к удлинению аксонов вследствие селективного ингибирования факторов миграции и интегринов, уровень экспрессии которых был высоким в период эмбриогенеза [130]. Попытки использовать стволовые клетки костного мозга и эмбриональные клетки ЦНС для лечения травм спинного мозга были успешны в экспериментальных работах на грызунах [131], но клинические испытания не показали значимой эффективности [132]. Также проводились клинические испытания интракраниального введения эмбриональных дофаминергических нейронов в область базальных ганглиев пациентам с болезнью Паркинсона. Несмотря на высокую выживаемость имплантированных клеток, клинического улучшения либо не было, либо оно было нестойким [133, 134]. Очевидно, что точечного вмешательства в конкретный сигнальный путь будет недостаточно для полноценной регенерации повреждённых аксонов в ЦНС взрослых млекопитающих, а воздействие сразу на большое количество генов — это крайне сложная задача с высокими рисками нежелательных последствий. В связи с этим эффективное пронеурональное репрограммирование, особенно у пожилых пациентов с сопутствующими соматическими заболеваниями и сенесцентным фенотипом клеток, пока невозможно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интеграция многоступенчатых и взаимно регулируемых геномных, эпигеномных и биохимических путей, участвующих в процессах клеточной пластичности, обеспечивает основу для адаптации и нормального функционирования тканей, органов и систем. Большое количество сигнальных путей со схожими функциями формирует сложную самоподдерживающуюся и саморегулирующуюся систему, обеспечивающую стабильность всего организма в случае, если один или несколько из этих путей окажутся заблокированными. Краткосрочные и отдалённые последствия внешнего вмешательства в гистогенетические сигнатуры

клеток, особенно когда они затрагивают элементы такой сложной структуры как головной мозг человека, пока изучены недостаточно. Кроме того, существуют фундаментальные препятствия, преодолеть которые пока не удалось. Одно из них — отсутствие возможности обеспечить рост аксонов к регионам ЦНС, значительно удалённым от нейрогенных зон. Необходимы дальнейшие исследования для лучшего понимания основных клеточных и молекулярно-биологических процессов, лежащих в основе клеточной пластичности и трансдифференцировки в физиологических и патологических условиях, а также для совершенствования существующих методов генной терапии с целью обеспечения безопасности и эффективности прямого репрограммирования.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. А.В. Сентябрева — сбор и анализ литературных источников, создание иллюстраций, написание текста и редактирование статьи. Автор одобрил рукопись (версию для публикации), а также согласился нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Благодарности. Автор выражает признательность доктору биологических наук Косыревой Анне Михайловне за консультативную помощь в редактировании обзора.

Источники финансирования. Отсутствует.

Раскрытие интересов. Автор заявляет об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Author's contributions. A.V. Sentyabreva: literature review and analysis, illustration creation, manuscript writing and editing. The author approved the manuscript (final version for publication) and agreed to take responsibility for all aspects of the work, ensuring proper investigation and resolution of any issues related to accuracy and integrity.

Acknowledgements. The author expresses gratitude to Dr. Sci (Biology) Anna M. Kosyreva, for her consultative assistance in editing the review.

Funding sources. None declared.

Disclosure of interests. The author declares no relationships, activities, or competing interests with third parties (commercial or non-commercial) that could be affected by the content of this article within the past three years.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Jorstad NL, Wilken MS, Grimes WN, et al. Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice. *Nature*. 2017;548(7665):103–107. doi: 10.1038/nature23283
2. Qian L, Huang Y, Spencer CI, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*. 2012;485(7400):593–598. doi: 10.1038/nature11044
3. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*. 2010;142(3):375–386. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.002
4. Cavelti-Weder C, Zumsteg A, Li W, Zhou Q. Reprogramming of pancreatic acinar cells to functional beta-cells by in vivo transduction of a polycistronic construct containing Pdx1, Ngn3, MafA in mice. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2017;40:4A.10.1–4A.10.12. doi: 10.1002/cpsc.21
5. Kosyreva AM, Sentyabreva AV, Tsvetkov IS, Makarova OV. Alzheimer's disease and inflammaging. *Brain Sci*. 2022;12(9):1237. doi: 10.3390/brainsci12091237
6. Tai W, Wu W, Wang LL, et al. In vivo reprogramming of NG2 glia enables adult neurogenesis and functional recovery following spinal cord injury. *Cell Stem Cell*. 2021;28(5):923–937.e4. doi: 10.1016/j.stem.2021.02.009
7. Tang Y, Wu Q, Gao M, et al. Restoration of visual function and cortical connectivity after ischemic injury through neurod1-mediated gene therapy. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:720078. doi: 10.3389/fcell.2021.720078
8. Chen YC, Ma NX, Pei ZF, et al. A NeuroD1 AAV-based gene therapy for functional brain repair after ischemic injury through in vivo astrocyte-to-neuron conversion. *Mol Ther*. 2020;28(1):217–234. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.09.003
9. Todd L, Hooper MJ, Haugan AK, et al. Efficient stimulation of retinal regeneration from Müller glia in adult mice using combinations of proneural bHLH transcription factors. *Cell Rep*. 2021;37(3):109857. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109857
10. Le N, Vu TD, Palazzo I, et al. Robust reprogramming of glia into neurons by inhibition of Notch signaling and nuclear factor I (NFI) factors in adult mammalian retina. *Sci Adv*. 2024;10(28):eadn2091. doi: 10.1126/sciadv.adn2091
11. Qian H, Kang X, Hu J, et al. Reversing a model of Parkinson's disease with in situ converted nigral neurons. *Nature*. 2020;582(7813):550–556. doi: 10.1038/s41586-020-2388-4
12. Wu Z, Parry M, Hou XY, et al. Gene therapy conversion of striatal astrocytes into GABAergic neurons in mouse models of Huntington's disease. *Nat Commun*. 2020;11(1):1105. doi: 10.1038/s41467-020-14855-3
13. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*. 2009;32:149–184. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135600
14. Malatesta P, Appolloni I, Calzolari F. Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res*. 2008;331(1):165–178. doi: 10.1007/s00441-007-0481-8
15. Miranda-Negrón Y, García-Arrarás JE. Radial glia and radial glia-like cells: Their role in neurogenesis and regeneration. *Front Neurosci*. 2022;16:1006037. doi: 10.3389/fnins.2022.1006037
16. Howard BM, Mo Z, Filipovic R, et al. Radial glia cells in the developing human brain. *Neuroscientist*. 2008;14(5):459–473. doi: 10.1177/1073858407313512
17. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev*. 2010;20(4):327–348. doi: 10.1007/s11065-010-9148-4

18. Kobat SG, Turgut B. Importance of Müller cells. *Beyoglu Eye J*. 2020;5(2):59–63. doi: 10.14744/bej.2020.28290
19. Yamada K, Watanabe M. Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat Sci Int*. 2002;77(2):94–108. doi: 10.1046/j.0022-7722.2002.00021.x
20. Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science*. 2018;362(6411):181–185. doi: 10.1126/science.aat0473
21. Gage FH, Temple S. Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron*. 2013;80(3):588–601. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.037
22. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 2011;70(4):687–702. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.001
23. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D. *Neuroscience*. 6th ed. New York Oxford: Oxford University Press; 2018.
24. Jurkowski MP, Bettio L, K Woo EK, et al. Beyond the hippocampus and the SVZ: adult neurogenesis throughout the brain. *Front Cell Neurosci*. 2020;14:576444. doi: 10.3389/fncel.2020.576444
25. Ernst A, Alkass K, Bernard S, et al. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*. 2014;156(5):1072–1083. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.044
26. Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, et al. Corridors of migrating neurons in human brain and their decline during infancy. *Nature*. 2011;478(7369):382–386. doi: 10.1038/nature10487
27. Semënov MV. Adult hippocampal neurogenesis is a developmental process involved in cognitive development. *Front Neurosci*. 2019;13:159. doi: 10.3389/fnins.2019.00159
28. Franzén O, Gan LM, Björkegren JLM. PanglaoDB: a web server for exploration of mouse and human single-cell RNA sequencing data. *Database (Oxford)*. 2019;2019:baz046. doi: 10.1093/database/baz046
29. Mori T, Buffo A, Götz M. The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol*. 2005;69:67–99. doi: 10.1016/S0070-2153(05)69004-7
30. Ninkovic J, Steiner-Mezzadri A, Jawerka M, et al. The BAF complex interacts with Pax6 in adult neural progenitors to establish a neurogenic cross-regulatory transcriptional network. *Cell Stem Cell*. 2013;13(4):403–418. doi: 10.1016/j.stem.2013.07.002
31. Ortega F, Gascón S, Masserdotti G, et al. Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nat Cell Biol*. 2013;15(6):602–613. doi: 10.1038/ncb2736
32. Bast L, Calzolari F, Strasser MK, et al. Increasing neural stem cell division asymmetry and quiescence are predicted to contribute to the age-related decline in neurogenesis. *Cell Rep*. 2018;25(12):3231–3240.e8. doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.088
33. Kalamakis G, Brüne D, Ravichandran S, et al. Quiescence modulates stem cell maintenance and regenerative capacity in the aging brain. *Cell*. 2019;176(6):1407–1419.e14. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.040
34. Fuentealba LC, Obernier K, Alvarez-Buylla A. Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):698–708. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.012
35. Baklaushev VP, Yusubalieva GM, Samoilova EM, et al. Resident neural stem cell niches and regeneration: the splendors and miseries of adult neurogenesis. *Russ J Dev Biol*. 2022;53:159–179. doi: 10.1134/S1062360422030080
36. Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, et al. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*. 2018;555(7696):377–381. doi: 10.1038/nature25975
37. Zhou Y, Su Y, Li S, et al. Molecular landscapes of human hippocampal immature neurons across lifespan. *Nature*. 2022;607(7919):527–533. doi: 10.1038/s41586-022-04912-w
38. Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Terreros-Roncal J, et al. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2019;25(4):554–560. doi: 10.1038/s41591-019-0375-9
39. Ojaghihaghghi S, Vahdati SS, Mikaeilpour A, Ramouz A. Comparison of neurological clinical manifestation in patients with hemorrhagic and ischemic stroke. *World J Emerg Med*. 2017;8(1):34–38. doi: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2017.01.006
40. Salmeron KE, Maniskas ME, Edwards DN, et al. Interleukin 1 alpha administration is neuroprotective and neuro-restorative following experimental ischemic stroke. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):222. doi: 10.1186/s12974-019-1599-9
41. Grinchevskaya LR, Salikhova DI, Silachev DN, Goldshtein DV. Neural and glial regulation of angiogenesis in CNS in ischemic stroke. *Bull Exp Biol Med*. 2024;177(4):528–533. doi: 10.1007/s10517-024-06219-4
42. Zheng W, ZhuGe Q, Zhong M, et al. Neurogenesis in adult human brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2013;30(22):1872–1880. doi: 10.1089/neu.2010.1579
43. Bielefeld P, Martirosyan A, Martín-Suárez S, et al. Traumatic brain injury promotes neurogenesis at the cost of astroglialogenesis in the adult hippocampus of male mice. *Nat Commun*. 2024;15(1):5222. doi: 10.1038/s41467-024-49299-6
44. Wu A, Zhang J. Neuroinflammation, memory, and depression: new approaches to hippocampal neurogenesis. *J Neuroinflammation*. 2023;20(1):283. doi: 10.1186/s12974-023-02964-x
45. 2022 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2022;18(4):700–789. doi: 10.1002/alz.12638
46. Schwab L, Richetin K, Barker R, Déglon N. Formation of hippocampal mHTT aggregates leads to impaired spatial memory, hippocampal activation and adult neurogenesis. *Neurobiol Dis*. 2017;102:105–112. doi: 10.1016/j.nbd.2017.03.005
47. Rahman AA, Amruta N, Pinteaux E, Bix GJ. Neurogenesis after stroke: a therapeutic perspective. *Transl Stroke Res*. 2021;12(1):1–14. doi: 10.1007/s12975-020-00841-w
48. Sentyabreva AV, Miroshnichenko EA, Melnikova EA, et al. Morphofunctional changes in brain and peripheral blood in adult and aged Wistar rats with AIC13-induced neurodegeneration. *Biomedicines*. 2023;11(9):2336. doi: 10.3390/biomedicines11092336
49. Virchow R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutr Rev*. 1989;47(1):23–25. doi: 10.1111/j.1753-4887.1989.tb02747.x
50. Virchow R. Ueber Metaplasie. *Archiv f. pathol. Anat*. 1984;97:410–430. doi: 10.1007/BF02430434
51. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins & Cotran pathologic basis of disease*. 10th ed. Elsevier Health Sciences; 2020.
52. Slack JM, Tosh D. Transdifferentiation and metaplasia — switching cell types. *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11(5):581–586. doi: 10.1016/S0959-437X(00)00236-7

53. Slack JMW. Metaplasia and transdifferentiation: from pure biology to the clinic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(5):369–378. doi: 10.1038/nrm2146
54. Jenkins GJS, D'Souza FR, Suzen SH, et al. Deoxycholic acid at neutral and acid pH, is genotoxic to oesophageal cells through the induction of ROS: the potential role of anti-oxidants in Barrett's oesophagus. *Carcinogenesis.* 2007;28(1):136–142. doi: 10.1093/carcin/bgl147
55. Gray MR, Donnelly RJ, Kingsnorth AN. The role of smoking and alcohol in metaplasia and cancer risk in Barrett's columnar lined oesophagus. *Gut.* 1993;34(6):727–731. doi: 10.1136/gut.34.6.727
56. Peters EJ, Morice R, Benner SE, et al. Squamous metaplasia of the bronchial mucosa and its relationship to smoking. *Chest.* 1993;103(5):1429–1432. doi: 10.1378/chest.103.5.1429
57. Sangani RG, Deepak V, Ghio AJ, et al. Peribronchiolar metaplasia: a marker of cigarette smoke-induced small airway injury in a rural cohort. *Clin Pathol.* 2023;16:2632010X231209878. doi: 10.1177/2632010X231209878
58. Ogura Y, Ishii K, Kanda H, et al. Bisphenol A induces permanent squamous change in mouse prostatic epithelium. *Differentiation.* 2007;75(8):745–756. doi: 10.1111/j.1432-0436.2007.00177.x
59. Amin MAS, Sonpol HMA, Gouda RHE, Aboregela AM. Bisphenol A enhances apoptosis, fibrosis, and biochemical fluctuations in the liver of adult male rats with possible regression after recovery. *Anat Rec (Hoboken).* 2023;306(1):213–225. doi: 10.1002/ar.25032
60. Holtzman MJ, Battaille JT, Patel AC. Immunogenetic programs for viral induction of mucous cell metaplasia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;35(1):29–39. doi: 10.1165/rcmb.2006-0092SF
61. Lee JS, Oh TY, Ahn BO, et al. Involvement of oxidative stress in experimentally induced reflux esophagitis and Barrett's esophagus: clue for the chemoprevention of esophageal carcinoma by antioxidants. *Mutat Res.* 2001;480–481:189–200. doi: 10.1016/S0027-5107(01)00199-3
62. Feng C, Luo Y, Nian Y, et al. Diallyl disulfide suppresses the inflammation and apoptosis resistance induced by DCA through ROS and the NF- κ B signaling pathway in human Barrett's epithelial cells. *Inflammation.* 2017;40(3):818–831. doi: 10.1007/s10753-017-0526-4
63. Giroux V, Rustgi AK. Metaplasia: tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia–cancer sequence. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(10):594–604. doi: 10.1038/nrc.2017.68
64. Holmberg D, Ness-Jensen E, Mattsson F, et al. Risk of oesophageal adenocarcinoma in individuals with Barrett's oesophagus. *Eur J Cancer.* 2017;75:41–46. doi: 10.1016/j.ejca.2016.12.037
65. King TC, editor. Front Matter. In: *Elsevier's Integrated Pathology.* Saint Louis: Mosby; 2007. <https://archive.org/details/elseviersintegra0000king>
66. 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
67. Liang G, Zhang Y. Embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell: an epigenetic perspective. *Cell Res.* 2013;23(1):49–69. doi: 10.1038/cr.2012.175
68. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol.* 2008;26(11):1276–1284. doi: 10.1038/nbt.1503
69. Utikal J, Maherali N, Kulalert W, Hochedlinger K. Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 19):3502–3510. doi: 10.1242/jcs.054783
70. Kim JB, Greber B, Araúzo-Bravo MJ, et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature.* 2009;461(7264):649–653. doi:10.1038/nature08436
71. Huang P, Sun L, Zhang L, Hui L. Conversion of fibroblasts to hepatocytes in vitro. *Methods in Mol Biol.* 2019;1905:93–101. doi: 10.1007/978-1-4939-8961-4_9
72. Du J, Liu X, Wong CWY, et al. Direct cellular reprogramming and transdifferentiation of fibroblasts on wound healing — Fantasy or reality? *Chronic Dis Transl Med.* 2023;9(3):191–199. doi: 10.1002/cdt3.77
73. He S, Chen J, Zhang Y, et al. Sequential EMT–MET induces neuronal conversion through Sox2. *Cell Discov.* 2017;3:17017. doi: 10.1038/celldisc.2017.17
74. Singh S, Howell D, Trivedi N, et al. Zeb1 controls neuron differentiation and germinal zone exit by a mesenchymal–epithelial-like transition. *ELife.* 2016;5:e12717. doi: 10.7554/eLife.12717
75. Hu S, Zhao MT, Jahanbani F, et al. Effects of cellular origin on differentiation of human induced pluripotent stem cell–derived endothelial cells. *JCI Insight.* 2016;1(8):e85558. doi: 10.1172/jci.insight.85558
76. Scesa G, Adami R, Bottai D. iPSC preparation and epigenetic memory: does the tissue origin matter? *Cells.* 2021;10(6):1470. doi: 10.3390/cells10061470
77. Hargus G, Ehrlich M, Araúzo-Bravo MJ, et al. Origin-dependent neural cell identities in differentiated human iPSCs in vitro and after transplantation into the mouse brain. *Cell Rep.* 2014;8(6):1697–1703. doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.014
78. Stone NR, Gifford CA, Thomas R, et al. Context-specific transcription factor functions regulate epigenomic and transcriptional dynamics during cardiac reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2019;25(1):87–102.e9. doi: 10.1016/j.stem.2019.06.012
79. Wang H, Yang Y, Liu J, Qian L. Direct cell reprogramming: approaches, mechanisms and progress. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(6):410–424. doi: 10.1038/s41580-021-00335-z
80. Belousova E, Salikhova D, Maksimov Y, et al. Proposed mechanisms of cell therapy for Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci.* 2024;25(22):12378. doi: 10.3390/ijms252212378
81. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007;318(5858):1917–1920. doi: 10.1126/science.1151526
82. Ay C, Reinisch A. Gene therapy: principles, challenges and use in clinical practice. *Wien Klin Wochenschr.* 2024. doi: 10.1007/s00508-024-02368-8
83. Haridhasapavalan KK, Borgohain MP, Dey C, et al. An insight into non-integrative gene delivery approaches to generate transgene-free induced pluripotent stem cells. *Gene.* 2019;686:146–159. doi: 10.1016/j.gene.2018.11.069
84. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2009;458(7239):766–770. doi: 10.1038/nature07863
85. Chao J, Feng L, Ye P, et al. Therapeutic development for Canavan disease using patient iPSCs introduced with the wild-type ASPA gene. *iScience.* 2022;25(6):104391. doi: 10.1016/j.isci.2022.104391
86. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells using synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell.* 2010;7(5):618–630. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.012

87. Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell*. 2011;8(6):633–638. doi: 10.1016/j.stem.2011.05.001
88. Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*. 2013;341(6146):651–654. doi: 10.1126/science.1239278
89. Zhao T, Fu Y, Zhu J, et al. Single-cell RNA-Seq reveals dynamic early embryonic-like programs during chemical reprogramming. *Cell Stem Cell*. 2018;23(1):31–45.e7. doi: 10.1016/j.stem.2018.05.025
90. Chen G, Guo Y, Li C, et al. Small molecules that promote self-renewal of stem cells and somatic cell reprogramming. *Stem Cell Rev Rep*. 2020;16(3):511–523. doi: 10.1007/s12015-020-09965-w
91. Kim JB, Zaehres H, Wu G, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*. 2008;454(7204):646–650. doi: 10.1038/nature07061
92. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*. 2009;136(3):411–419. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.023
93. Ring KL, Tong LM, Balestra ME, et al. Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor. *Cell Stem Cell*. 2012;11(1):100–109. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.018
94. Thier MC, Hommerding O, Panten J, et al. Identification of embryonic neural plate border stem cells and their generation by direct reprogramming from adult human blood cells. *Cell Stem Cell*. 2019;24(1):166–182.e13. doi: 10.1016/j.stem.2018.11.015
95. Xu XL, Yang JP, Fu LN, et al. Direct reprogramming of porcine fibroblasts to neural progenitor cells. *Protein Cell*. 2014;5(1):4–7. doi: 10.1007/s13238-013-0015-y
96. Ahlfors JE, Azimi A, El-Ayoubi R, et al. Examining the fundamental biology of a novel population of directly reprogrammed human neural precursor cells. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):166. doi: 10.1186/s13287-019-1255-4
97. Beattie R, Hippenmeyer S. Mechanisms of radial glia progenitor cell lineage progression. *FEBS Lett*. 2017;591(24):3993–4008. doi: 10.1002/1873-3468.12906
98. El Wazan L, Urrutia-Cabrera D, Wong RCB. Using transcription factors for direct reprogramming of neurons *in vitro*. *World J Stem Cells*. 2019;11(7):431–444. doi: 10.4252/wjsc.v11.i7.431
99. Samoilova EM, Belopasov VV, Baklaushev VP. Transcription factors of direct neuronal reprogramming in ontogenesis and ex vivo. *Mol Biol*. 2021;55:645–669. doi: 10.1134/S0026893321040087
100. Jiang H, Xu Z, Zhong P, et al. Cell cycle and p53 gate the direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Nat Commun*. 2015;6:10100. doi: 10.1038/ncomms10100
101. Qin H, Zhao AD, Sun ML, et al. Direct conversion of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells using small molecules and protein factors. *Mil Med Res*. 2020;7(1):52. doi: 10.1186/s40779-020-00284-2
102. Miskinyte G, Devaraju K, Grønning Hansen M, et al. Direct conversion of human fibroblasts to functional excitatory cortical neurons integrating into human neural networks. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):207. doi: 10.1186/s13287-017-0658-3
103. Rivetti Di Val Cervo P, Romanov RA, Spigolon G, et al. Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nat Biotechnol*. 2017;35(5):444–452. doi: 10.1038/nbt.3835
104. Wang JH, Gessler DJ, Zhan W, et al. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):78. doi: 10.1038/s41392-024-01780-w
105. Dashkoff J, Lerner EP, Truong N, et al. Tailored transgene expression to specific cell types in the central nervous system after peripheral injection with AAV9. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;3:16081. doi: 10.1038/mtm.2016.81
106. Strauss KA, Farrar MA, Muntoni F, et al. Onasemnogene abeparvovec for presymptomatic infants with two copies of SMN2 at risk for spinal muscular atrophy type 1: the Phase III SPR1NT trial. *Nat Med*. 2022;28(7):1381–1389. doi: 10.1038/s41591-022-01866-4
107. Keam SJ. Eladocogene Exuparvovec: first approval. *Drugs*. 2022;82(13):1427–1432. doi: 10.1007/s40265-022-01775-3
108. Hubbard EJA. FLP/FRT and Cre/lox recombination technology in *C. elegans*. *Methods*. 2014;68(3):417–424. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.05.007
109. Fischer KB, Collins HK, Callaway EM. Sources of off-target expression from recombinase-dependent AAV vectors and mitigation with cross-over insensitive ATG-out vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(52):27001–27010. doi: 10.1073/pnas.1915974116
110. Xie Y, Zhou J, Wang LL, et al. New AAV tools fail to detect Neurod1-mediated neuronal conversion of Müller glia and astrocytes in vivo. *EBioMedicine*. 2023;90:104531. doi: 10.1016/j.ebiom.2023.104531
111. Hinderer C, Katz N, Buza EL, et al. Severe toxicity in nonhuman primates and piglets following high-dose intravenous administration of an Adeno-associated virus vector expressing human SMN. *Hum Gene Ther*. 2018;29(3):285–298. doi: 10.1089/hum.2018.015
112. Fader KA, Pardo ID, Kovi RC, et al. Circulating neurofilament light chain as a promising biomarker of AAV-induced dorsal root ganglia toxicity in nonclinical toxicology species. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2022;25:264–277. doi: 10.1016/j.omtm.2022.03.017
113. Buss N, Lanigan L, Zeller J, et al. Characterization of AAV-mediated dorsal root ganglionopathy. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2022;24:342–354. doi: 10.1016/j.omtm.2022.01.013
114. Mueller C, Berry JD, McKenna-Yasek DM, et al. SOD1 Suppression with Adeno-associated virus and microRNA in familial ALS. *N Engl J Med*. 2020;383(2):151–158. doi: 10.1056/NEJMoa2005056
115. Delire B, De Martin E, Meunier L, et al. Immunotherapy and gene therapy: new challenges in the diagnosis and management of drug-induced liver injury. *Front Pharmacol*. 2022;12:786174. doi: 10.3389/fphar.2021.786174
116. Jodele S, Mizuno K, Sabulski A, Vinks AA. Adopting model-informed precision-dosing for Eculizumab in transplant associated-thrombotic microangiopathy to gene therapies. *Clin Pharmacol Ther*. 2023;114(3):511–514. doi: 10.1002/cpt.2966
117. Jodele S, Dandoy CE, Lane A, et al. Complement blockade for TA-TMA: lessons learned from a large pediatric cohort treated with eculizumab. *Blood*. 2020;135(13):1049–1057. doi: 10.1182/blood.2019004218
118. Falese L, Sandza K, Yates B, et al. Strategy to detect pre-existing immunity to AAV gene therapy. *Gene Ther*. 2017;24(12):768–778. doi: 10.1038/gt.2017.95
119. Gross DA, Tedesco N, Leborgne C, Ronzitti G. Overcoming the challenges imposed by humoral immunity to AAV vectors to achieve safe and efficient gene transfer in seropositive patients. *Front Immunol*. 2022;13:857276. doi: 10.3389/fimmu.2022.857276

120. Kishimoto TK, Samulski RJ. Addressing high dose AAV toxicity — 'one and done' or 'slower and lower'? *Expert Opin Biol Ther.* 2022;22(9):1067–1071. doi: 10.1080/14712598.2022.2060737
121. Servais L, Horton R, Saade D, et al. 261st ENMC International Workshop: Management of safety issues arising following AAV gene therapy. 17th–19th June 2022, Hoofddorp, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 2023;33(11):884–896. doi: 10.1016/j.nmd.2023.09.008
122. Liu L, Michowski W, Kolodziejczyk A, Sicinski P. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nat Cell Biol.* 2019;21(9):1060–1067. doi: 10.1038/s41556-019-0384-4
123. Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, et al. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell.* 2011;145(7):1142–1155. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.024
124. Lugert S, Vogt M, Tchorz JS, et al. Homeostatic neurogenesis in the adult hippocampus does not involve amplification of Ascl1(high) intermediate progenitors. *Nat Commun.* 2012;3:670. doi: 10.1038/ncomms1670
125. Jung H, Kim SW, Kim M, et al. Noninvasive optical activation of Flp recombinase for genetic manipulation in deep mouse brain regions. *Nat Commun.* 2019;10(1):314. doi: 10.1038/s41467-018-08282-8
126. Katsuda T, Sussman JH, Ito K, et al. Cellular reprogramming in vivo initiated by SOX4 pioneer factor activity. *Nat Commun.* 2024;15(1):1761. doi: 10.1038/s41467-024-45939-z
127. Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, et al. Chemical risk factors of primary liver cancer: an update. *Hepat Med.* 2021;12:179–188. doi: 10.2147/HMER.S278070
128. Spathopoulou A, Podlesnic M, De Gaetano L, et al. Single-cell profiling of reprogrammed human neural stem cells unveils high similarity to neural progenitors in the developing central nervous system. *Stem Cell Rev Rep.* 2024;20(5):1325–1339. doi: 10.1007/s12015-024-10698-3
129. Mertens J, Paquola ACM, Ku M, et al. Directly reprogrammed human neurons retain aging-associated transcriptomic signatures and reveal age-related nucleocytoplasmic defects. *Cell Stem Cell.* 2015;17(6):705–718. doi: 10.1016/j.stem.2015.09.001
130. Andrews MR, Czvitkovich S, Dassie E, et al. Alpha9 integrin promotes neurite outgrowth on tenascin-C and enhances sensory axon regeneration. *J Neurosci.* 2009;29(17):5546–5557. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0759-09.2009
131. Sasaki M, Radtke C, Tan AM, et al. BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2009;29(47):14932–14941. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2769-09.2009
132. Urdžiková L, Jendelová P, Glogarová K et al. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma.* 2006;23(9):1379–1391. doi: 10.1089/neu.2006.23.1379
133. Freed CR, Zhou W, Breeze RE. Dopamine cell transplantation for Parkinson's disease: the importance of controlled clinical trials. *Neurotherapeutics.* 2011;8(4):549–561. doi: 10.1007/s13311-011-0082-9
134. Sonntag KC, Song B, Lee N, et al. Pluripotent stem cell-based therapy for Parkinson's disease: current status and future prospects. *Prog Neurobiol.* 2018;168:1–20. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.04.005

ОБ АВТОРЕ

* **Сентябрева Александра Владиславовна;**
адрес: Россия, 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3;
ORCID: 0000-0001-5064-219X;
eLibrary SPIN: 6966-9959;
e-mail: alexandraasentyabreva@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHOR'S INFO

* **Alexandra V. Sentyabreva;**
address: 3 Tsyurupy st, 117418, Moscow, Russia;
ORCID: 0000-0001-5064-219X;
eLibrary SPIN: 6966-9959;
e-mail: alexandraasentyabreva@gmail.com