

УДК: 611-013.3:576.3

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma.64495>

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ

© А.В. Москалев¹, Б.Ю. Гумилевский¹, В.Я. Апчел^{1, 2}, В.Н. Цыган¹¹ Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия² Российский государственный педагогический университет имени А.И. Герцена Минобрнауки России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Проблемы трансплантации органов и тканей заключаются в недостатке органов для трансплантации и отторжении трансплантатов. Поэтому изучается вопрос получения органов и тканей для трансплантации с помощью стволовых клеток. Несмотря на то, что эта идея перспективна, она связана со многими проблемами, возникающими из-за сложности системы. Необходимо использовать несколько популяций клеток на подложке со сложным составом питательных сред: питательные вещества, факторы роста, кислород, регуляторные факторы. Необходимо контролировать межклеточные взаимодействия, которые обеспечивают секрецию разнообразных факторов, что способствует дифференцировке стволовых клеток в таких условиях в другие типы тканей. Необходимо поддерживать такую биологическую активность бесконечно долго, чего не происходит в организме. При выполнении этих условий, такой подход тканевой инженерии обеспечивает возможность получения целых органов для имплантации. Однако технические проблемы связаны с повышением адгезии клеток к пластику, наличием универсальной основы для питания клеток, которая может содержать более 100 компонентов. Существует возможность контаминации, что может приводить к серьезным ошибкам в эксперименте. Стволовые клетки должны обладать выраженными мутационными свойствами и способностью к восстановлению теломер. Длительное использование одной и той же питательной среды может приводить к генетическим изменениям и значительно изменять физиологические свойства клеток. Важным аспектом решения этой проблемы может быть криоконсервация. Целевой задачей тканевой биоинженерии является создание цельных искусственных органов или, по крайней мере, участков организованных тканей, которые могли бы быть трансплантированы пациентам. В настоящее время такие операции относительно просты для таких тканей, как искусственная кожа, состоящая из эпидермального и фибробластного слоев, или небольших хрящевых имплантатов, полученных *in vitro*. В одной среде планируется использовать несколько типов клеток в стабильной форме. В этом случае один тип клеток может замещаться другим. Такая стабильность обеспечивается многообразием секретируемых факторов различными типами клеток, обеспечивающих их жизнедеятельность. Децеллюляризация удаляет все компоненты, участвующие в иммунном отторжении трансплантатов, так что это поднимает перспективу создания неограниченного запаса органов для трансплантации. Однако могут развиваться острые реакции, связанные с участием дендритных клеток, макрофагов, нейтрофилов, натуральных киллеров. Начиная с момента пересадки создаются условия для иммунного отторжения, возникающие вследствие оперативного вмешательства с развитием острого воспаления. Интенсивность иммунных реакций против трансплантата во многом зависит от степени несоответствия аллелей главного комплекса гистосовместимости донора и реципиента. Это соответствие исследуется с помощью различных методов, включающих использование антител или секвенирования дезоксирибонуклеиновой кислоты.

Ключевые слова: гены; клеточная дифференцировка; модификации; мутации; нуклеиновые кислоты; сайт; стволовая клетка; плазмиды; промоутер; факторы транскрипции; фенотип; хромосома; транслокация.

Как цитировать:

Москалев А.В., Гумилевский Б.Ю., Апчел В.Я., Цыган В.Н. Проблемы и перспективы использования стволовых клеток в трансплантологии // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2021. Т. 23, № 2. С. 175–186. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma.64495>

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma.64495>

PROBLEMS AND PROSPECTS FOR THE USE OF STEM CELLS IN TRANSPLANTATION

© A.V. Moskalev¹, B.Yu. Gumilevskiy¹, V.Ya. Apchel^{1,2}, V.N. Cygan¹

¹ Military Medical Academy named after S.M. Kirov of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

² A.I. Herzen Russian State Pedagogical University of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT: The problems of organ and tissue transplantation are the lack of organs for transplantation and the rejection of transplants. Therefore, the issue of obtaining organs and tissues for transplantation with stem cells is being studied. Although this idea is promising, it is associated with many problems. To do this, you need to use several populations of cells on a substrate with a complex composition of nutrient environments: nutrients, growth factors, oxygen, regulatory factors. Intercellular interaction is provided by the factors they secrete, or it occurs directly with intercellular contact. This contributes to the fact that stem cells in test tubes can differentiate into other types of tissues and maintain their biological activity indefinitely, which they cannot in vivo. This approach of tissue engineering provides the possibility of obtaining whole organs for implantation. However, technical problems are associated with increased cell adhesion to plastic, the presence of a universal basis for cell nutrition, which can contain more than 100 components. There is a possibility of contamination, which can lead to serious errors in the experiment. Stem cells must have distinct mutational properties and the ability to restore telome cells. Prolonged use of the same nutrient medium can lead to genetic changes and significantly alter the physiological properties of cells. Cryopreservation can be an important aspect of the solution. The goal of tissue bioengineering is to create whole artificial organs, or at least areas of organized tissue that could be transplanted to patients. Currently, such operations are relatively simple for tissues such as artificial skin consisting of epidermal and fibroblast layers, or small cartilage implants obtained in vitro. Several cell types in stable shape are planned to be used in one environment. In this case, one type of cell can be replaced by another. This stability is provided by a variety of secreted factors by different types of cells that ensure their vitality. Decellularization removes all components involved in immune rejection of grafts, so this raises the prospect of creating an unlimited supply of organs for transplantation. However, acute reactions can develop associated with the participation of dendritic cells, macrophages, neutrophils, natural killers. Starting from the moment of transplantation, conditions for immune rejection are created, arising as a result of surgery with the development of acute inflammation. The intensity of immune reactions against the graft largely depends on the degree of non-conformity of alleles of the main complex of histocompatibility capacity of the donor and recipient. This match is studied using a variety of methods, including the use of antibodies or sequencing of deoxyribonucleic acid.

Keywords: cellular differentiation; chromosome; genes; modification; mutation; nucleic acids; phenotype; plasmids; promoter; site; stem cells; transcriptional factors; translocation.

To cite this article:

Moskalev AV, Gumilevskiy BYu, Apchel VYa, Cygan VN. Problems and prospects for the use of stem cells in transplantation. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2021;23(2):175–186. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma.64495>

Исследователи всегда искали возможность поддержать жизнедеятельность клеток, микроорганизмов (вирусы, хламидии и др.) вне организма, т. е. *in vitro*. Такими вариантами стали культуры клеток (КК) и тканей (КТ). КТ в настоящее время применяются для изучения биологии стволовых клеток (СК). Так, эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), которые и сами являются КТ, в эмбриональном периоде очень недолговечны и дифференцируются в другие клетки. Полученные из плюрипотентных СК (ПСК) такие клетки, как дофаминовые нейроны, гепатоциты, β -клетки поджелудочной железы, требуют для поддержания их жизнедеятельности очень сложных протоколов КТ. Поэтому использование в терапии клеточной суспензии СК путем простой инъекции мало эффективно, так как сопряжено с гибелью большого количества клеток. Более эффективным методом введения СК является их имплантация на биологическом носителе [1–3].

«Золотым правилом» развития целых органов для трансплантации является их рост среди нескольких популяций клеток на подложке со сложным составом КТ. Клетки растут на определенном субстрате, в конкретной среде, которая содержит необходимые питательные вещества, факторы роста, кислород (O_2), многочисленные регуляторные факторы. Межклеточное взаимодействие обеспечивают секретируемые ими факторы, или это

происходит непосредственно межклеточным контактом. Оценку состояния клеток обычно осуществляют с использованием фазово-контрастной микроскопии, что обеспечивает хороший оптический эффект и четкую визуализацию клеток. Рост некоторых клеток показан на рис. 1. Также очень важно понимать, что клетки в культуре далеко не всегда обладают теми же биологическими эффектами, что в естественных условиях [4–6].

Так, например, нейросферы, содержащие СК нервной системы, могут культивироваться в отделах центральной нервной системы (ЦНС), которые не содержат СК. А мезенхимальные СК костного мозга, являющиеся предшественниками костной ткани *in vivo*, в условиях пробирки могут еще дифференцироваться в адипоциты или гладкомышечные клетки. ЭСК *in vitro* могут поддерживать свою биологическую активность бесконечно долго в плюрипотентном состоянии, но *in vivo* они быстро снижают свой потенциал. Это связано с тем, что компоненты, используемые для поддержания жизнедеятельности КТ *in vitro* (факторы роста, гормоны и др.), весьма разнообразны и способствуют делению клеток, в то время как микроокружение СК *in vivo* способствует сохранению ими минимальной биологической активности [7, 8].

КТ является высокоселективной средой, в которой клетки, имеющие преимущества в дифференцировке и росте, быстро достигают максимального количества,

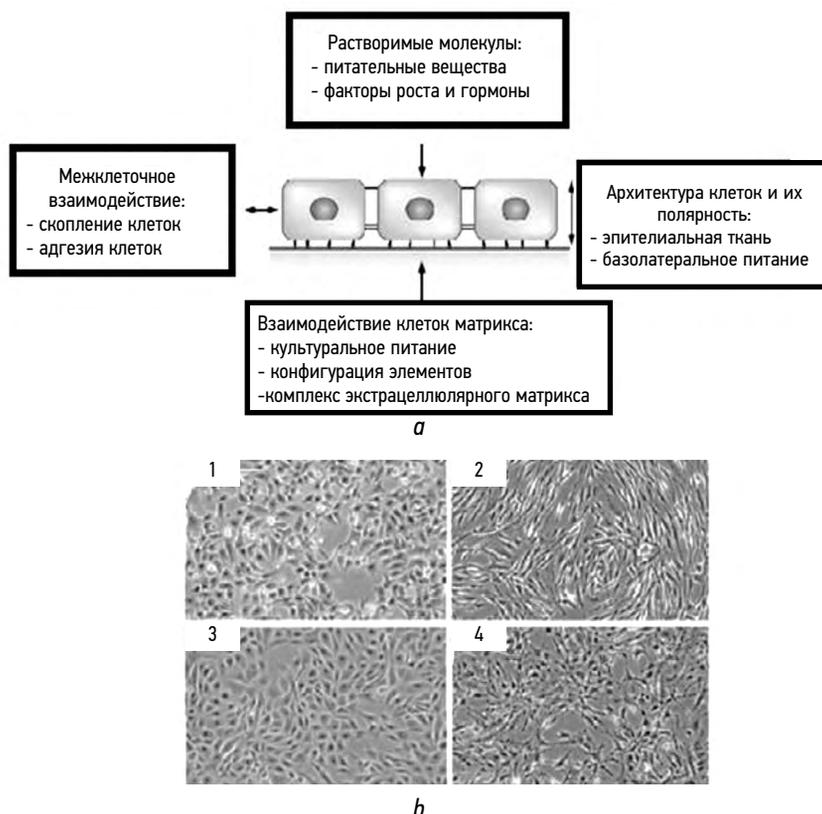


Рис. 1. Тканевые культуры: *a* — контроль клеточного микроокружения *in vitro*; *b* — различные типы клеток в культуре. 1 — эпителиальные (HeLa); 2 — фибробласты (молочной железы человека); 3 — эндотелиальные (CPAE), 4 — астроциты (человека)

Fig. 1. Tissue culture: *a* — control of the cellular environment *in vitro*; *b* — various cell types in culture. 1 — epithelial (HeLa); 2 — fibroblastic (human mammary); 3 — endothelial (CPAE); 4 — astrocytes (human)

преобладают в культуре и могут изменить окончательный клеточный состав. Отдельные виды клеток, подлежащих отбору, могут появляться в результате эпигенетических изменений или соматических мутаций и представляют собой закрепленные изменения от исходного типа клеток. Технология создания КТ с 1990-х годов превратилась в отдельную дисциплину. В ней для получения частей органа или тканей использовались количественные изменения, а также новые методы, такие как литография или 3D-печать. Первоначально предполагалось, что с помощью тканевой инженерии возможно получить целые органы для имплантации. Это, как мы знаем в настоящий момент, оказалось более трудоемкой задачей, чем предполагалось ранее [8, 9].

В лабораторных условиях клетки обычно выращивают в небольших 96-луночных полистироловых планшетах (контейнерах), к стенкам которых клетки не адсорбируются и которые легко стерилизуются облучением. Для повышения адгезии клеток к пластику используют белки микроокружения — витронектин и фибронектин, которые контактируют с пластиком и тем самым повышают адгезию клеток. Также используют роликовые флаконы, которые называют «фабрики клеток». Роликовые цилиндрические бутылки вращаются непрерывно, что позволяет при небольшом количестве среды обработать всю площадь цилиндра с растущими клетками. Для крупномасштабного производства клеток необходимо использовать биореактор, позволяющий осуществлять непрерывный мониторинг среды, температуры, потоки газов. Такие биореакторы используются в фармацевтической промышленности для получения моноклональных антител или рекомбинантных белков из КК млекопитающих. Эти принципы биоинженерии могут быть использованы для производства СК [8, 10].

Выбор питательной среды для КК зависит от конкретных поставленных целей. Существует широкий спектр питательных сред: от простых «минимальных» сред, содержащих около 30 компонентов до богатых смесей, содержащих более 100 компонентов, но все они нуждаются в O_2 для окислительного метаболизма и генерации аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Для предотвращения повреждения клеток образующимися активными формами O_2 , при выращивании СК обычно используется концентрация O_2 около 5% или ниже. Большинство инкубаторов для КК работает при температуре 37 °С. Содержание микроэлементов, солей также обычно приближается к их содержанию в плазме крови. Поскольку вода может проходить через плазменные мембраны клеток животных, осмолярность питательной среды должна соответствовать клеточной. Иначе клетки могут набухать и повреждаться из-за осмотической разницы давления. Осмолярность питательных сред для культур клеток обычно — 350 мОсм/л. Натрий и калий поддерживают мембранный потенциал эритроцитов около 10 мВ и около 90 мВ в клетках мышечных волокон и нейронах. Магний

является компонентом многих ферментов и поддерживает вторичную структуру нуклеиновых кислот. Обычно цитоплазматические уровни ионов кальция очень низки и незначительные изменения их уровня могут приводить к серьезным биологическим дефектам. Инкубаторы обычно содержат около 5% углекислого газа (CO_2) [8, 11].

Одним из часто используемых буферов является Нерес (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), рН которого около — 7,4, хотя он может быть токсичным для некоторых типов клеток. Другой часто используемой питательной средой является среда Leibovitz L15, в состав которой входят в качестве буферизации аминокислоты и она не нуждается в повышенной концентрации CO_2 . Уровни глюкозы в составе питательных сред должны соответствовать уровням плазмы крови — 5,5 ммоль/л. Среды должны содержать незаменимые аминокислоты, такие как глутамин, которые клетки млекопитающих не могут синтезировать. Большинство питательных сред содержат 10% эмбриональную сыворотку теленка (ЭСТ), что обеспечивает выполнение широкого спектра функций, связанных с компонентами сыворотки — фактором роста тромбоцитов, инсулином, витаминами, незаменимыми жирными кислотами (НЖК) и микроэлементами. Высокое содержание белка в сыворотке обеспечивает и механическую защиту клеток, дополнительную емкость рН-буферизации и нейтрализацию токсинов. Питательная среда для культур клеток (ПСКК), содержащая большое количество питательных веществ, является идеальной средой для роста бактерий и грибов. Для предотвращения контаминации все работы с ПСКК проводят в помещениях 2-го класса чистоты (безопасности) или ламинарных шкафах с использованием обычно пенициллина, стрептомицина для бактерий и амфотерицина В — для грибов. Гентамицин, имеющий более широкий антибактериальный спектр действия, используется для работы с потенциально контаминированным материалом. Однако антибиотики могут быть токсичными для ПСКК. Из бактериальных агентов серьезной проблемой контаминации являются микоплазмы, которые устойчивы к пенициллину. Кроме микробного обсеменения необходимо учитывать возможность контаминации одной клеточной линии КК другой. Если в помещении проводятся работы более чем с одной линией КК, то существует реальная опасность их контаминации, что в итоге может приводить к серьезным ошибкам в исследовательской работе [8, 12].

Наиболее важными компонентами питательной среды для КК являются альбумин, липиды (триглицериды, НЖК, фосфолипиды, холестерин), инсулин, трансферрин, селен и антиоксидант, такой как 2-меркаптоэтанол. Однако оптимальной питательная среда будет только тогда, если она создана для конкретной цели. Полученные КК часто имеют некоторые характерные отличия от клеток *in vivo*. Учитывая, что КК является весьма чувствительной средой, то если не соблюдать меры предосторожности

они могут прорасти фибробластами. Кроме того, КК имеет и определенный период жизнедеятельности. Это может быть связано с уменьшением теломер на концах хромосом при каждом делении клетки, что, в конечном итоге, приводит к повреждению хромосом и к постепенному накоплению ингибиторов циклинзависимых киназ (cyclin-dependent kinase inhibitors — Cdk), таких как p16 и p21, подавляющих клеточный цикл. Полученные клетки должны обладать мутационными свойствами к неограниченному делению, поэтому они тестируются на способность к восстановлению теломер, способствующих благоприятному делению клеток и отсутствие накопления ингибиторов Cdk. Фенотип полученных КК может отличаться от фенотипа родительских клеток, но они могут сохранять отдельные свойства, что используется в дальнейших экспериментах. Типичная кривая роста клеточной линии в культуре подчиняется общим закономерностям [13, 14]. Поэтому основная задача — обеспечить их нахождение в лог-фазе как можно более длительное время. В этом заключаются основные различия между клетками, полученными в КТ и клетками *in vivo*. Клетки *in vivo* практически никогда не подвергаются экспоненциальному росту. Обычно они неподвижны, находятся в покое или медленно растут. Субкультивирование сопровождается добавлением трипсина в питательную среду, который разрушает большую часть внеклеточного и клеточного белка, тем самым способствуя осаждению клеток и приобретению ими сферической формы в суспензии [15, 16].

В настоящее время используются более мягкие протеазные смеси вместо трипсина. Степень разведения клеток субкультуры зависит от их физиологических характеристик. Обычно используются разведения от 1:2 до 1:10. Более высокие разведения приводят к гибели клеток, так как физиологическое состояние клеток во многом зависит от собственных экспрессируемых факторов роста. Поэтому клонирование клеток, т. е. получение клона клеток из одной изолированной клетки часто затруднено, требует качественного состава питательных сред и тщательного ухода. Нередко считается, что клонированные клетки в культуре — это СК, но далеко это не всегда так [8, 16].

Нельзя длительное время культивировать клетки в одной и той же среде. Это неизбежно приводит к генетическим изменениям из-за соматических мутаций и в конечном итоге может значительно изменять физиологические свойства клеток. Длительное культивирование также повышает риск микробной контаминации или перекрестного загрязнения другими клеточными линиями. Кроме того, первичные линии клеток имеют определенную продолжительность жизни и будут стареть, приближаясь к своему физиологическому жизненному пределу. Криоконсервация является стандартным методом хранения живых клеток. После замораживания и снижения температуры до уровня ниже $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ флаконы хранятся в жидком азоте, который имеет температуру

кипения — $196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Хранение может быть допущено и в паровой фазе жидкого азота с температурой кипения около $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ [15, 16].

Для восстановления флаконы быстро нагревают до 37°C и тем самым ростовая среда разбавляется. При этом часть клеток погибает, но в целом консервация линии надежна. Для изолированной первичной линии клеток, чтобы не она не была потеряна или контаминирована создается банк клеток. При выявлении дефектных клеток, они заменяются клетками из других рабочих флаконов. Это позволяет сохранить высокую производительность клеток и консервировать их в хорошем состоянии. Такой банк клеток можно использовать в течение нескольких лет. Созданная линия клеток будет генерировать аналогичные клетки из новой первичной изоляции [12, 16].

Поскольку клетки, полученные из культивируемых СК, начали поступать в клиники для трансплантационной терапии, нормативные требования к ним значительно возросли. Необходимо, чтобы клетки были получены с использованием «Хорошей производственной практики» (Good Manufacturing Practice — GMP). Все компоненты, используемые для выращивания клеток, должны иметь ясное происхождение, а все манипуляции осуществляться с использованием утвержденных стандартных процедур. Белки животных заменяются рекомбинантными эквивалентами. Все манипуляции должны проводиться в стерильных боксах с автономной фильтрацией воздуха. Затраты на получение СК с использованием GMP являются гораздо более высокими по сравнению с обычной лабораторной практикой. Поэтому для более широкого использования СК в клинике остро стоит необходимость внедрения в процедуру получения клеток на основе GMP как можно больше менее дорогостоящих элементов [17, 18].

Большинство дифференцированных клеток в культуре не делятся, поэтому после дифференциации они статичны, пока не будут использоваться в эксперименте. Методы, которые индуцируют дифференцировку клеток в культуре тканей разнообразны, часто они подбираются эмпирически. Например, клетки мыши линии C2C12, состоящей из миобластов, могут дифференцироваться в мышечные трубочки, если ЭСТ заменяется сывороткой лошади. Близкие клетки к эритролейкемической клеточной линии могут дифференцироваться в эритроциты, если их обработать диметилсульфоксидом. Использование ПСК требует разработки методов тщательного контроля их дифференциации. Такие протоколы многоступенчатые, включают обработку клеток в соответствующие периоды со сменой 8 питательных сред, содержащих специфические ингредиенты, факторы роста, молекулы агонистов и антагонистов. Большинство КТ включает выращивание клеток на плоских, двухмерных поверхностях или в подложке. Разработаны различные методы выращивания культур в трех измерениях (рис. 2). Имеется достаточный опыт получения *in vitro* рудиментов

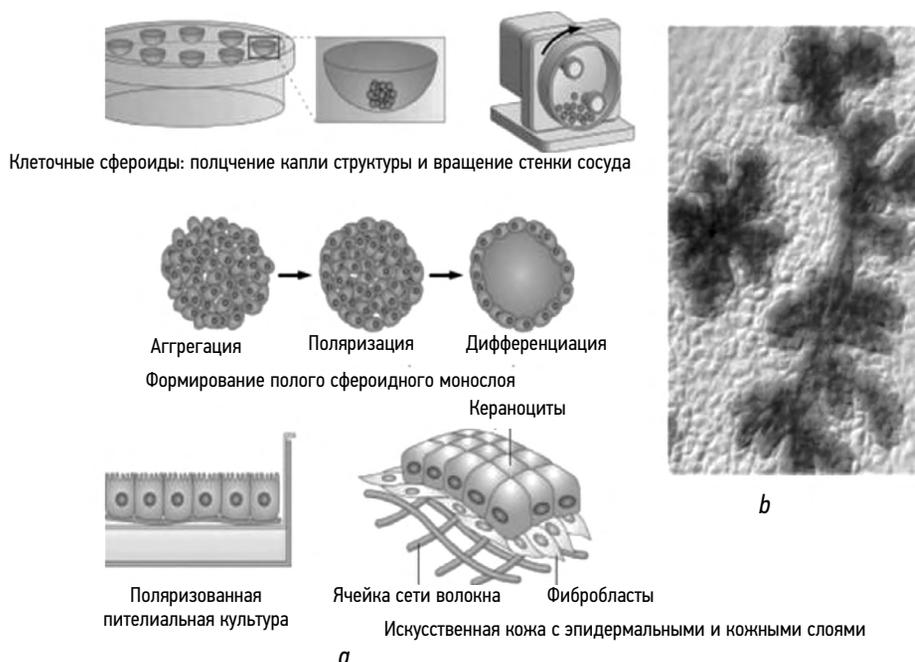


Рис. 2. Варианты выращивания клеток в трехмерных конфигурациях: *a* — трехмерное измерение соединяет промежуток между клеточной культурой и живой тканью; *b* — ткань поджелудочной железы. Затемненный эпителий — β -галактозидаза; мезенхима — не затемненная

Fig. 2. Cell growth variants in three-dimensional configurations: *a* — various procedures for growing cells in three dimensional configurations; *b* — pancreatic tissue. Darkened epithelium — β -galactosidase; mezenhima — not blacked out

органов (почки, легкого, слюнной железы) из эмбрионов млекопитающих [8, 18].

Полученные КК имеют короткую продолжительность жизни и используются для изучения этапов развития. Они состоят из нескольких типов клеток, плотно контактирующих друг с другом. Хотя такие клетки увеличиваются в размерах, их продолжительность жизни гораздо меньше жизни нормальных клеточных структур и прекращается практически сразу после эксперимента. Опыт получения эмбриональной ткани органов привел к выработке двух новых методов: использование 3D-субстратов, таких как коллагеновые гели и культуры эксплантов на пористом фильтре с интерфейсом воздух — среда. Ключевым требованием для 3D-культуры является наличие соответствующего субстрата. Коммерческая матричная среда — Matrigel широко используется для получения 3D-культур. Она состоит из матрицы, выделяемой клетками Энгельбрет–Холм–Рой (Engelbreth–Holm–Swarm). Она остается жидкой при низкой температуре, но переходит в гель при температуре 37 °C и является высокоэффективной средой для КК. Выявлены различия в физиологических особенностях КК в Matrigel и на пластике. Например, эпителиальные клетки почек собаки Мадин–Дерби (Madin–Derby) в среде Matrigel формируют поляризованные кисты, а при использовании фактора роста гепатоцитов будут формировать разветвленные сосуды и каналы [19, 20].

Важная информация была получена о способности человеческих ПСК генерировать хорошо организованные зачатки органов в культуре, включая слоистые части

сетчатки или коры головного мозга. Среда Matrigel достаточно универсальная, а для СК необходимы среды, которые можно было бы использовать в узконаправленных целях. Один из таких подходов состоит в получении гидрогелей с использованием полимеров молочной кислоты или полиэтиленгликоля, способных поглощать большое количество воды для получения свободной матрицы, обеспечивающих эффективную диффузию питательных веществ и газов. Химический состав, полимеризационные характеристики гидрогеля определяют его пористость и жесткость. Используемые полимеры, как правило, не обладают высокими адгезионными характеристиками к клеткам. Но адгезия может быть повышена добавлением фибронектина [20, 21].

Существующая технология фотолитографии может быть использована для формирования матрицы в необходимой форме, готовой к использованию. Примером такой сложной модели спроектированной ткани может быть биотехнологическое получение клеток кишечника (рис. 3) [18].

На рис. 3 видно, что слой эпителиальный клеток кишечника сорбирован на многослойной пористой мембране. Под ним находится гидрогель, содержащий каналы с эндотелиальными клетками для имитации кровеносных сосудов. Питательная среда непрерывно циркулирует через эти сосуды, которые подвергаются перистальтике, периодически эвакуируя образующиеся вакуумные пузырьки с обеих сторон. Для приближения к естественной ситуации *in vivo* на поверхностный клеточный слой добавляются облигатные бактерии кишечника.

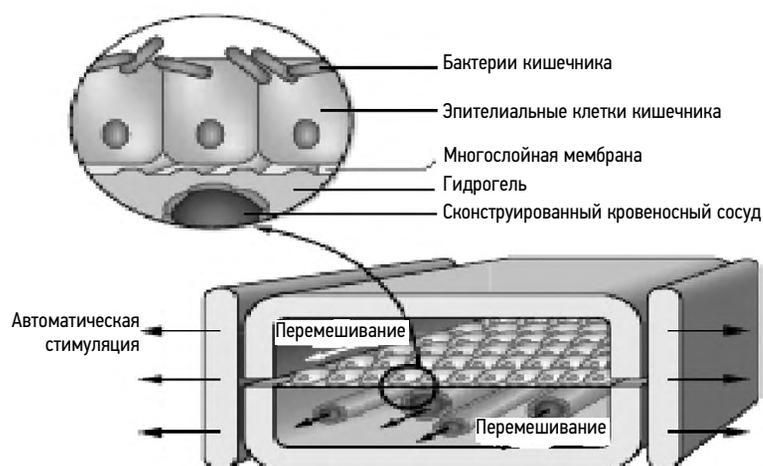


Рис. 3. Биотехнология искусственного синтеза клеток кишечника

Fig. 3. Bioengineering approaches to guide stem cell-based organogenesis

Целевой задачей тканевой биоинженерии является создание цельных искусственных органов или, по крайней мере, участков организованных тканей, которые могли бы быть трансплантированы пациентам. В настоящее время такие операции относительно просты для таких тканей, как искусственная кожа, состоящая из эпидермального и фибробластного слоев, или небольших хрящевых имплантатов, полученных в пробирке. Для решения более серьезных трансплантационных задач необходимо преодолеть многие проблемы. Одной из них является получение клеток, таких как нейроны или кардиомиоциты, являющихся постмитотическими и, которые не растут ни *in vivo*, ни *in vitro*. В настоящее время вырастить дифференцированные клетки человека особенно трудно. Существующие методы нуждаются в совершенствовании. В одной среде планируется использовать несколько типов клеток в стабильной форме. В этом случае один тип клеток может замещаться другим. Такая стабильность обеспечивается многообразием секретируемых факторов различными типами клеток, обеспечивающих их жизнедеятельность. То есть каждый тип клеток секретирует факторы, необходимые для жизнедеятельности другого. Еще одной проблемой является питание клеток и последующее удаление отходов путем диффузии. Также выращиваемая структура должна самостоятельно поддерживать себя в стабильном состоянии: если нет роста клеток, то гибель целого имплантата неизбежна [21].

Тем не менее рост клеток должен способствовать их обновлению и поддерживаться в стабильном состоянии, который не должен быть неконтролируемым, так как это может индуцировать опухолеассоциированные процессы. Несмотря на то, что в последние годы разработаны два новых подхода к созданию 3D-структур, перечисленные проблемы, к сожалению, еще полностью не решены. Хотя этому способствуют 3D-печать и рецеллюляризация децеллюлярных органов. 3D-печать клеток соответствует тому же принципу, что и 3D-печать физических

объектов. Необходимая структура формируется слоями с помощью устройства, похожего на струйный принтер, и управляется программой, содержащей необходимую цифровую информацию для требуемой структуры [11, 14].

Этот метод был опробован для создания фрагментов костей и скелетных мышц, которые были успешно привиты животным. Если формируемый орган обрабатывать в течение нескольких дней 1% раствором додецилсульфата натрия, большинство клеточных элементов растворяется и элиминируется, оставляя только внеклеточный материал. Идея заключается в том, что клетки соответствующих типов могут быть повторно введены в децеллюляризованную структуру. К примеру, это могут быть клетки человека, введенные в децеллюлярное сердце свиньи. Децеллюляризация удаляет все компоненты, участвующие в иммунном отторжении трансплантатов, так что это поднимает перспективу создания неограниченного запаса органов для трансплантации. Однако есть существенная проблема повторного восстановления клеток. Так, кровеносные сосуды выстланы эндотелиальными клетками, некоторые из них мигрируют из канальцев кровеносных сосудов в матрицу, что приводит к затруднению прямого введения в матрицу новых клеток, которая достаточно прочная. Тем не менее децеллюляризация и рецеллюляризация, вероятно, будут важным путем для создания небольших трансплантатов тканей [22, 23].

Иммунная система (ИС) позвоночных животных эволюционировала для противодействия инфекциям, но она также является главным барьером при трансплантации клеток, тканей от одного индивидуума другому. Поэтому целью многочисленных исследований СК является получение клеток для трансплантации и изучение вопросов, связанных с механизмами отторжения. Эти вопросы касаются послеродовых организмов, так как у эмбрионов до развития ИС отторжения трансплантатов нет. Ауто-трансплантаты генетически идентичны, не вызывают иммунного ответа и не отторгаются. Изотрансплантаты (мышы одной инбредной линии) генетически близки

и, как правило, тоже не вызывают отторжения. Аллотрансплантаты (клетки, ткани от разных индивидуумов, принадлежащих одному и тому же роду) вызывают иммунный ответ и отторгаются [1, 3, 11].

Аллотрансплантаты отличаются вариабельностью генов (аллелей), которые локализируются в многочисленных генетических локусах. Генетический локус считается полиморфным в популяции, если он встречается во многих аллелях и с высокой частотой. Особенно важным для отторжения трансплантата является полиморфизм главного комплекса гистосовместимости (ГКГ), который имеется у всех позвоночных животных. У человека он называется Human Leukocyte Antigen (HLA). В организме есть определенные сайты, где иммунные реакции протекают с низкой интенсивностью и трансплантаты не отторгаются. В частности, это касается глаз и в некоторой степени мозга. Причины такой «иммунной привилегии» сложны и неоднозначны. В первую очередь это связано с низким присутствием в этих участках факторов, обладающих эффекторными функциями. В развитии реакций отторжения трансплантата участвуют механизмы как врожденного (ВИ), так и адаптивного иммунитета (АИ). Механизмы ВИ быстро распознают чужеродные антигены и запускают реакции отторжения. В первую очередь это связано с натуральными киллерами (НК). Механизмы АИ способны распознавать практически любую чужеродную молекулу с последующим развитием специфического иммунного ответа. Несмотря на то, что механизмы АИ развиваются гораздо медленнее врожденных реакций, они гораздо масштабнее. В этих реакциях принимают участие не только цитотоксические клетки, но и специфические антитела, направленные против антигенов трансплантата. Большое значение имеют и образующиеся клетки памяти [1, 2].

В настоящее время в мире ежегодно проводится около 100 тыс. трансплантаций органов, это число могло бы быть выше, если бы были решены две основные проблемы. Это — нехватка донорских органов, отторжение трансплантата, связанное с неэффективной иммуносупрессией. Жизнедеятельность СК имеет потенциал для решения обеих проблем. Если клеточные, тканевые, органные трансплантаты получены из индуцированных ПСК пациента, то в теории они должны быть идеальным иммунологическим материалом, не требующим проведения иммуносупрессии. Кроме того, современные технологии получения СК *in vitro* позволяют получить их в достаточном количестве для преодоления нехватки донорских органов. Полноценно решить эти проблемы пока не позволяют как практические, так и финансовые препятствия [23, 24].

Ключевую роль в АИ играют Т-лимфоциты и их Т-клеточные рецепторы (ТКР), распознающие антигены. Рецепторы субпопуляций Т-лимфоцитов значительно различаются между собой, так как они образуются после процесса реаранжировки ДНК. Каждый рецептор — это гетеродимер, образованный α - и β -цепями. А каждая

цепь транскрибируется из гена, собранного в конкретной клетке из многих областей кодирования в геноме. α -цепь состоит из последовательностей $V\alpha$ -, соединенных с $J\alpha$ -последовательностями. β -цепь состоит из $V\beta$ -, $D\beta$ - и $J\beta$ - последовательностей, каждая из которых выбрана из большого ансамбля последовательностей зародышевых линий. ТКР экспрессирован на поверхности клетки как корецептор, состоит из четырех цепей, необходимых для выполнения функций ТКР и называется CD3. Разрезание последовательностей ДНК осуществляется лимфоцит-специфическими нуклеазами, кодируемыми рекомбиназами активирующих генов (Recombinase Activating Genes — *RAG1* и *RAG2*). Последующее соединение последовательностей осуществляется набором ферментов, участвующих в естественном восстановлении ДНК. Поэтому количество образующихся возможных рецепторов Т-лимфоцитов чрезвычайно велико и способно распознавать огромное количество вероятных антигенов. Среди большого количества Т-лимфоцитов выделяют две основные субпопуляции: CD4-хелперы-индукторы и CD8-цитотоксические лимфоциты [1–3, 25].

В иммунологической толерантности выделяют два варианта — центральный (в тимусе, костном мозге) и периферический. Для развития центральной толерантности необходимо ввести соответствующий антиген в тимус до основной фазы созревания Т-лимфоцитов и поддерживать его концентрацию на протяжении всей жизни. Периферическая толерантность связана с инактивацией клонов конкретных Т-лимфоцитов из-за недостаточной ко-стимуляции или чрезмерного коингибирования. Периферическая толерантность развивается при различных обстоятельствах, однако трансплантаты требуют пожизненного проведения иммуносупрессии.

В большинстве случаев Т-лимфоциты не могут распознавать антигены самостоятельно, а только в комплексе с молекулами ГКГ. Выделяют две основные группы локусов: класс I и класс II. Белковые молекулы, кодируемые генетическими локусами A, B и C находятся на поверхности практически всех клеток и тканей, за исключением эритроцитов и трофобласта, хотя большинство антигенов представляется для распознавания Т-лимфоцитам дендритными клетками и макрофагами. Чужеродные белки помещаются в сайт молекулы ГКГ I класса, клеточная мембрана инвагинируется, и белок помещается в эндоплазматический ретикулум, а затем транспортируется на поверхность клетки, где представляется в сочетании с костимулирующими CD80 и CD86. Этот комплекс распознается CD8-лимфоцитами, имеющими комплементарный ТКР (корецептор CD3 с гликопротеином CD8) белкам ГКГ I класса [2, 25].

Гены HLA II класса имеют локусы DP, DQ, DR, DM. Они экспрессированы на В-лимфоцитах, дендритных клетках (ДК), моноцитах и макрофагах (МФ). Также их экспрессируют клетки эндотелия, особенно при стимуляции их интерфероном γ (IFN γ), а также некоторые

эпителиальные клетки. Биологическая роль молекул ГКГ II класса заключается в оказании помощи Т-клеткам, распознающим эти пептиды/молекулы ГКГ II класса/костимулирующий комплекс с помощью собственного комплекса ТКР/CD3/CD4 (рис. 4).

Эта система была разработана эволюционно для элиминирования патогенов, особенно микроорганизмов, использующих внутриклеточный тип паразитирования. Такая система приводит к гибели инфицированных клеток несколькими способами. Это очень важно для понимания механизмов отторжения трансплантатов, так как Т-лимфоцит воспринимает пептидные антигены трансплантата, особенно из аллогенных молекул ГКГ трансплантируемых клеток как инородные. Подобная ситуация возникла из-за широкого полиморфизма ГКГ. Однако вполне возможно, что полиморфизм одновременно увеличивает потенциал распознавания Т-лимфоцитов на уровне популяции и, следовательно, позволяет сохранять биологическую активность других лимфоцитов в популяции и распознавать другие патогены. Однако эта проблема по-прежнему еще обсуждается в сфере эволюционной биологии [1, 4].

Стимуляция Т-клеток приводит к фосфорилированию цитоплазматической области комплекса CD3 и это активирует несколько внутренних путей трансдукции сигнала, особенно инозитол трисфосфат (IP₃)/протеинкиназа С (PKC)/митоген активированный белок (MAPK) и обмен белков Ras и Rac семейства гуанозинтрифосфата (GTP). Важным этапом конечной трансдукции сигнала является повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция, вызванная IP₃. Повышенная концентрация кальция в сочетании с кальмодулином активирует белок кальцинеурин. Это дефосфорилирует группу транскрипционных факторов, ядерных факторов активированных

Т-лимфоцитов (NAFTs), способствуя их попаданию в ядро клетки. Ключевой мишенью NAFTs является ген, кодирующий синтез IL2. Поэтому активированные Т-лимфоциты секретируют IL2, способствуя собственной пролиферации. Процесс активации CD8-лимфоцитов и Т-хелперов аналогичен. В обоих случаях клоны клеток, осуществляющих специфическое распознавание антигена, пролиферируют в течение нескольких дней, способствуя отторжению трансплантата. Кроме того, в процессе активации образуется дополнительная популяция клеток с ТКР — клетки-памяти, которые могут быть активированы в очень короткие сроки в случае получения повторного стимула той же природы. Поэтому повторный трансплантат от одного и того же человека отторгается гораздо быстрее, чем первый. CD8-лимфоциты секретируют белки-перфорины, которые разрушают трансплантированные клетки. Они формируют каналы в мембране клеток-мишеней, через которые внутрь клетки поступают протеазы, активирующие систему каспаз, и тем самым способствуют апоптозу клеток. Т-хелперы за счет секреции целого пула цитокинов-хемокинов активируют и привлекают к трансплантату другие клетки с эффекторными функциями, в том числе фагоциты. Часть Т-хелперов становится регуляторными Т-лимфоцитами (T-reg), которые подавляют или снижают интенсивность конкретных иммунологических реакций. Также Т-хелперы имеют решающее значение в секреции антител В-лимфоцитами [1, 2].

В-лимфоциты секретируют иммуноглобулины после перегруппировки ДНК. Варибельные участки предназначены для соединения с ДНК различных последовательностей зародышевых линий, что осуществляется RAG1 и RAG2-нуклеазами. Зрелые В-лимфоциты несут на своей поверхности иммуноглобулиновые рецепторы изотипов М и D, которые также своими варибельными

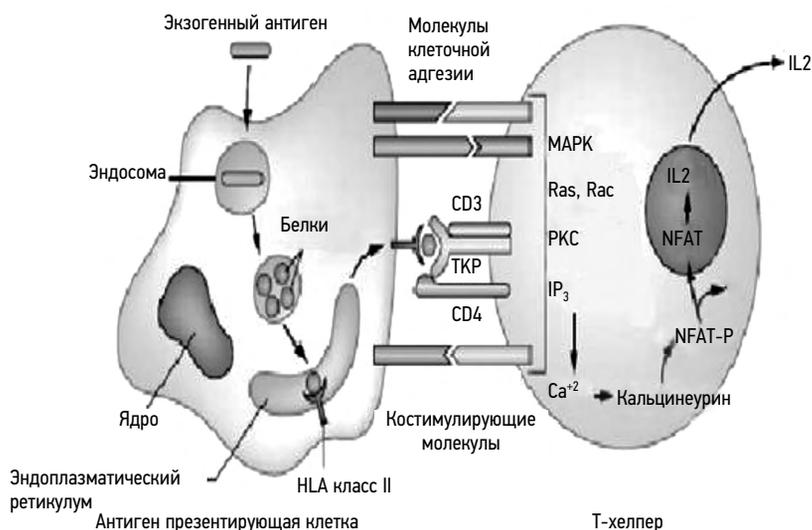


Рис. 4. Активация Т-лимфоцита: MAPK — митоген активированный белок киназы С; PKC — белок киназы С; NFAT — ядерный фактор активированных Т-лимфоцитов; IL2 — интерлейкин 2; IP₃ — инозитол трифосфата

Fig. 4. T cell activation: MAPK — mitogen activated protein (MAP) kinase C; PKC — protein kinase C; NFAT — nuclear factor of activated T cells; IL2 — interleukin 2; IP₃ — inositol trisphosphate

доменами формируют В-клеточный рецептор (ВКР). Антиген в ВКР может быть представлен для распознавания Т-хелперам вместе с костимулирующими и молекулами HLA II класса [13, 18].

Если Т-хелпер с помощью собственного ТКР распознает представленный антиген, то информационный сигнал проводится обратно В-лимфоциту через адгезионную молекулу CD40, а также через секрецию различных цитокинов. Это способствует дальнейшей реарранжировке ДНК, позволяющей секретировать иммуноглобулины другого класса, особенно G, а также пролиферации В-лимфоцитов и образованию клеток памяти. Антитела вызывают гибель клеток-мишеней за счет активации системы комплемента, что приводит к клеточному лизису и фагоцитозу клеток трансплантата [25].

Большинство случаев отторжения трансплантата связаны с трансплантацией органов человека. Это происходит вследствие развития сложных иммунопатогенетических механизмов при трансплантации органов и, которые не будут возникать при пересадке очищенных СК, полученных лабораторным путем. Например, отторжение трансплантата при пересадке цельных органов во многом связано с миграцией ДК из трансплантата, этого явления не будет при отсутствии ДК. Однако чем сложнее искусственно полученные тканевые структуры, тем больше ситуация будет напоминать ситуацию трансплантации цельных органов человека. Первая проблема заключается в возможности гиперострого отторжения трансплантата из-за наличия аутореактивных антител хозяина. Аутоантитела вызывают активацию системы комплемента, отложению образующихся иммунных комплексов (ИК) в стенке сосудов, последующему тромбозу и летальному исходу. Также могут развиваться острые реакции, связанные с участием ДК, МФ, нейтрофилов, НК. Начиная с момента пересадки, создаются условия для иммунного отторжения, возникающие вследствие оперативного вмешательства с развитием острого воспаления. Основными компонентами которого являются многочисленные цитокины (IL2, IL8, IL6, IL1 β , IFN γ и др.), а также привлеченные в очаг воспаления эффекторны клетки. Процессы острого клеточного отторжения могут возникать в течение первых 6 мес. Основным клеточным компонентом отторжения являются ДК трансплантата, активирующие Т-лимфоциты хозяина с последующим развитием цитотоксических эффектов. В дополнение к развитию Т-клеточного иммунного ответа антитела хозяина взаимодействуют с антигенами трансплантата. Если трансплантат выживает, все равно сохраняется возможность его отторжения вследствие развития хронического воспаления ведущего, к прогрессирующему повреждению тканей и фиброзу. Также могут присоединяться дополнительные механизмы, не купируемые иммуносупрессивной терапией. Так, пересадка костного мозга связана с особыми проблемами, потому что сам трансплантат содержит большое количество

иммунокомпетентных клеток и клеток, образующихся из гематопоэтических СК трансплантата. Но интенсивность иммунных реакций против трансплантата во многом зависит от степени несоответствия аллелей ГКГ донора и реципиента. Это соответствие изучается с помощью различных методов, включающих использование антител или секвенирования ДНК. Современные иммуносупрессивные препараты позволяют эффективно осуществлять трансплантацию таких органов, как почки, но соответствие ГКГ остается очень важным при пересадке костного мозга. Следует также помнить о том, что даже идеальное соответствие локусов ГКГ донора и реципиента не дает полной гарантии эффективности трансплантации, так как существует большое количество малых локусов ГКГ, которые могут приводить к активации ИС и последующему отторжению трансплантата.

В настоящее время изучается вопрос о возможной пересадке ксенотрансплантатов. Однако с ними связано еще больше проблем, чем пересадка аллотрансплантатов. Гиперострое отторжение происходит при наличии антител у людей против групповых антигенов полисахаридной природы, экспрессируемых клетками: Galactose-alpha-1,3-galactose (Gal- α 1-3 Gal — α -Gal эпитоп), который присутствует на эндотелиальных клетках животных, кроме приматов. Поэтому могут быть выведены генетически модифицированные свиньи, у которых этот эпитоп отсутствует. Однако вероятность отторжения трансплантата остается по-прежнему высокой [7, 22, 25].

При трансплантации тканей, органов у животных применяются те же принципы, что и у человека. Однако имеются и существенные различия. Лабораторные мыши используются в течение уже длительного времени, благодаря этому получены инбредные гомозиготные линии. Тем не менее эти особи отличаются друг от друга, особенно иммунологическими характеристиками. Однако трансплантаты между ними являются идеальными для пересадки, так как эти гомозиготные мыши генетически практически идентичны. При невозможности использовать инбредные линии мышей в эксперимент с трансплантацией берут мышей с ослабленным иммунитетом. У бестимусных (нулевых) мышей имеется серьезный дефицит Т-лимфоцитов, возникающих из-за мутационных изменений в гене транскрипционного фактора FOXP1, необходимого для более поздних стадий развития тимуса. У таких мышей отсутствует волосяной покров («голые» мыши), и они не отторгают ксенотрансплантаты, но сохраняют отдельные функции Т-лимфоцитов, поэтому таким мышам проводится иммуносупрессивная терапия. У мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом — ТКИД (The Severe Combined Immunodeficiency — SCID) утрачена функция изменения гена кодирования фермента репарации ДНК (encoding a DNA repair enzyme — Prkdc), что необходимо для реарранжировки ДНК, участвующей в созревании Т- и В-лимфоцитов. Поэтому у таких мышей

выявляется серьезная нехватка Т- и В-клеток. Мыши Non-Obese Diabetic (NOD-SCID) имеют серьезные изменения в ГКГ и секреции IL-2. Такие мыши имеют ряд иммунологических дефектов. У них может спонтанно развиваться аутоиммунный диабет, но они являются основными особями для проведения экспериментов с алло- и ксенотрансплантатами. Похожие характеристики имеют мыши с «нокаутами» генов *RAG1* или *2*, которые также необходимы для реарранжировки ДНК. Несмотря на то, что этим мышам также не хватает большинства субпопуляций Т- и В-лимфоцитов они остаются иммунологически активны. Поэтому для экспериментов с ксенотрансплантатами необходимы еще более иммуносупрессивные мыши. Мыши этой инбредной линии имеют мутации в *Lyst* гене, кодирующего эндосомальный компонент трафика и, которого нет у НК. У таких мышей не хватает многих субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, НК. γ -цепь CD132 рецептора является общим компонентом для IL2 и других цитокинов. CD132 необходим для проведения сигнала

после взаимодействия цитокина с рецептором. Дефект γ -цепи CD132 приводит к ТКИД.

Штаммы мышей с ТКИД и дефектом γ -цепи CD132 или с *RAG* и дефектом γ -цепи CD132 являются наиболее иммунокомпромиссными в настоящее время и доступны для самых сложных исследований. Однако, к сожалению, такие штаммы мышей являются высокочувствительными даже к условно-патогенной микрофлоре. Другой доступной моделью для изучения проблем трансплантологии являются крысы, дефектные по гену *FOXN1*. Такие крысы имеют аналогичные характеристики мышам-SCID. Для крупных моделей животных, таких как свиньи, иммунодефицитные модели, по большому счету, находятся в стадии разработок, но большинство исследований проводится с использованием аналогичных режимов индуцированного иммунодефицита.

Таким образом, несмотря на достижения в области изучения СК, сегодня имеется достаточно большое количество проблем, связанных с использованием СК в трансплантологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Москалев А.В., Сбойчаков В.Б., Рудой А.С. Общая иммунология с основами клинической иммунологии. М.: Гэотар-Медиа, 2015.
2. Ярилин А.А. Иммунология. М.: Гэотар-Медиа, 2010.
3. Abbas A.K., Lichtman A.N., Pillai S. Cellular and molecular immunology. 9-th edition. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 2018.
4. Bhaya D., Davison M., Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation // *Annu. Rev. Genet.* 2011. Vol. 45. P. 273–297. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132430
5. Cai L., Johnstone B.H., Cook T.G., et al. Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization // *Stem. Cells.* 2007. Vol. 25. No. 12. P. 3234–3243. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0388
6. Hilton I.B., D'Ippolito A.M., Vockley C.M., et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers // *Nat. Biotechnol.* 2015. Vol. 33. No. 5. P. 510–517. DOI: 10.1038/nbt.3199
7. Gilbert L.A., Larson M.H., Morsut L., et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes // *Cell.* 2013. Vol. 154. No. 2. P. 442–451. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.044
8. Geraghty R.J., Capes-Davis A., Davis J.M., et al. Cancer Research UK. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research // *Br. J. Cancer.* 2014. Vol. 111. No. 6. P. 1021–1046. DOI: 10.1038/bjc.2014.166
9. Gjorevski N., Ranga A., Lutolf M.P. Bioengineering approaches to guide stem cell-based organogenesis // *Development.* 2014. Vol. 141. No. 9. P. 1794–1804. DOI: 10.1242/dev.101048
10. Kang H.W., Lee S.J., Ko I.K., et al. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity // *Nat. Biotechnol.* 2016. Vol. 34. No. 3. P. 312–319. DOI: 10.1038/nbt.3413
11. Kern S., Eichler H., Stoeve J., et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue // *Stem. Cells.* 2006. Vol. 24. No. 5. P. 1294–1301. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0342
12. Lee J.H., Kemp D.M. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. Vol. 341. No. 3. P. 882–888. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.01.038
13. Li B., Zeng Q., Wang H., et al. Adipose tissue stromal cells transplantation in rats of acute myocardial infarction // *Coron. Artery. Dis.* 2007. Vol. 18. No. 3. P. 221–227. DOI: 10.1097/MCA.0b013e32801235da
14. Liu N., Zang R., Yang S.T., et al. Stem cell engineering in bioreactors for large-scale bioprocessing // *Engineering in Life Sciences.* 2014. Vol. 14. P. 4–15. DOI: 10.1002/elsc.201300013
15. McDonald J.I., Celik H., Rois L.E., et al. Reprogrammable CRISPR/Cas9-based system for inducing site-specific DNA methylation // *Biol. Open.* 2016. Vol. 5. No. 6. P. 866–874. DOI: 10.1242/bio.019067
16. Olson K., De Nardin E. Contemporary clinical immunology and serology. New Jersey: Upper Saddle River, 2013.
17. Rose N.R., Mackay I.R. The autoimmune diseases. 5th edition. Philadelphia, 2018.
18. Slack J.M.W. The science of stem cells. Wiley, 2018.
19. Sasai Y. Next-generation regenerative medicine: organogenesis from stem cells in 3D culture // *Cell. Stem. Cell.* 2013. Vol. 12. No. 5. P. 520–530. DOI: 10.1016/j.stem.2013.04.009
20. Sternberg S.H., Redding S., Jinek M., et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9 // *Nature.* 2014. Vol. 507. No. 7490. P. 62–67. DOI: 10.1038/nature13011
21. Thakore P.I., D'Ippolito A.M., Song L., et al. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements // *Nat. Methods.* 2015. Vol. 12. No. 12. P. 1143–1149. DOI: 10.1038/nmeth.3630
22. Wu Y., Chen L., Scott P.G., et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis // *Stem. Cells.* 2007. Vol. 25. No. 10. P. 2648–2659. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0226

23. Zabriskie J.B. *Essential clinical immunology*. N.Y., 2009.

24. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system // *Cell*. 2015. Vol. 163. No. 3. P. 759–771. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038

REFERENCES

1. Moskalev AV, Sboichakov VB, Rudoi AS. *Obschaya immunologia s osnovami klinicheskoi immunologii*. Moscow: Geotar-Media; 2015. (In Russ.).

2. Yarin AA. *Immunologia*. Moscow: Geotar-Media; 2010. (In Russ.).

3. Abbas AK, Lichtman AN, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 9-th edition. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders Company; 2018.

4. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*. 2011;45:273–297. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132430

5. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, et al. Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem Cells*. 2007;25(12):3234–3243. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0388

6. Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol*. 2015;33(5):510–517. DOI: 10.1038/nbt.3199

7. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. 2013;154(2):442–451. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.044

8. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, et al. Cancer Research UK. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer*. 2014;111(6):1021–1046. DOI: 10.1038/bjc.2014.166

9. Gjorevski N, Ranga A, Lutolf MP. Bioengineering approaches to guide stem cell-based organogenesis. *Development*. 2014;141(9):1794–1804. DOI: 10.1242/dev.101048

10. Kang HW, Lee SJ, Ko IK, et al. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat Biotechnol*. 2016;34(3):312–319. DOI: 10.1038/nbt.3413

11. Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294–1301. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0342

12. Lee JH, Kemp DM. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic

25. Zia S., Mozafari M., Natasha G., et al. Hearts beating through decellularized scaffolds: whole-organ engineering for cardiac regeneration and transplantation // *Crit. Rev. Biotechnol*. 2016. Vol. 36. No. 4. P. 705–715. DOI: 10.3109/07388551.2015.1007495

conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341(3):882–888. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.01.038

13. Li B, Zeng Q, Wang H, et al. Adipose tissue stromal cells transplantation in rats of acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis*. 2007;18(3):221–227. DOI: 10.1097/MCA.0b013e32801235da

14. Liu N, Zang R, Yang ST, et al. Stem cell engineering in bioreactors for large-scale bioprocessing. *Engineering in Life Sciences*. 2014;14:4–15. DOI: 10.1002/elsc.201300013

15. McDonald JI, Celik H, Rois LE, et al. Reprogrammable CRISPR/Cas9-based system for inducing site-specific DNA methylation. *Biol Open*. 2016;5(6):866–874. DOI: 10.1242/bio.019067

16. Olson K, De Nardin E. *Contemporary clinical immunology and serology*. New Jersey: Upper Saddle River; 2013.

17. Rose NR, Mackay IR. *The autoimmune diseases*. 5th edition. Philadelphia; 2018.

18. Slack JMW. *The science of stem cells*. Wiley; 2018.

19. Sasai Y. Next-generation regenerative medicine: organogenesis from stem cells in 3D culture. *Cell Stem Cell*. 2013;12(5):520–530. DOI: 10.1016/j.stem.2013.04.009

20. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014;507(7490):62–67. DOI: 10.1038/nature13011

21. Thakore PI, D'Ippolito AM, Song L, et al. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nat Methods*. 2015;12(12):1143–1149. DOI: 10.1038/nmeth.3630

22. Wu Y, Chen L, Scott PG, et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 2007;25(10):2648–2659. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0226

23. Zabriskie JB. *Essential clinical immunology*. NY; 2009.

24. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015;163(3):759–771. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038

25. Zia S, Mozafari M, Natasha G, et al. Hearts beating through decellularized scaffolds: whole-organ engineering for cardiac regeneration and transplantation. *Crit Rev Biotechnol*. 2016;36(4):705–715. DOI: 10.3109/07388551.2015.1007495

ОБ АВТОРАХ

*Александр Витальевич Москалев, доктор медицинских наук, профессор; e-mail: alexmav195223@yandex.ru; ORCID: 0000-0002-3403-3850

Борис Юрьевич Гумилевский, доктор медицинских наук, профессор

Василий Яковлевич Апчел, доктор медицинских наук, профессор; ORCID: 0000-0001-7658-4856; SCOPUS: 6507529350; RESEARCHER: E-8190-2019; SCHOLAR: g9EKlssAAAAJ&hl; SPIN-код: 4978-0785

Василий Николаевич Цыган, доктор медицинских наук, профессор

AUTHORS INFO

*Alexander V. Moskalev, doctor of medical sciences, professor; e-mail: alexmav195223@yandex.ru; ORCID: 0000-0002-3403-3850

Boris Yu. Gumilevsky, doctor of medical sciences, professor

Vasily Ya. Apchel, doctor of medical sciences, professor; ORCID: 0000-0001-7658-4856; SCOPUS: 6507529350; RESEARCHER: E-8190-2019; SCHOLAR: g9EKlssAAAAJ&hl; SPIN code: 4978-0785

Vasily N. Cygan, doctor of medical sciences, professor