

Обзорная статья

УДК: 611-013.3:576.3

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma72190>

ТРАНСДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК. ОТ КЛЕТКИ К ОРГАНИЗМУ

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, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Рассмотрены фазы развития эмбриона, начиная с формирования гамет и зародышевых линий. Описаны различия отбора зародышевых и соматических клеток. Образование истинных зародышевых клеток связано с индукцией костного морфогенетического белка. Маркером образования истинных зародышевых клеток у приматов является фактор транскрипции цинкового пальца. Выделяют два типа истинных зародышевых клеток, формирующие энтодерму и образующие эпибласт. Их дифференцировку обеспечивает фактор роста фибробластов за счет находящегося в эпибласте сигнального белка FGF4, взаимодействующего с рецептором FGFR2 в первичной энтодерме. Миграция зародышевых клеток контролируется фактором 1 стромальных клеток. Имплантация оплодотворенной яйцеклетки связана с особенностями дифференциации трофэктодерма и влиянием транскрипционных факторов. Поскольку линии стволовых клеток изолированы от внезародышевых тканей, их происхождение и развитие остаются не до конца установленными. У мышей хорион образуется из небольшого участка трофэктодерма, покрытого внезародышевым мезодермом на проксимальном конце просвета яйцеклетки. У людей хорион вместе с его основой — «внезародышевой мезодермой» — является самым ранним появлением ткани, исходящей из первичной энтодермы. Современные исследования подтвердили возможность получения клонов из ядер ранних бластомеров эмбрионов. Однако использование ядер клеток на более поздних стадиях дало неудовлетворительные результаты. Использование ядер эмбриональных стволовых клеток дало гораздо лучшие результаты по сравнению с клетками более поздних стадий развития. Поэтому, каким бы ни был источник ядер они должны находиться в фазе G0 или G1, но не в G2.

Ключевые слова: бластоциста; гаметы; гены; зигота; овоцит; стволовые клетки; эмбрион; энтодерма; эпибласт; яйцеклетка.

Как цитировать:

Москалев А.В., Гумилевский Б.Ю., Апчел В.Я., Цыган В.Н. Трансдифференциация стволовых клеток. От клетки к организму // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2021. Т. 23, № 3. С. 205–214. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma72190>

Overview article

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma72190>

TRANSDIFFERENTIATION OF STEM CELLS: FROM THE CELL TO THE BODY

A.V. Moskalev¹, B.Yu. Gumilevskiy¹, V.Ya. Apchel^{1,2}, V.N. Tsygan¹

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 phases of embryo development, starting with the formation of gametes and germlines, are considered. This study described the differences in the selection of germ and somatic cells. The formation of true germ cells is associated with the induction of bone morphogenetic protein. The zinc-finger transcription factor is the marker of the formation of true germ cells in primates. True germ cells have two types: germ cells that form endoderm and those that form an epiblast. Their differentiation is provided by the growth factor of fibroblasts due to the signaling protein FGF4, which interacts with the FGFR2 receptor in the primary endoderm. The migration of germ cells is controlled by the factors of stromal cells. The implantation of a fertilized egg is associated with the peculiarities of the differentiation of the trophoblast and the influence of transcription factors. Since stem cell lines are isolated from non-brain tissues, their origin and development remain not fully established. In mice, the chorion is formed from a small area of trophoblast covered with an out-of-the-mouth mesoderm on the proximal end of the egg lumen. In humans, the chorion, together with its basis—"non-embryonic mesoderm"—is the earliest appearance of tissue emanating from the primary endoderm. Modern research has confirmed the possibility of obtaining clones from the nuclei of early blastomere embryos. However, the use of cell nuclei at later stages yielded unsatisfactory results. The use of embryonic stem nuclei has produced much better results than the use of cells in the later stages of development. Therefore, whatever the source of the cores, they should be in the G0 or G1 phase, but not in G2.

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, Tsygan VN. Transdifferentiation of stem cells: from the cell to the body. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2021;23(3):205–214. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma72190>

Received: 25.06.2021

Accepted: 20.07.2021

Published: 12.09.2021

Как представляется, основная задача изучения стволовых клеток (СК) — разработать безопасные технологии получения тканей, органов для пересадки пациентам, которые бы не отторгались. Рассмотрим основные достижения, проблемы и перспективы этой проблемы. Основные важнейшие открытия в биологии были сделаны с использованием мушки дрозофилы, свободноживущих нематод, шпорцевых лягушек, но мышь служила и служит основной моделью изучения механизмов развития млекопитающих. Исследования СК млекопитающих привели к открытию эмбриональных СК (ЭСК). Важно то, что механизмы эволюционного развития (индуцирующие, транскрипционные факторы) сохраняются от простых форм жизни к сложным. Они сохранены и у мышей и наверняка играют аналогичную роль в развитии человека [1–3]. Поэтому большая часть данных молекулярной генетики человеческого развития получена на мышах. На мышах опробованы передовые генетические методы (нокаутирование генов с использованием Cre — технологии для удаления вставок, транслокаций и инверсий на определенных участках дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) клеток для маркировки линии), которые пока нельзя использовать у человека. Также были изучены микрохирургические методы, позволяющие элиминировать эмбрион мыши из репродуктивного тракта спустя несколько дней после оплодотворения для дальнейшего развития в пробирке. Затем, через 4,5 дня, эмбрион имплантируют обратно в матку, и плацента начинает развиваться. Стало возможным имплантировать эмбрион в репродуктивный тракт после ранних стадий постимплантации в течение 2 дней в пробирке. После этого целые эмбрионы не могут развиваться *in vitro*, но отдельные зачатки органов могут [4].

Стадия эмбрионального развития у мышей выражается как полтора дня — E1.5. Важно отметить, что развитие млекопитающих связано с формированием набора внеэмбрионных структур, большинство которых образуют часть плаценты. На начальных стадиях развития нет четкого различия между будущим эмбрионом и экстраэмбриональными структурами, так как клетки внутренней клеточной массы и эпибласта становятся частями плаценты. Первая фаза развития связана с формированием гамет, когда мышь еще является эмбрионом. Гаметы или зародышевые клетки (ЗК) становятся зародышевой линией, их генетические изменения могут проявиться в следующих поколениях. Все остальные клетки организма являются соматическими и их генетические изменения могут повлиять на отдельный организм, а не на потомство. Уровень отбора среди ЗК и гамет намного выше, чем у соматических клеток. Селективные механизмы включают требования к миграции ЗК, массовой гибели первичных ооцитов до наступления репродуктивной зрелости, овуляция только одного (у человека) из нескольких зрелых фолликулов яичников, подвижность сперматозоидов, чтобы пройти женский

репродуктивный тракт и выбор из сотен сперматозоидов только одного для оплодотворения [5].

Динамика механизмов формирования зиготы сопровождается повторным снижением клеток с низкой жизнеспособностью, эти процессы также уменьшают число мутаций и других неблагоприятных негенетических изменений. Истинные зародышевые клетки (Primordial Germ Cells — PGCs) образуются у животных на ранних стадиях развития. У беспозвоночных животных оплодотворенная яйцеклетка может быть представлена зародышевой цитоплазмой, в которой впоследствии формируются ЗК. У мышей PGCs образуются в результате индукции костного морфогенетического белка (Bone morphogenetic protein — BMP) из задней части эпибласта. Доказательством этого является то, что эмбрионы, не имеющие гена *Vmp4*, не образуют ЗК, и, наоборот, обработка соответствующих эпибластов BMP будет способствовать генерации PGCs. У приматов и, вероятно, у людей PGCs, в отличие от мышей, образуются из амниона. Ранним специфическим маркером образования PGCs у приматов является фактор транскрипции цинкового пальца (zinc finger transcription factor — BLIMP1), который контролирует многие процессы развития ЗК. У мышей PGCs можно визуализировать на E7.5. Они активируют экспрессию ключевых генов транскрипции в системе поддержания плюрипотентности клеток млекопитающих: область Y, определяющая пол (sex determining region — SRY или *Sox2*), и поддерживают экспрессию транспортера катионов/карнитинов 4 (organic cation/carnitine transporter 4 — *Oct4*) и *Nanog* в раннем эмбрионе. Вскоре после экспрессии *Sox2*, *Oct4*, *Nanog* PGCs проходят стадию глобальной демитилиации ДНК, и картина метилирования гистона смещается в сторону плюрипотентных СК (ПСК). Эти характеристики отражают то, что PGCs имеют многие свойства ПСК. PGCs мышей мигрируют из места своего формирования в развивающихся половых железах в эндодерму дорсальной кишки, затем в дорсальную брыжейку и в латеральную мезодерму, образующую гонады. Эта миграция в основном осуществляется в период E9.5–11.5. Миграционный путь PGCs контролируется эволюционной системой миграции клеток: фактор 1 стромальных клеток (stromal cell derived factor 1 — SDF1) или CXCL12, выделяемые латеральной мезодермой, CXCR4, G-белком, адсорбированном на PGCs. PGCs эмбрионов, не имеющих гена *CXCR4* не достигают гонад [6–7]. Будущее ЗК зависит от того, является ли эмбрион мужским или женским. Механизм формирования пола влияет не только на структуру гонад, вторичные половые признаки, но и на PGCs. Миграционные события в эмбрионах человека похожи на мышинные (рис. 1), но протекают более замедленно: PGCs визуализируются с помощью окрашивания щелочной фосфатазой в проксимальной части желточного мешка примерно на четвертой неделе, а миграция в половые железы осуществляется в течение следующих 2 недель. У мышей

PGCs включаются в корд яичек примерно на E12 и митоз приостанавливается через 1–2 дня [8].

Семенные каналы содержат клетки Сертоли, обеспечивающие питательную поддержку сперматозоидов, и клетки Лейдига, секретирующие тестостерон. У мышей миграция PGC полностью завершается к E13.5. В это время ЗК становятся гоноцитами и размножаются до E16. Затем они покоятся примерно до 4-го послеродового дня, после которого возобновляется сперматогенез. Экспрессия *Oct4* снижается после стадии миграции PGC, но сохраняется на невысоком уровне в течение всей жизни. У мужчин картина со сперматогенезом аналогична мышам, начиная с момента полового созревания. Раннее подавление мейоза сперматозоидов связано с дисрегуляцией *Syp26b1* в эмбриональном яичке. Это разрушает ретиноевую кислоту, способствует мейозу женских зародышевых клеток. Удаление гена *Syp26b1* способствует мейозу мужских PGC в эмбриональном яичке и последующей гибели [9].

Гранулезные и текальные клетки являются соматическими, происходящими из мезодермы гонад. Сама яйцеклетка окружена четким слоем внеклеточного материала (зона пеллюцида), который секретируется как самой яйцеклеткой, так и гранулезными клетками. У мышей оогония начинается с мейотической профазы. После завершения митотических делений (E13.5) образуются первичные ооциты. Репродуктивная зрелость у мышей достигается через 6 недель после рождения. К этому времени многие фолликулы регрессируют, а яичник содержит около 10 000 жизнеспособных фолликулов на различных стадиях развития. Первичные фолликулы стимулируются к росту фолликулостимулирующим гормоном (ФФГ). Гранулезные клетки размножаются, фолликулы значительно увеличиваются в размерах в антральной полости. При оптимальных условиях овуляция 8–12 яйцеклеток,

стимулируемая лютеинизирующим гормоном гипофиза (ЛН), происходит каждые 4–6 дней. В процессе овуляции первичные яйцеклетки проходят первое мейотическое деление для генерации вторичной яйцеклетки, находящейся в метафазе второго мейотического деления, и полярного тела с неиспользованным набором хромосом. Вторичные яйцеклетки выделяют протеазу, активатор плазминогена тканей, способствующий яйцеклеткам покинуть яичник. Ооциты мигрируют в открытые маточные трубы, где происходит их оплодотворение. После оплодотворения второе мейотическое деление завершается выходом второго полярного тела с неиспользованным набором хромосом. У людей образуется около 7 млн первичных яйцеклеток [10]. После рождения их количество сокращается примерно до 1 млн, а к половому созреванию до 40 000. Как и у приматов, ежемесячный репродуктивный цикл контролируется гипофизом. ФФГ способствует росту до 20 фолликулов, из которых только, вероятно, один будет участвовать в процессе овуляции. За весь репродуктивный период около 400 яйцеклеток становятся доступными для оплодотворения. На 13–14-й день цикла ФФГ и ЛН способствуют овуляции. Так начинается первый цикл мейотического деления и генерация образования вторичной яйцеклетки, а также полярного тела с последующим выходом яйцеклетки из яичника. Второе мейотическое деление завершается образованием второго полярного тела. Первое полярное тело может также делиться на этом этапе, давая максимум три полярных тела [11–12].

Сперматозоиды нуждаются в активировании, что и происходит в женском репродуктивном тракте в присутствии ионов Ca^{2+} и HCO_3^{2-} . Этот процесс, называемый капациацией, сопровождается ростом внутриклеточного pH, увеличением мембранного потенциала от 30 до 50 мВ, а также некоторыми изменениями поверхности клеток, необходимыми для взаимодействия

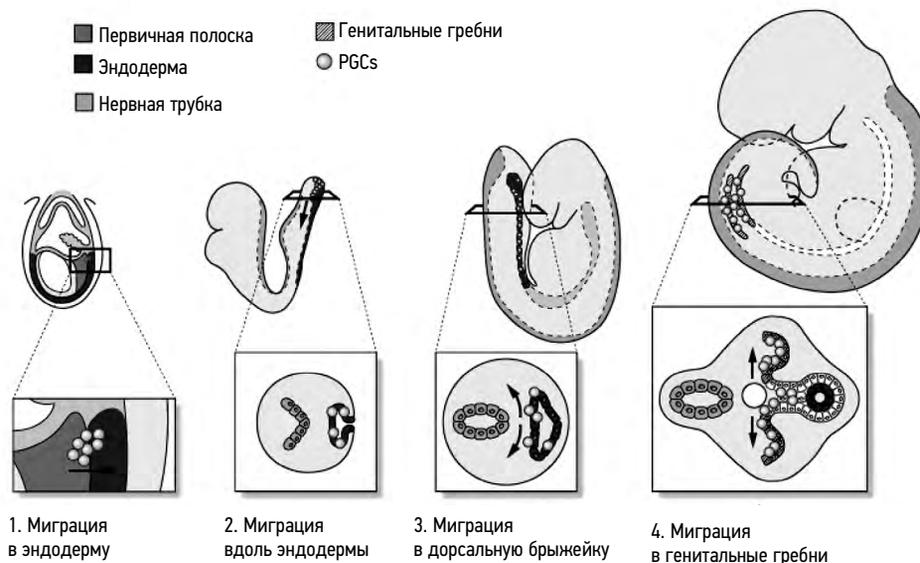


Рис. 1. Маршрут перемещения PGCs в эмбрионе мыши к гонадам
Fig. 1. Route of moving PGCs in the mouse embryo to the gonads

с *zona pellucida* яйцеклетки. Гиалуронидаза сперматозоида помогает проникнуть в скопление клеток вокруг яйцеклетки. Как только сперматозоид достигает *zona pellucida* развивается последовательность событий необходимых для успешного оплодотворения (рис. 2) [13].

Галактозил трансфераза клеточной поверхности сперматозоида связывается с углеводной цепью ZP3, гликопротеиновым компонентом *zona pellucida*. Это индуцирует акросомальную реакцию, способствуя повышению концентрации внутриклеточного кальция. Акросома сперматозоида подвергается экзоцитозу, что способствует высвобождению протеазы, разрушающую *zona pellucida* и позволяет сперматозоиду достичь поверхности яйцеклетки. ADAM-белки сперматозоидов связываются с интегринами мембраны ооцита. Это инициирует слияние сперматозоидов и яйцеклеток с использованием белка тетраспанина (CD9). Фосфолипаза С сперматозоидов активирует инозитол трифосфатный путь и способствует увеличению концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме яйцеклетки.

Увеличение концентрации Ca^{2+} вызывает экзоцитоз кортикальных гранул яйцеклетки, способствует завершению второго мейотического деления, возобновлению синтеза ДНК, поступлению материнских рибонуклеиновых кислот в полисомы и общей метаболической активации. В состав кортикальных гранул входят гликозиды, протеазы, модифицирующие *zona pellucida*, прекращающие поступление других сперматозоидов, что снижает риск дополнительного оплодотворения [14]. Ядро сперматозоида деконденсируется и протамины заменяются гистонами. ДНК обоих ядер реплицируются и объединяются, чтобы сформировать митотическое веретено для первого клеточного деления эмбрионального развития. Первые несколько дней эмбрионального развития у млекопитающих называются фазой преимплантации. В этот период оплодотворенная яйцеклетка делится и генерирует экстраэмбриональные и околоплодные (рис. 3) [15].

Около двух клеточных циклов полярные и аполярные клетки имеют лабильную спецификацию, что в итоге

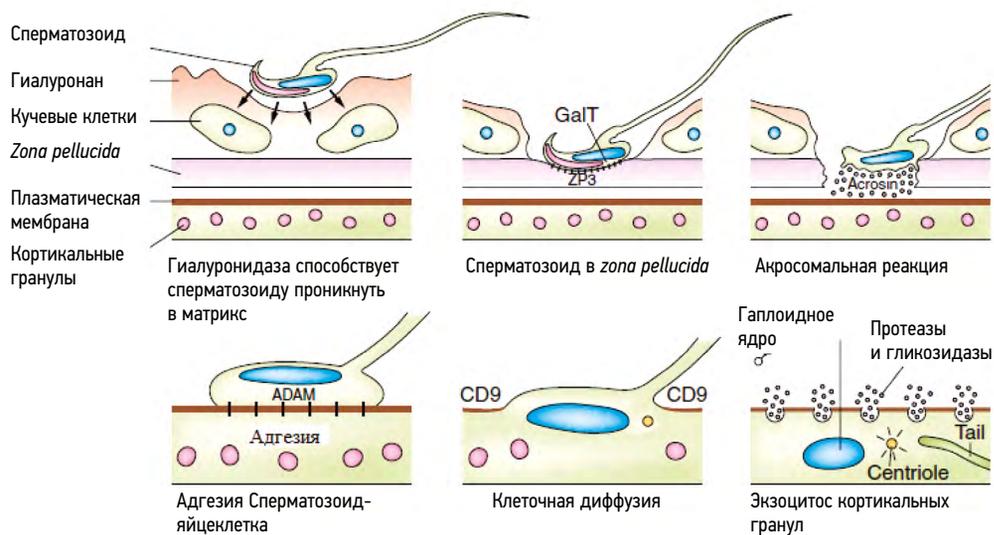


Рис. 2. Оплодотворение у мышей

Fig. 2. Fertilization in mice

ZP3 — гликопротеиновый рецептор *zona pellucida*; ADAM — дезинтеграционные и металлопротеазные белки; tail — хвост

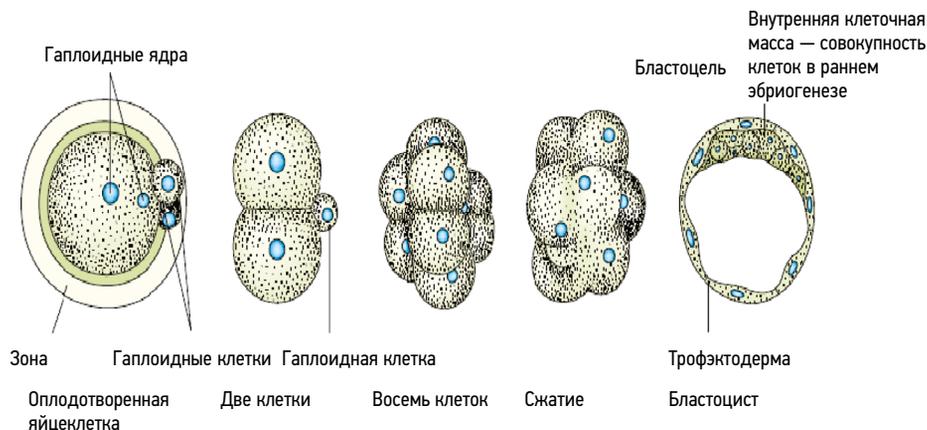


Рис. 3. Преимплантационное развитие мыши

Fig. 3. Pre-implantation development of the mouse

приводит к формированию другого типа клеток, если они перемещаются в участок между внутренней и внешней стороной. На 64-клеточной стадии они определяют, что свидетельствует об их устойчивости к изменению позиции. Этот механизм, как установлено, зависит от путей сигнализации гиппокампа, который регулирует контакт-опосредованное поведение клеток. Контактующие аполярные клетки активируют киназу 3 (serine/threonine kinase 3 — STK3/MST), фосфорилирующую транскрипционный фактор YAP1, сохраняя его в цитоплазме. В полярных клетках этот путь менее активен, поэтому YAP1 может попасть в ядро и совместно с TEAD4 регулирует экспрессию транскрипционного фактора CDX2. CDX2 подавляет экспрессию генов плюрипотентных факторов OCT4 и NANOG и активирует экспрессию различных компонентов, необходимых для дифференциации трофэктодерма. На этом этапе оплодотворения появляется пространство, заполненное жидкостью — бластоциста. Бластоциста увеличивается в размерах за счет поглощения жидкости и на 4,5-й (у мыши), на 6-й (у человека) день он готов к имплантации [16–17]. Исследования экспрессии генов показывают, что они сохраняют биологические характеристики плюрипотентности. Одним из важнейших генных продуктов является фермент щелочная фосфатаза, имеющий важное значение для ЭСК. При нормальном развитии мыши он впервые регистрируется при экспрессии генов зиготы, более выражен в ИСМ, но снижен в трофэктодерме. Экспрессия прекращается на стадии эпибласта после имплантации, но повторно появляется в ЗК. Выделяют два типа ИСМ: экспрессирующие транскрипционные факторы NANOG и GATA6. Вероятно, они генерируют спонтанно, имеют различные адгезивные клеточные поверхности, поэтому клетки, экспрессирующие GATA6, находятся рядом с бластоцеле. Они формируют эндодерму, а клетки, остающиеся внутренними, продолжают экспрессировать NANOG и формируют эпибласт. Их дифференцировку обеспечивает фактор роста фибробластов (FGF) за счет находящегося в эпибласте сигнального белка FGF4, взаимодействующего с рецептором FGFR2 в первичной энтодерме. Надо учитывать, что ингибитор сигнального белка является важным компонентом питательной среды для культуры ES-клеток. ES-клетки способны спонтанно формировать первичный энтодермальный слой, если активирующий сигнал для FGF подавляется. Но они не могут формировать трофэктодермальный клеточный слой, если экспериментально секреция CDX2 будет усилена. Данные концепции преимплантационного периода человека схожи с таким периодом у мышей, но проходят более медленно. Так, имеет место ограничение экспрессии генов CDX2, OCT4, NANOG и GATA6, которое протекает более длительно до поздней стадии бластоциста. После имплантации имеются более существенные различия этого периода у человека и мыши [18–19].

Примерно через 4,5 дня после имплантации яйцеклетки в стенку матки, протеазы, секретлируемые

трофэктодермом, разрыхляют ткань и способствуют погружению в нее бластоциста. Во время имплантации трофобласт становится районированным на отдельные участки. Часть контактирует с ИСМ или эпибластом, продолжает размножаться и образует центральный трофэктодерм. Другая часть пристеночного трофобласта продолжает синтез ДНК, но прекращает деление клеток и трансформируется в гигантские политенные клетки. Гигантские клетки внедряются в децидуальный эндометрий полярного трофобласта и экстраэмбриональной мезодермы для формирования плаценты. Гигантский клеточный трофобласт соединяется с материнскими сосудами и формирует зазоры, позволяющие образовывать синусоиды материнской крови в тесном контакте с эмбриональным кровообращением. Также вклад в формирование плаценты вносят крипты Дювалаля с экстраэмбриональной эндодермой. Клетки, контактирующие с тканью яичника, формируют висцеральный эндодерм, кубоидальные клетки которого, секретируют α -фетопротеин и трансферрин. Расположение тела плода зависит от контакта между эпибластом, висцеральным энтодермом и проксимальными тканями яичника. Однако первым видимым событием является формирование первичной полоски с задней стороны эпибласта. Полоса является областью как пролиферации клеток, так и их движения. Клетки латеральной части эпибласта мигрируют через полосу, формируют слои мезодерма и окончательного эндодерма. Полоса удлиняется, чтобы достичь уплотнения клеток яичника. Основные различия развития эмбриона человека и мыши начинаются во время имплантации. Так, бластоцисты мыши имплантируются с внешней стороны эмбриона, а бластоцисты человека с внутренней на 8–10-й день оплодотворения. Трофобласт эмбриона человека образует внутренний цитотрофобласт, являющийся трофобластической СК, которая затем дифференцируется в синцитиотрофобласт, с помощью множества сигнальных молекул, включая эпидермальный фактор роста, хорионический гонадотропин человека и глюкокортикоиды (рис. 4, 5) [20–21].

Поскольку линии СК изолированы от внезародышевых тканей, не совсем ясно их происхождение и развитие. У мышей хорион образуется из небольшой площади полярного трофэктодерма, покрытого внезародышевым мезодермом на проксимальной конце просвета яйцеклетки. У людей под термином хорион понимается весь трофобласт вместе с его основой — «внезародышевой мезодермой», которая и является самым ранним появлением ткани, исходящей из первичной энтодермы. Таким образом, полость хориона образуется из полости бластоцеля. У мышей амнион формируется из каудальной части первичной полоски внезародышевой мезодермы, которая выслана эпителием эпибласта. У людей амнион формируется в результате кавитации эпибласта примерно на 9-й день. На более поздних сроках беременности амниотическая полость расширяется по отношению к полости

хориона, и амнион сливается с хорионом (см. рис. 5) [22]. Однойцовые близнецы человека имеют общий амнион и формируются в результате фрагментации эпибласта после имплантации. Аллантаис мыши является производным каудальной части внезародышевой мезодермы эпибласта, который включается в пуповину и способствует формированию кровеносных сосудов плаценты. У человека аллантаис формируется из эндодермальных клеток кишечника. Он также проецируется на пуповину, но является несколько рудиментарной структурой, а окружающие кровеносные структуры образуются из окружающего слоя мезодермы. У мышей термин «желточный мешок»

характеризует две структуры: париетальный желточный мешок, состоящий из трофэктодерма, окруженного эндодермой, и висцеральный желточный мешок, состоящий из висцеральной эндодермы, окруженной внезародышевой мезодермой. У человека желточный мешок — это полость, образуемая первичной эндодермой (гипобластом) и примыкающая к внеэмбриональной мезодерме хориона. Как только формируется пуповина, вторичный желточный мешок становится расширенной структурой, проецируемой в полость хориона. Выбор оптимального варианта жизнеспособности ЗК является важной особенностью их развития и продолжается после оплодотворения.

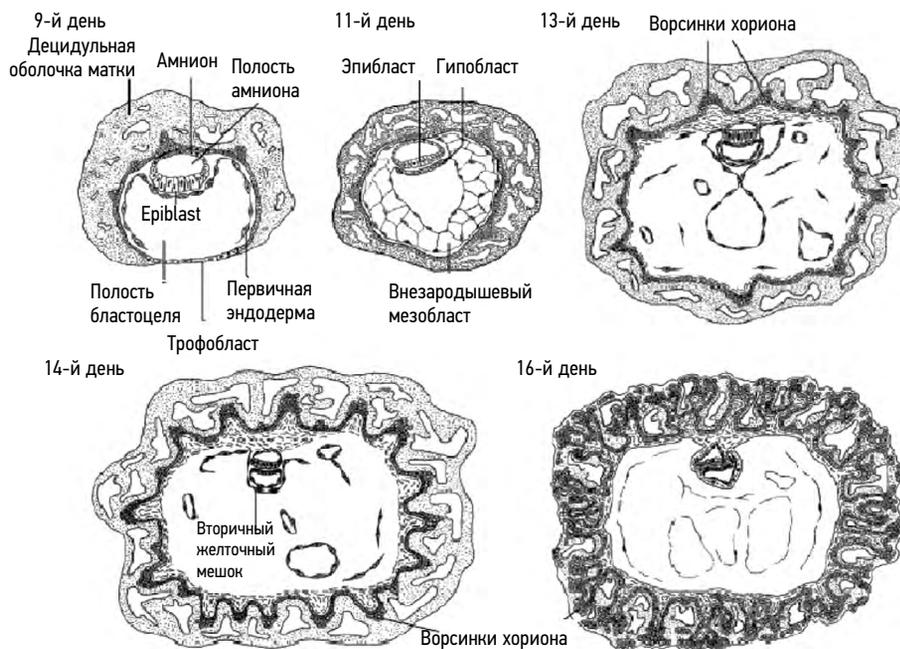


Рис. 4. Развитие яйцеклетки человека. Период формирования амниона, внезародышевой мезодермы, вторичного желточного мешка и ворсинок хориона. Диаметр оплодотворенной яйцеклетки приблизительно равен 0,6 мм в 9 дней, 0,8 мм — в 12 дней, 2,6 мм — в 16 дней (в отличие от мышиного эмбриона эпибласт человека является плоским)

Fig. 4. Early post-implantation development of the human egg. Period of formation of amnion, extra-breathed mesoderm, secondary yolk sac, and chorion lint. The diameter of the fertilized egg is approximately 0.6 mm in 9 days, 0.8 mm in 12 days, and 2.6 mm in 16 days (unlike the mouse embryo, the human epiblast is flat)

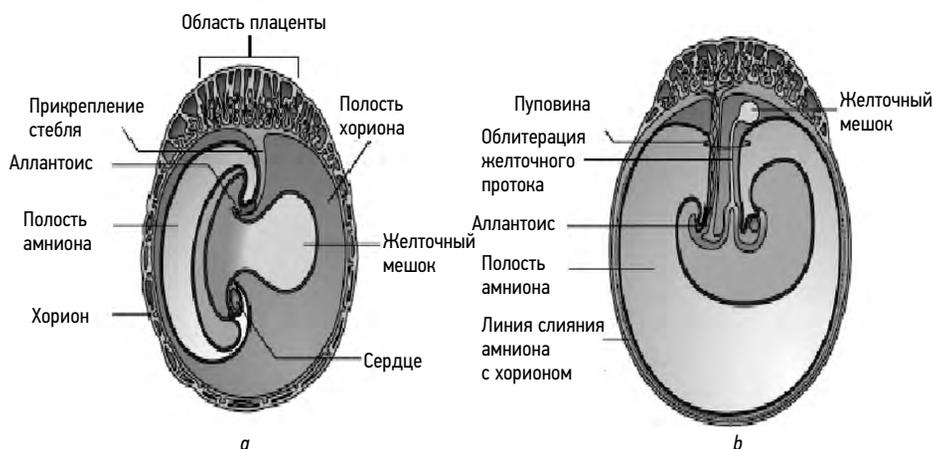


Рис. 5. Формирование внезародышевых органов и зародышевых листков в оплодотворенной яйцеклетке человека: *a* — приблизительно 3 недели от оплодотворения; *b* — приблизительно 4 недели от оплодотворения

Fig. 5. Formation of non-breath membranes in a fruitful human egg: *a* — approximately 3 weeks of fertilization; *b* — approximately 4 weeks from fertilization

Исследования нормальных и дефектных оплодотворенных яйцеклеток, полученных после овуляции, показали, что имплантируется не более 50% яйцеклеток [23–24].

Это, естественно, переносит данные проблемы на экспериментальное клонирование, связанное с заменой ядра яйцеклетки соматическим. Такие эксперименты довольно успешно были проведены на лягушках. Они показали возможность получения клонов из ядер ранних бластомеров эмбрионов. Однако использование ядер клеток на более поздних стадиях дало неудовлетворительные результаты [25–26]. Первые успешные опыты клонирования животных из дифференцированной клетки были получены с овцой Долли в 1997 г. Эти эксперименты дали толчок для преодоления технических проблем у мышей, и теперь можно получить клонированных мышей с помощью трансфера ядра соматических клеток (SCNT). Для этого необходимо использовать зрелые вторичные яйцеклетки, а не оплодотворенные яйцеклетки. Ооциты получают от суперовулирующих самок с хорионическим гонадотропином. Скопления клеток удаляются, а специальной пипеткой проникают в зону второй мейотической метафазной пластины и отбирают материал, содержащий хромосомы. Полученное и введенное донорское ядро может быть перепрограммировано в течение первых 6 ч. Затем яйцеклетка активируется воздействием ионов стронция, вызывающих повторяющиеся внутренние импульсы кальция, типичные для естественной активации яйцеклеток. После этого SCNT-яйцеклетки развиваются до бластоцист, которые имплантируются в матку приемных самок-матерей.

Использование ядер эмбриональных СК дало гораздо лучшие результаты по сравнению с клетками более поздних стадий развития [27–28].

Хотя уровень успеха использования дифференцированных клеток был невысок, но он и не был нулевым. Так, мыши были клонированы из Т- и В-лимфоцитов с характерными произошедшими изменениями ДНК, Т-клеточного рецептора, которые сохранились в клетках клонированных мышей. Таким образом, каким бы ни был источник ядер, они должны находиться в фазе G1 или G0, но не в G2. В клонах, полученных от самок доноров, инактивированная X-хромосома активируется в процессе перепрограммирования. Частично может происходить и случайная реактивация, но существующая тенденция инактивации X-хромосомы стандартными механизмами говорит о постоянной эпигенетической памяти инактивации. Из-за эрозии теломер донорского ядра они могут быть короткими. Их длина может быть восстановлена в период развития клона. Невысокий успех клонирования на современном этапе мышей и крупного рогатого скота связан с наличием аномалий, полученных при дефектах плацентарного развития. Кроме того, модели экспрессии генов как клонированных мышей, так и их плацент часто являются неэффективными [29–31].

Таким образом, рассмотренные далеко не полные механизмы дифференцировки СК до плода отражают очень сложные механизмы. Они во многом становятся понятными теоретически, но существующие технологические проблемы современного этапа пока еще отодвигают получение донорских трансплантатов *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Москалев А.В., Сбойчаков В.Б., Рудой А.С. Общая иммунология с основами клинической иммунологии. М.: Гэотар-Медиа, 2015. 351 с.
2. Москалев А.В., Гумилевский Б.Ю., Сбойчаков В.Б. Медицинская иммунология с вопросами иммунной недостаточности и основами клинической иммунологии. СПб.: ВМА, 2019. 327 с.
3. Ярилин А.А. Иммунология / А.А. Ярилин. М.: Гэотар-Медиа, 2010. 957 с.
4. 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
5. Augui S., Nora E.P., Heard E. Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre // *Nat Rev Genet.* 2011. Vol. 12, No. 6. P. 429–442. DOI: 10.1038/nrg2987
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. Gjorevski N., Ranga A., Lutolf M.P. Bioengineering approaches to guide stem cell-based organogenesis. *Development.* 2014. Vol. 141, No. 9. P. 1794–804. DOI: 10.1242/dev.101048
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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, No. 1. P. 4–15. DOI.org/10.1002/elsc.201300013
13. Nomikos M., Swann K., Lai F.A. Starting a new life: sperm PLC-zeta mobilizes the Ca²⁺ signal that induces egg activation and embryo development: an essential phospholipase C with implications

for male infertility // *Bioessays*. 2012. Vol. 34, No. 2. P. 126–134. DOI: 10.1002/bies.201100127

14. Richardson B.E., Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010. Vol. 11, No. 1. P. 37–49. DOI: 10.1038/nrm2815

15. Rossant J., Tam P.P.L. New Insights into Early Human Development: Lessons for Stem Cell Derivation and Differentiation // *Cell Stem Cell*. 2017. Vol. 20, No. 1. P. 18–28. DOI: 10.1016/j.stem.2016.12.004.

16. Sasaki K., Nakamura T., Okamoto I., et al. The Germ Cell Fate of Cynomolgus Monkeys Is Specified in the Nascent Amnion // *Dev Cell*. 2016. Vol. 39, No. 2. P. 169–185. DOI: 10.1016/j.devcel.2016.09.007

17. Slack J.M.W. *The science of stem cells*. Wiley, 2018. P. 248.

18. 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

19. 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

20. Abbas A.K., Lichtman A.N., Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 9th edition. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company. 2018. P. 565.

21. 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

22. 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

23. 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

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

25. 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

26. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Liang Z, 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

27. 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. Vol. 12, No. 12. P. 1143–1149. DOI: 10.1038/nmeth.3630

28. Wu Y, Chen L, Scott PG, 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

29. Ison K., De Nardin E. *Contemporary clinical immunology and serology*. New Jersey: Upper Saddle River, 2013. 439 p.

30. Rose N.R., Mackay I.R. *The autoimmune diseases*. 5th edition. Philadelphia, 2018. 1265 p.

31. Zabriskie JB. *Essential clinical immunology*. N.Y., 2009. 362 p.

REFERENCES

1. Moskalev AV, Sboichakov VB, Rudoi AS. *Obschaya immunologia s osnovami klinicheskoi immunologii*. Moscow: Geotar-Media; 2015. P. 351. (In Russ.).

2. Moskalev AV, Gumilevskiy BY, Sboychakov VB. *Medicinskay immunologia s voprosami immunnoy nedostatochnosti i osnovami klinicheskoy immunologii*. Saint Petersburg: VMA. 2019;327. (In Russ.).

3. Yarilin AA. *Immunologia*. Moscow: Geotar-Media; 2010. P. 957. (In Russ.).

4. 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

5. Augui S, Nora EP, Heard E. Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. *Nat Rev Genet*. 2011;12(6):429–442. DOI: 10.1038/nrg2987

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. Gjorevski N, Ranga A, Lutolf MP. Bioengineering approaches to guide stem cell-based organogenesis. *Development*. 2014;141(9):1794–804. DOI: 10.1242/dev.101048

8. 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

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

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

10. 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

11. 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

12. Liu N, Zang R, Yang ST, et al. Stem cell engineering in bioreactors for large-scale bioprocessing. *Engineering in Life Sciences*. 2014;14(1):4–15. DOI.org/10.1002/elsc.201300013

13. Nomikos M, Swann K, Lai FA. Starting a new life: sperm PLC-zeta mobilizes the Ca²⁺ signal that induces egg activation and embryo development: an essential phospholipase C with implications for male infertility. *Bioessays*. 2012;34(2):126–134. DOI: 10.1002/bies.201100127

14. Richardson BE, Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(1):37–49. DOI: 10.1038/nrm2815

15. Rossant J, Tam PPL. New Insights into Early Human Development: Lessons for Stem Cell Derivation and Differentiation. *Cell Stem Cell*. 2017;20(1):18–28. DOI: 10.1016/j.stem.2016.12.004.

16. Sasaki K, Nakamura T, Okamoto I, et al. The Germ Cell Fate of Cynomolgus Monkeys Is Specified in the Nascent Amnion. *Dev Cell*. 2016;39(2):169–185. DOI: 10.1016/j.devcel.2016.09.007

17. Slack JMW. *The science of stem cells*. Wiley; 2018. P. 248.

18. 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
19. 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
20. Abbas AK, Lichtman AN, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 9th edition. Philadelphia, Pennsylvania: WB. Saunders Company 2018. P. 565.
21. 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
22. 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
23. 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
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. 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
26. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Liang Z, 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
27. 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
28. 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
29. Ison K, De Nardin E. *Contemporary clinical immunology and serology*. New Jersey: Upper Saddle River; 2013. 439 p.
30. Rose NR, Mackay IR. *The autoimmune diseases*. 5th edition. Philadelphia; 2018. 1265 p.
31. Zabriskie JB. *Essential clinical immunology*. N.Y., 2009. 362 p.

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; ORCID: 0000-0003-1199-0911; SPIN-код: 7215-6206

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. Apcel, 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. Tsygan, doctor of medical sciences, professor; ORCID: 0000-0003-1199-0911; SPIN-код: 7215-6206

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author