

УДК: 611-013.3:576.3

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma81372>

# ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ И ВАРИАНТЫ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

А.В. Москалев<sup>1</sup>, Б.Ю. Гумилевский<sup>1</sup>, В.Я. Апчел<sup>1, 2</sup>, В.Н. Цыган<sup>1</sup><sup>1</sup> Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия<sup>2</sup> Российский государственный педагогический университет имени А.И. Герцена Минобрнауки России, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Рассматриваются актуальные вопросы, связанные с технологией выделения и механизмами развития плюрипотентных стволовых клеток и их применением в медицине. Выделение, а также последующее использование стволовых клеток до настоящего времени остаются нерешенной проблемой как с научной точки зрения, так и, особенно, в практическом здравоохранении. Существует три способа получения плюрипотентных стволовых клеток. Во-первых, они могут быть получены *in vitro* из культуры клеток внутреннего слоя бластоцисты. Это эмбриональные стволовые клетки. Во-вторых, они могут быть получены из соматических клеток в результате введения группы генов, индуцирующих плюрипотентность. Это индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Наконец, они могут быть получены в результате трансплантации ядра соматических клеток в энуклеированный овоцит. Микроокружение яйцеклетки способствует перепрограммированию ядра до состояния близкого к зиготе. Мышиные эмбриональные стволовые клетки на своей поверхности имеют многие эмбриональные маркеры: углеводные рецепторы — CD15, щелочную фосфатазу, фактор 4, подобный Крупелю, рецептор, связанный с эстрогеном, транскрипционный фактор SP2, подобный 1, T-бокс транскрипционный фактор и гастрюляционный гомеобокс мозга 2. Эмбриональные стволовые клетки мыши дифференцируются из внутренней массы клеток на стадии преимплантации эпибласта. Это установлено на основании сравнения профилей экспрессии генов и на прямой изоляции эмбриональных стволовых клеток от эпибластов 4,5-дневных оплодотворенных яйцеклеток. Эмбриональные стволовые клетки, полученные из эмбрионов мыши более поздних стадий развития, теряют маркеры плюрипотентности. Примерно через 3 дня после элиминирования фактора ингибирования лейкемии экспрессия гена *Oct4* приводит к потере маркеров специфичности клетками раннего эмбриона. В настоящее время перепрограммирование плюрипотентности является активной областью исследований, в которой достигнут значимый технический прогресс. Так, используется оригинальный генный коктейль, состоящий из четырех генов: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *cMyc*. Получены эмбриональные стволовые клетки мыши и человека из оплодотворенных бластоцист и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Однако это не касается плюрипотентных стволовых клеток, полученных от постнатальных животных, человека или из внеэмбриональных источников, таких как амниотическая жидкость или пуповинная кровь. Несмотря на то, что многие лаборатории работают над получением стволовых клеток из этих объектов, к сожалению, их воспроизводимость недостаточна, а свойства полученных клеток и даже их существование по-прежнему являются объектом споров.

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

## Как цитировать:

Москалев А.В., Гумилевский Б.Ю., Апчел В.Я., Цыган В.Н. Физиологические особенности развития и варианты технологии получения плюрипотентных стволовых клеток // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2022. Т. 24, № 3. С. 581–592. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma81372>

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma81372>

# PHYSIOLOGICAL FEATURES OF DEVELOPMENT AND OPTIONS FOR TECHNOLOGY FOR OBTAINING PLURIPOTENT STEM CELLS

A.V. Moskalev<sup>1</sup>, B.Yu. Gumilevskiy<sup>1</sup>, V.Ya. Apchel<sup>1, 2</sup>, V.N. Cygan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Military Medical Academy of S.M. Kirov, Saint Petersburg, Russia

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

**ABSTRACT.** Topical issues related to the technology of isolation and mechanisms of development of pluripotent stem cells and their application in medicine are considered. The isolation, as well as the subsequent use of stem cells, still remains an unsolved problem both from a scientific point of view and especially in practical health care. There are three ways to produce pluripotent stem cells. First, they can be obtained in vitro from cell culture of the inner layer of early eggs. These are embryonic stem cells. Second, they can be obtained from somatic cells, as a result of the introduction of a group of genes that induce pluripotency. These are induced pluripotent stem cells. Finally, they can be obtained by transplanting the nucleus of somatic cells into an enucleated secondary egg. The microenvironment of the egg contributes to the reprogramming of the nucleus to a state close to the zygote. Mouse embryonic stem cells have many embryonic markers on their surface: carbohydrate receptors — CD15, alkaline phosphatase, factor 4 like Kruppel, estrogen-bound receptor, transcription factor CP2 like 1, T-box transcription factor and gastrulation homeobox brain 2. Embryonic mouse stem cells differentiate from the internal mass of cells at the stage of preimplantation, epiblast. This is established by comparing gene expression profiles and directly isolating embryonic stem cells from epiblasts of 4.5-day-old fertilized eggs. Embryonic stem cells derived from mouse embryos of later stages of development lose markers of pluripotency. Approximately 3 days after the elimination of the leukemia inhibition factor, the expression of the Oct4 gene leads to the loss of specificity markers by cells of the early embryo. Currently, the reprogramming of pluripotency is an active area of research in which significant technological progress has been made. So, the original gene cocktail consisting of four genes is used: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* and *cMyc*. The obtained types of embryonic stem cells of mouse and human, from fertilized blastocysts, induced pluripotent stem cells undoubtedly exist. However, this does not apply to pluripotent stem cells derived from postnatal animals, humans, or from extraembryonic sources such as amniotic fluid or cord blood. Despite the fact that many laboratories are working to obtain stem cells from these objects, unfortunately, there is little reproducibility in this work, and the properties of the resulting cells and even their existence are still the subject of controversy.

**Keywords:** genes; cellular differentiation; modifications; mutations; nucleic acids; stem cell; plasmids; promoter; transcription factors; phenotype; chromosome; translocation.

**To cite this article:**

Moskalev AV, Gumilevskiy BYu, Apchel VYa, Cygan VN. Physiological features of development and options for technology for obtaining pluripotent stem cells. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2022;24(3):581–592. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma81372>

Received: 10.07.2022

Accepted: 04.08.2022

Published: 25.09.2022

## ВВЕДЕНИЕ

Проблемы, связанные с выделением стволовых клеток (СК), их последующим применением по-прежнему остаются нерешенной проблемой, как с научной точки зрения, так и, особенно, в практическом здравоохранении. Нерешенность практических вопросов связана с недостаточными знаниями биологических и физиологических особенностей этих клеток. Необходимо рассмотреть основные теоретические научные данные, которые исследователи получили на сегодняшний день.

**Цель исследования** — на основании отечественного и мирового опыта оценить методики и перспективы выделения СК, их применение в медицине, а также доведение до широкого круга читателей вопросов, связанных с технологией выделения СК и механизмами их биологического развития.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучена отечественная и зарубежная литература, отражающая особенности дифференцировки и варианты технологии получения плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) и основные вопросы, связанные с их развитием.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Плюрипотентные стволовые клетки по своей структуре и организации напоминают эпибласт раннего эмбриона. Теоретически ПСК могут быть получены в неограниченном количестве *in vitro*. Эти клетки могут дифференцироваться в большинство клеток и тканей организма, то есть являются тотипотентными, образующими однородные яйцеклетки, состоящие из внутреннего клеточного слоя, формирующего трофобласт. Единственными тотипотентными клетками (ТК) млекопитающих являются зигота и первые несколько бластомер, образованных делением зиготы. К ПСК относятся все типы клеток, кроме трофоэктодермы, в том числе не только ткани плода, но и различные типы внезародышевой ткани, такие как висцеральная энтодерма. Такие клетки являются мультипотентными, образующими определенные субтипы клеток при естественных обстоятельствах, и охватывают большинство тканей конкретных популяций СК, выявленных во взрослом организме [1–3].

Существует три способа получения ПСК. Во-первых, они могут быть получены *in vitro* из культуры клеток внутреннего слоя бластоцисты, это эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). Во-вторых, они могут быть получены из соматических клеток в результате введения группы генов, индуцирующих плюрипотентность, это индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). Наконец, они могут быть получены в результате трансплантации ядра соматических клеток в энуклеированную вторичную яйцеклетку (somatic cell nuclear transfer — SCNT).

Микроокружение яйцеклетки способствует перепрограммированию ядра до состояния близкого к зиготе. В результате оплодотворенная яйцеклетка может быть получена в «пробирке» и быть источником клеточной линии. ПСК, полученные с помощью этих методик, являются практически идентичными, но существуют и весьма важные различия [4].

ЭСК мыши впервые были получены еще в 1980 г. в результате культивирования *in vitro* внутренней массы клеток (ВМК) мышинных бластоцист. Естественно, что с тех пор методы и методики получения ЭСК были значительно усовершенствованы. Первоначально ЭСК были получены из фидер-клеток, являющихся фибробластами, потерявшими способность к делению. Фидер-клетки остаются живыми и секретируют необходимые факторы для роста ПСК. Одним из таких важнейших факторов является фактор ингибирующий лейкемию (Leukemia inhibitory factor — LIF), принадлежащий к семейству интерлейкина 6. Трансдукция сигнала осуществляется через путь Янус-киназа (трансдуктор сигнала и активатор транскрипции — Janus Kinases — signal transducer and activator of transcription — JAK-STAT). В настоящее время фидер-клетки по-прежнему широко используются для получения ЭСК. Кроме того, ЭСК мыши можно культивировать и в бессывороточной питательной среде, содержащей LIF, а также ингибиторы сигнальных путей — митоген-активированные внеклеточные сигнальные регуляторы киназы (MEK), киназу гликогенсинтазы 3β (glycogen synthase kinase — GSK3), которые обычно активируются фактором роста фибробластов (FGF) и белками Wnt. MEK инактивируется мирдаметинибом PD0325901, а GSK3 — тригидрохлоридом CHIR99021. Первоначально в таких средах можно было культивировать ЭСК 129 штаммов мыши, однако в настоящее время количество штаммов может быть значительно расширено, в том числе и от крыс. В питательной среде ЭСК растут как куполообразные скопления рефракционных клеток. Эти скопления могут быть разобщены соответствующими ферментами, после чего одиночные клетки могут образовывать новые колонии. Такие клетки имеют большие ядра, четкие нуклеолы и мало цитоплазмы. Их плюрипотентные свойства зависят от сети транскрипционных факторов, из которых *Oct4* (*POU5F1*), *Sox2* и *Nanog* составляют основную группу. Эти три фактора вместе способствуют их собственной транскрипции, тем самым генерируя стабильную автокаталитическую петлю, которая поддерживает плюрипотентное состояние до тех пор, пока клеточная среда остается постоянной. Они также связываются с многочисленными участками по всему геному и подавляют экспрессию целого ряда генов контроля раннего развития [5–7].

Многие такие гены имеют промотеры, находящиеся в хроматине, являющиеся модификациями гистонов активации и ингибирования. Так, с триметилированием лизина 4 на гистоне H3 (H4K3Me3) связаны процессы активации, а с H4K27Me3 — ингибирования. Это состояние

хрупкого динамического равновесия свидетельствует о том, что небольшой стимул может либо активировать, либо подавлять гены контроля развития. При нормальном развитии глобальное ремитилирование генома начинается на стадии бластоцисты. Поэтому предшественники ЭСК и сами ЭСК имеют почти нормальный уровень метилирования дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и сохраняют следы своего эмбрионального происхождения. ЭСК самки мыши обычно имеют обе активные X-хромосомы. Это свидетельствует о том, что они находятся в состоянии развития до случайной X-инактивации, обычно происходящей в эпибласте. Мышиные ЭСК на своей поверхности имеют многие эмбриональные маркеры: углеводные рецепторы SSEA1 (CD15), щелочную фосфатазу, также экспрессируют и другие маркеры плюрипотентности: фактор 4, подобный Круппелю ((Krüppel-like factor 4, 2 — KLF4, 2), рецептор, связанный с эстрогеном (estrogen related receptor beta — ESRRB), транскрипционный фактор CP2, подобный 1 (transcription factor CP2 like 1 — TFCP2L1), T-бокс транскрипционный фактор (TBX3) и гастрюляционный гомеобок мозга 2 (Gastrulation Brain Homeobox 2 — GBX2). ЭСК мыши дифференцируются из ВМК на стадии преимплантации эпибласта. Это установлено на основании сравнения профилей экспрессии генов и на прямой изоляции ЭСК от эпибластов 4,5-дневных оплодотворенных яйцеклеток. ЭСК могут быть получены из материала 8,5–11,5-дневных эмбрионов мыши. ЭСК, полученные из эмбрионов мыши более поздних стадий развития, теряют маркеры плюрипотентности [8–10].

Существуют три различных варианта определения потенциала дифференцировки ЭСК мыши (рис. 1).

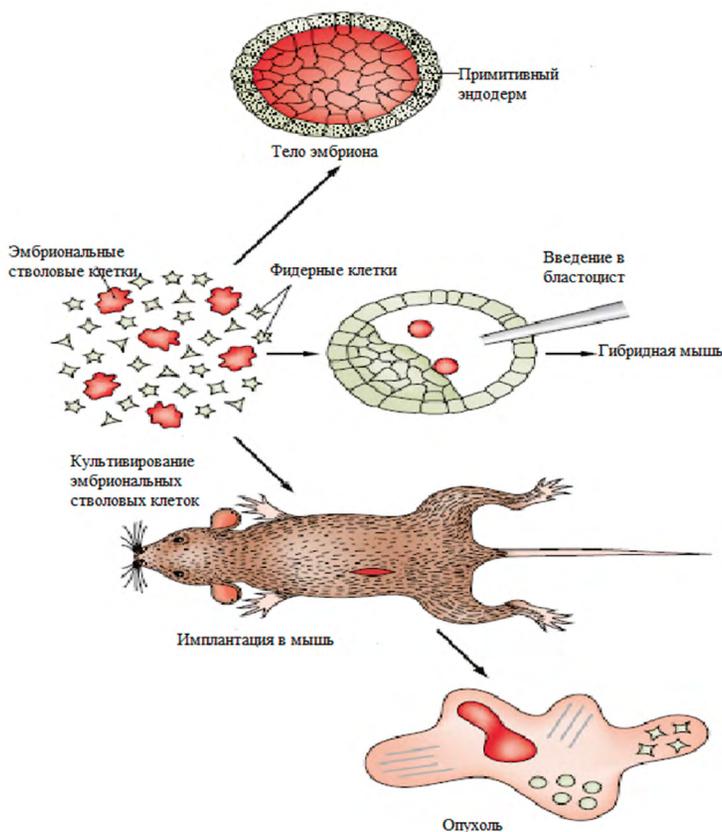
Во-первых, это дифференциация в «пробирке», начинающаяся при удалении LIF и 2i-ингибиторов. Если клетки способны к агрегированию, то полученные структуры образуют эмбриоидные тела (ЭТ). Первичная ткань дифференцируется в первичную энтодерму по всему ЭТ. Образование энтодермы сопровождается элиминированием Nanog и дисрегуляцией экспрессии GATA6. Примерно через 3 дня после элиминирования LIF экспрессия гена *Oct4* приводит к потере маркеров специфичности ранним эмбрионом. К ним относится эмбриональный транскрипционный фактор, кодируемый генами *T* и *Sox17*. Затем появляются индивидуальные маркеры для органов, например, тропонин С для сердечной мышцы. Временная шкала развития ЭТ аналогична обычной временной шкале эмбрионального развития, но пространственная организация эмбрионов в значительной степени отсутствует. Вероятно, это связано с тем, что ЭТ, как правило, гораздо больше, чем реальные ВМК или эпибласты. Поэтому они обеспечивают иную среду межклеточных контактов, внеклеточной матрицы и индуцирующих факторов, выделяемых близлежащими клетками [11].

Вторым типом дифференциации является формирование тератомы. Если ЭСК мыши имплантируются в иммунологически толерантную взрослую мышшь, то, как правило,

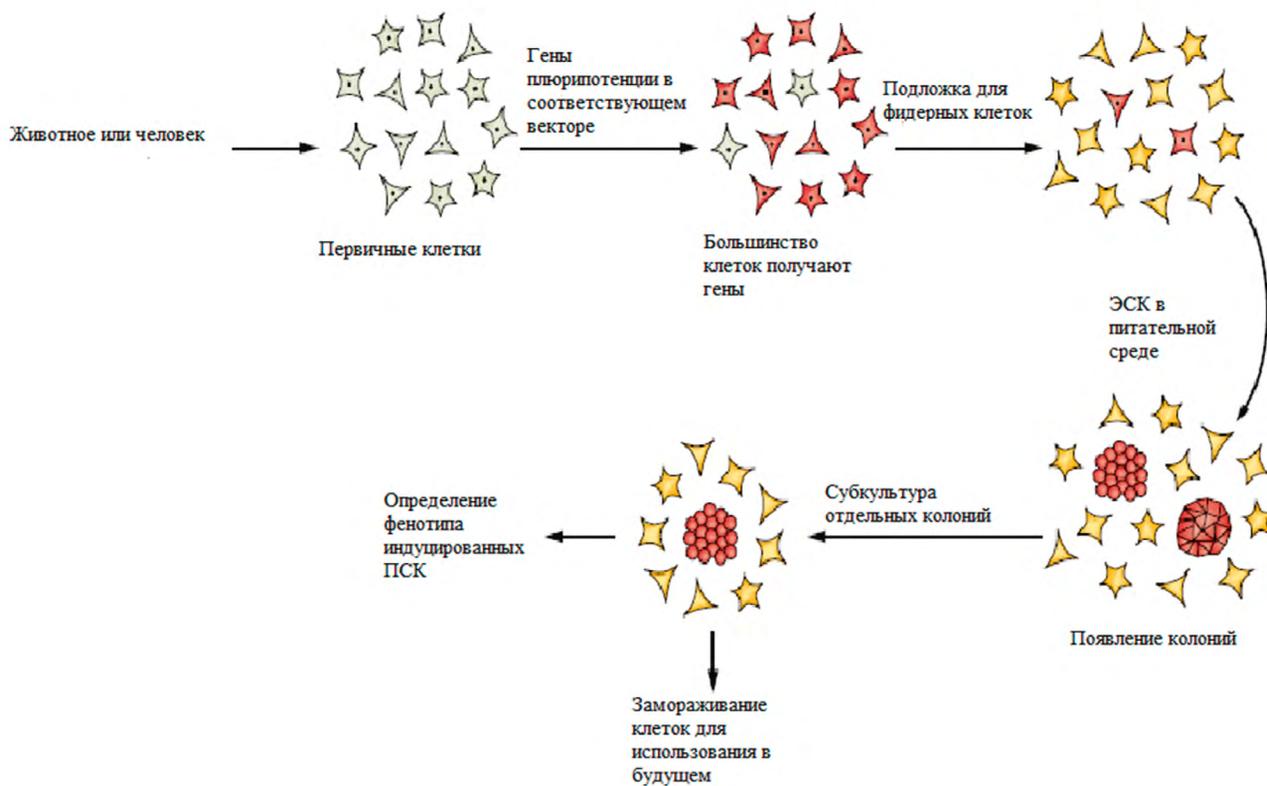
под кожей или внутри мышцы образуется опухоль (тератома). Она содержит компоненты трех зародышевых эмбриональных слоев, устойчивые ПСК, обеспечивающие увеличение опухоли. Тератомы нуждаются в минимальном количестве ПСК. Однако патогенетические механизмы формирования тератомы изучены недостаточно. Так, например, неизвестно, какое количество клеток необходимо для формирования тератомы [12–13].

Третий тип дифференциации осуществляется, если ЭСК мыши вводятся повторно в полость бластоцисты ранней оплодотворенной яйцеклетки или агрегированием с ранними бластомерами (см. рис. 1). ЭСК мыши контактируют с ВМК и способствуют формированию и развитию всех структур и тканей эмбриона. В таких экспериментах донорские клетки генетически отличаются от клеток реципиента. Поэтому полученный эмбрион, состоящий из двух генетически различных популяций клеток, будет гибридным (химерным). Если эмбрионы реимплантируются в матку реципиентной самки мыши, то они развиваются в более ранние сроки, что позволяет выращивать и спаривать гибридных мышей. Таким образом можно получать потомство с генетическими маркерами оригинальной линии ЭСК. Это подтверждает происхождение функциональных зародышевых клеток из ЭСК, введенных в эмбрион, и гибридизация зародышевой линии, что используется для незначительно дефектных линий ЭСК при генерации химер. Таким образом, формирование зародышевой гибридной линии является «золотым стандартом» плюрипотентного поведения клеток [14].

Тетраплоидные клетки — клетки с двойным набором хромосом. Тетраплоидные эмбрионы мыши могут быть получены электрофузией первых двух бластомер, которые генерируют новую зиготу с двойным набором хромосом. Тетраплоидные эмбрионы не способны развиваться соответствующим образом, но могут образовывать экстраэмбриональные структуры, необходимые для развития диплоидного плода. Поэтому если нормальные СК или ЭСК мыши имплантируются в бластоцисту тетраплоидного образования, то донорские клетки формируют весь эмбрион, а тетраплоидные клетки образуют плаценту. Способность формировать целый эмбрион является более важным критерием плюрипотентности клеток, чем зародышевые химерные линии, так как только отдельные линии ЭСК мыши могут осуществлять это успешно. Можно генерировать ПСК не только из ВМК эмбриона, но и из эпибластов ранних стадий постимплантации, это — эпибластные СК (EpiSCs). Они соответствуют базовому определению ПСК с точки зрения роста культуры без ограничений и способны формировать широкий спектр образований — либо ЭТ, либо тератомы. Однако они отличаются от обычных ЭСК. Во-первых, колонии EpiSC плоские, во-вторых, не образуют клоны, в-третьих EpiSC не растут в присутствии LIF, но требуют активации и наличия в питательной среде FGF. В-четвертых, они не генерируют химеризм в эмбрионах мышей, дополнительные факторы транскрипции,



**Рис. 1.** Дифференциация ЭСК мыши. ЭСК формируют тело эмбриона в пробирке, в естественных условиях — тератому  
**Fig. 1.** Differentiation behavior of mouse embryonic stem cells. They can form embryoid bodies in vitro, teratomas in vivo, and contribute to mouse embryos if introduced at an early stage



**Рис. 2.** Этапы получения ПСК  
**Fig. 2.** Procedure for making induced pluripotent stem cells

присутствующие в ЭСК мыши, отсутствуют, а ген *Oct4* контролируется различными усиливающими агентами. Общий уровень метилирования генома высокий, и EpiSC самок имеют только одну активную хромосому. Такие клетки, полученные из ЭСК мышей, находятся в отчетливом плюрипотентном состоянии. Клетки, полученные из ВМК, являются «наивными», неинформированными, а клетки из эпибласта — примированными. Возможно преобразование ЭСК мыши в EpiSC, добавив в питательную среду активин/FGF. Обратная трансформация от EpiSC к ЭСК мыши возможна усилением экспрессии гена *Klf4*, одного из вспомогательных факторов плюрипотенции, связанных с транскрипцией [15–16].

В 2006 г. было обнаружено, что существует возможность перепрограммирования обычных соматических клеток путем введения группы генов плюрипотентности. Полученные клетки являются индуцированными ПСК. В настоящее время перепрограммирование плюрипотентности является активной областью исследований, в которой достигнут значительный технический прогресс. Так, используется оригинальный генный коктейль, состоящий из четырех генов: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *cMyc*. *Oct4* и *Sox2* являются частью основной сети плюрипотенции транскрипционных факторов ЭСК, а *Klf4* — вспомогательным фактором транскрипции, также связанным с плюрипотенцией (рис. 2) [17].

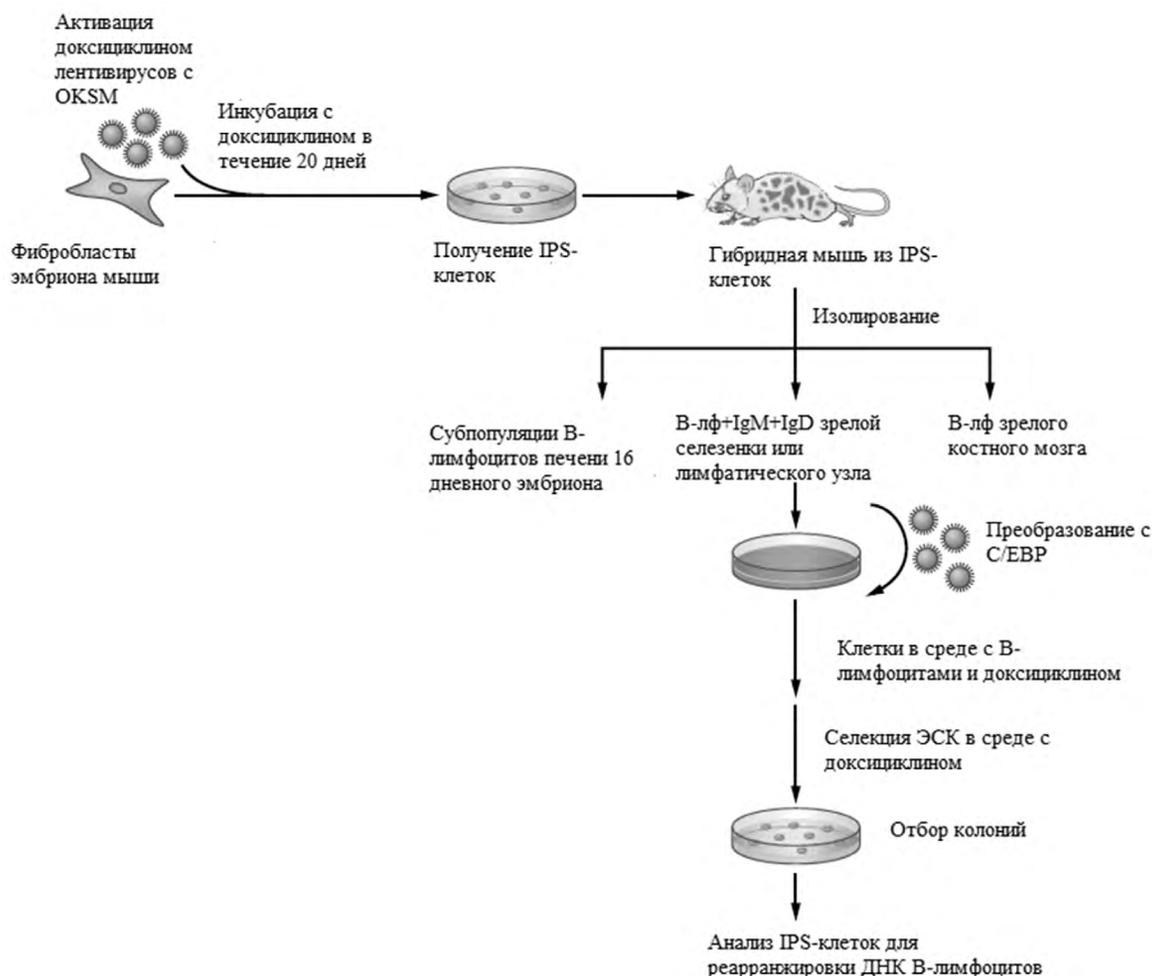
cMYC — многофункциональный фактор, увеличивающий скорость деления клеток, которая способствует процессу перепрограммирования. Практически все программы использования различных комбинаций генов включают *Oct4*. Первоначально доставка осуществлялась с помощью ретровирусов, которые интегрировались в геном целевых клеток. Однако последние исследования показали, что интеграция не была существенной и что перепрограммирование может быть достигнуто с помощью неинтеграционных технологий. Важно то, что синтез генных продуктов идет на высоком уровне параллельно с делением клеток, например, через использование собственной репликации эписом или рибонуклеиновой кислоты (РНК) вируса Сендай (РНК-РНК репликация) или повторные трансфекции РНК с кодированием необходимых генов. Также еще используются методики, которые не позволяют достичь высокого уровня синтеза генных продуктов, но они остаются малоэффективными. Перепрограммируется обычно лишь несколько клеток из целой популяции. Они растут в среде для ЭСК мыши, где появляются как куполообразные рефрактивные колонии, которые могут быть изолированы, и в дальнейшем их количество может быть увеличено. Клетки, которые используются в экспериментах с мышами, как правило, фибробласты, полученные из эмбрионов, — мышинные эмбриональные фибробласты (MEFs). Пока этот процесс исследован недостаточно. Последние исследования показали, что перепрограммированные клетки не являются СК. Исследование механизмов формирования ИПСК

показало, что они во многом зависят от использования индуцибельных структурных генов, особенно доксициклиновой системы. В этой системе ген «интереса» помещен под контроль тетрациклинового элемента реакции (TRE), основанного на операторе Tet от *E. coli*. Клетки также поставляются с генами, экспрессированными активатором Tet (rtTA-версия) под контролем конститутивного промотера. Поступление доксициклина способствует активации транскрипции TRE. Первоначально это было использовано для регулирования экспрессии генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *cMyc* (OKSM) в переносчиках-лентивирусах, которые могут интегрироваться в ДНК клеток-мишеней. Если ИПСК активируются дозированно клетками с доксициклином, то после изъятия препарата ИПСК сохраняются и продолжают расти. Это свидетельствует о том, что постоянного переноса генов не требуется, так как ИПСК уже экспрессируют сеть генов плюрипотентности, включая *Oct4*, *Sox2* и *Nanog* от собственных эндогенных генов, образуя стабильную самоподдерживающую систему [18–20].

Однако постоянная экспрессия генов OKSM препятствует дифференциации ИПСК. Поэтому для достижения дифференциации необходимо блокировать их экспрессию. Установлено, что ИПСК могут происходить из большинства соматических клеток, а не только из редких СК, находящихся в исходном материале. Химерные мыши были получены из ИПСК, содержащих OKSM, под контролем доксициклина и введения этих клеток в мышинные бластоцисты. Полученные мыши используются в качестве источника предшественников В- или зрелых В-лимфоцитов, выделенных микрофлюидным одноклеточным транскрипционным анализом из костного мозга или селезенки и позволяющим идентифицировать новые профили поверхностных маркеров. Такие клетки помещаются по одной в лунки для дифференциации в присутствии факторов роста [21].

Добавление доксициклина индуцировало образование колоний ИПСК в этих клональных структурах. Установлено, что все колонии ИПСК имеют такую же характеристику ДНК генов антител, как и продуцирующие их В-лимфоциты (рис. 3). В случае использования зрелых В-лимфоцитов для получения ИПСК требовалась переэкспрессия дополнительного гена — *C/EBP $\alpha$* . Таким образом, в эксперименте было показано, что все предшественники В-лимфоцитов, обработанные доксициклином, в конечном итоге будут генерировать колонии ИПСК. Это еще раз доказывает, что даже клетка, дифференцированная с помощью переарранжировки ДНК, может быть преобразована в ИПСК и что каждая клетка, а не только отдельные субпопуляции, может образовывать ИПСК [22–23].

Биологические характеристики мышинных ИПСК близки к характеристикам ЭСК мыши. Они растут как рефракционные колонии в среде LIF/2i или в других средах для ЭСК мыши. Они самостоятельно экспрессируют плюрипотентные гены регуляторы сети. Изучение генов эндогенной плюрипотентности показывает, что ингибирующие



**Рис. 3.** Формирование ИПСК. Химерные мыши обрабатываются клетками, содержащими доксициклин и индуцибельные ОКSM трансгены. В-лимфоциты культивируются и преобразуются в ИПСК

**Fig. 3.** Formation of iPS cells from fully differentiated precursors. Here chimeric mice are generated with some cells containing doxycycline-inducible OKSM transgenes. B-lymphocytes are cultured and transformed into iPS

метилирование ДНК были удалены от их промоторов. Они также имеют и другие характерные маркеры — поверхностные полисахариды SSEA1 клеток и фермент — щелочную фосфатазу. В женских клетках активируются неактивные X-хромосомы [24].

Когда LIF элиминируется, клетки будут формировать ЭТ с типичными моделями дифференциации. Они также формируют тератомы при введении иммунологически совместимым взрослым животным и образуют все три эмбриональных зародышевых слоя. Лучшее качество мышиных ИПСК — генерирование химерных зародышевых линий при введении в предимплантационный эмбрион, а в некоторых случаях может быть достигнута тетраплоидная комплектация. Интересно, что в процессе активации ИПСК первой появляется щелочная фосфатаза, за ней SSEA1, и только после этого устанавливается эндогенная Nanog-регуляция и создается сеть генов автокаталитической плюрипотентности. Таким образом, мышиные ИПСК не идентичны ЭСК мыши [25].

Тщательное изучение всех экспрессированных профилей генома с помощью RNAseq показывает,

что они схожи, но не идентичны. Также часто выявляются остаточные эпигенетические особенности: метилирование ДНК, модификация гистонов, которые были у родительских клеток и не были полностью стерты. Это свидетельствует о том, что ИПСК могут более легко дифференцироваться в типы клеток происхождения, а не в другие типы. Исследования такого рода показали, что клетки могут находиться в различных плюрипотентных состояниях, отличающихся по стабильности, приближающей их к нормальному состоянию ЭСК. Так как такие различия могут существенно повлиять на процесс дифференцировки клеток, необходимо перед началом работы с линией ИПСК клеток тщательно изучить ее биологические особенности [26].

ЭСК человека впервые были получены 1998 г. с использованием тех же методик, что и для мышей. Плюрипотентные клетки человека были получены из их ВМК. Эти клетки растут на подложке как рефракционные колонии, экспрессируют основные гены плюрипотентности и щелочную фосфатазу. Как ПСК они могут дифференцироваться в ЭТ и при введении иммунодефицитным мышам

могут образовывать тератомы, содержащие производные всех трех зародышевых слоев (дефинитивную энтодерму, мезодерму и эктодерму) [27].

Несмотря на сходство ЭСК человека и ЭСК мыши, между ними существует ряд различий. ЭСК человека растут как плоские колонии. Для своего роста они требуют вместо LIF активин и FGF, а одиночные клетки не могут образовывать новые колонии. Они не экспрессируют стадийспецифический эмбриональный антиген 1-го типа (SSEA-1 или CD15), хотя имеют набор антигенов, выявленных в клетках эмбриональной карциномы человека: SSEA-3 и SSEA-4, являющихся углеводными поверхностными клеточными структурами, и также TRA 1-60 и 1-81. Женские линии имеют одну инактивированную X-хромосому. Не установлена возможность ЭСК человека образовывать химерные эмбрионы при введении в бластоцисты человека, так как такой эксперимент является неэтичным. Однако эксперименты с ЭСК приматов показали, что в этом случае химеризм вряд ли возможен. Перечисленные характеристики более близки «первичным» ЭСК мыши, полученным из постимплантационных эпибластов, чем «наивным» ЭСК, полученным из преимплантационного эпибласта или ВКМ. Таким образом, ЭСК человека эквивалентны мышинным EpiSC. Также были описаны различные методики, включая переэкспрессию генов, использование лекарственных препаратов и ингибиторов, позволяющих преобразовывать ЭСК человека во что-то похожее на «наивное» состояние мыши [28, 29].

Исходя из вышеперечисленного, остается неясным, существует ли реальное, стабильное «наивное» состояние ЭСК человека. ЭСК человека детально изучались с целью использования их в трансплантологии, чтобы они были иммунологически совместимы с хозяином. ИПСК человека, как и другие клеточные культуры, накапливают соматические мутации. В отличие от «наивных» клеток, ИПСК человека несут около шести несинонимических точечных мутаций, а также могут нести вариации копий. Существование таких мутаций неудивительно, учитывая технологию получения линий ИПСК-человека *in vitro*. ПСК человека, так же как ЭСК, очень непросто культивировать в основном из-за низкой эффективности клонирования. Таким образом, наиболее эффективным способом получения субкультуры является ручной, путем послыной разрезки колоний на более мелкие части, которые перекрываются и могут увеличиваться. Становятся более доступными и питательные среды для культур клеток. Например, среды с ламинином 521 и E-кадгеринном, свободные от продуктов животного происхождения, позволяют получить ЭСК человека из одной бластомеры. Помимо ЭСК человека и ИПСК третий способ получения плюрипотентных клеточных линий связан с SCNT. Соматическое ядро в среде яйцеклеток перепрограммируется и поддерживает развитие бластулы. На этом этапе ВКМ может быть использована в качестве источника клеток, как естественно оплодотворенная яйцеклетка. Таким

образом, были получены несколько линий ЭСК из бластоцист мышинных SCNT. Вероятно, что за несколько дней до созревания ИПСК возможно получение индивидуальных ЭСК человека, генетически таких же, как донорские соматические ядра. Сравнение SCNT ЭСК, полученных лабораторным путем, с ЭСК и ИПСК эмбриона показало, что ЭСК SCNT по общей модели экспрессии генов гораздо ближе к ЭСК эмбриона, чем к ИПСК. Однако в связи с практическими и этическими трудностями вероятнее всего клеточная терапия будет связана с использованием ИПСК трансплантатов [30–31].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом можно выделить следующие типы ПСК: ЭСК мыши и человека, полученные из оплодотворенных или SCNT бластоцист и ИПСК. Они получены многими лабораториями, большинство их свойств изучены. Но это не касается ПСК, полученных от постнатальных животных, человека или из внеэмбриональных источников, таких как амниотическая жидкость или пуповинная кровь. Несмотря на то, что многие лаборатории работают над получением СК от этих объектов, к сожалению, их воспроизводимость низкая, а свойства полученных клеток и даже их существование по-прежнему являются объектом споров. Существование таких клеток кажется маловероятным, так как после стадии эпибласта идет деление тела на различные регионы и ПСК практически исчезают из эмбриона. Принятая современная иерархическая система развития не оставляет места ПСК после первой дифференцировки эпибласта. Кроме того, ПСК, введенные во взрослый организм, способствуют ИПСК-индукции генного коктейля у мышей-трансгенов, приводящего к развитию тератом, которые в естественных (природных) условиях встречаются очень редко. Однако большое количество сообщений о клетках с широкими потенциальными возможностями свидетельствует об их возможном выделении. Одним из возможных объяснений может быть то, что существуют различные варианты ПСК, оставшихся от эпибласта, находящиеся далеко от индуцирующих сигналов и не принимающих участия в нормальной дифференцировке эпибласта. Такие клетки могут находиться в любом месте, но только те, которые не подвергаются воздействию индуцирующих факторов (Wnts, FGFs, Nodals, BMPs и др.), могут сохранить плюрипотентность до рождения. Одним из таких участков и может быть амниотическая жидкость [32–34].

Такое объяснение совместимо с выводами о том, что ПСК трудно изолировать, что они гораздо чаще встречаются у перинатальных или молодых животных, чем у взрослых. Этим объясняются различия в результатах, полученных в разных лабораториях. Другим важным объяснением является роль культуральной среды. Установлено, что одни и те же клетки имеют более широкий спектр биологических эффектов *in vitro*, чем *in vivo*. Поэтому культуральные условия могут быть скорректированы

в широком диапазоне. Например, мезенхимальные СК костного мозга, вероятно, функционируют в качестве источника обновления кости *in vivo*. Но *in vitro*, при изменении культуральных условий, они могут быть источниками жировой ткани или гладкой мышцы. Вполне вероятно, что культуральные условия *in vitro* могут, по крайней мере, расширить диапазон дифференциации поведения некоторых популяций клеток [35].

Еще одним препятствием выделения ПСК *in vitro* является способ их отбора в искусственной питательной среде, где они претерпевают соматические мутации и спонтанные эпигенетические изменения. Новые варианты могут быть легко изолированы, если имеется достаточно большое количество клеток для отбора в течение длительного периода времени. Так, например, при потере эпибластом гена плюрипотентности *Oct4* он не экспрессируется ни в одном участке эмбриона мыши, кроме зародышевых клеток. Однако если клетки костного мозга поместить в среду для ЭСК и инкубировать их в течение нескольких недель, то в конечном итоге можно отобрать некоторые клоны *Oct4*-положительных клеток. Вероятно, что здесь существует сочетание нескольких механизмов: случайные оставшиеся единичные клетки эпибласта, биологические эффекты культуральной среды *in vitro* и накопление соматических мутаций. Это сложный вопрос вряд ли будет решен до тех пор, пока научные исследования не будут абсолютно надежными и воспроизводимыми. Так, были получены достоверные данные в отношении ЭСК и ИПСК, но таких данных нет в отношении ПСК, полученных из пери- или постнатальных источников [36].

До настоящего времени основное использование ПСК было связано с получением генетически модифицированных мышей по нокаутам конкретных генов. Это имеет большое значение в биологических механизмах развития для понимания роли конкретных генов. В перспективе это также может иметь значение в создании моделей мышей для лечения заболеваний человека, основанных на новых

знаниях иммунопатогенеза заболеваний. Также рассматриваются вопросы получения клеток для тестирования на наркотики и самый важный вопрос — создание клеток и тканей для использования в трансплантологии. Захватывающая новая возможность заключается в том, что с помощью межвидовой бластоцистной комплементации возможно создание целых органов для трансплантации. В этом случае готовится система «эмбрион — хозяин», в которой отсутствует ген, необходимый для формирования конкретного органа. Например, отсутствие *Pdx1* предотвращает или, по крайней мере, сильно компрометирует образование поджелудочной железы, а отсутствие *Nkx2.5* необходимо для формирования сердца. В настоящее время можно с хорошей эффективностью аблатировать гены с помощью технологии CRISPR-Cas9 непосредственно на зиготах, причем не только у мышей. ПСК, содержащие необходимый ген, вводятся в бластоцисту, а уже химерный эмбрион трансплантируется в женский репродуктивный тракт, где развивается до срока [37].

Долгосрочная перспектива заключается в том, чтобы получить органы человека в организме животного-хозяина, имплантировав в эмбрион животного нормальные ПСК человека с соответствующим абляциянным геном. Осуществлены успешные эксперименты по генерации органов крыс у мышей и наоборот, но до сих пор в силу разных причин интеграция ПСК человека крупным животным остается на низком уровне. Однако даже если органы человека в будущем могут быть получены, остается нерешенной очень серьезная проблема, связанная с кровеносными сосудами, полученными от хозяина. Кровеносные сосуды обладают высоким иммуногенным эффектом и могут быть причиной отторжения ксенотрансплантата при трансплантации. Бесспорно, что преодоление этих технических проблем займет длительный временной промежуток, однако это интереснейший пример изучения комбинированного потенциала биологических и физиологических особенностей СК и механизмов их развития.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Москалев А.В., Сбойчаков В.Б., Рудой А.С. Общая иммунология с основами клинической иммунологии. Москва: 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. Санкт-Петербург: ВМА, 2019. 327 с.
3. Ярилин А.А. Иммунология. Москва: Гэотар-Медиа, 2010. 957 с.
4. Ison K., De Nardin E. Contemporary clinical immunology and serology. New Jersey: Upper Saddle River, 2013. 439 p.
5. Duggal G., Warriar S., Ghimire S., et al. Alternative Routes to Induce Naïve Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells // Stem Cells. 2015. Vol. 33, No. 9. P. 2686–2698. DOI: 10.1002/stem.2071
6. González F., Huangfu D. Mechanisms underlying the formation of induced pluripotent stem cells // Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2016. Vol. 5, No. 1. P. 39–65. DOI: 10.1002/wdev.206
7. Nichols J., Smith A. The origin and identity of embryonic stem cells // Development. 2011. Vol. 138, No. 1. P. 3–8. DOI: 10.1242/dev.050831
8. De Los Angeles A., Ferrari F., Xi R., et al. Hallmarks of pluripotency // Nature. 2015. Vol. 525, No. 7570. P. 469–478. DOI: 10.1038/nature15515
9. Dunn S.J., Martello G., Yordanov B., et al. Defining an essential transcription factor program for naïve pluripotency // Science. 2014. Vol. 344, No. 6188. P. 1156–1160. DOI: 10.1126/science.1248882

10. 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
11. 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
12. Abad M., Mosteiro L., Pantoja C., et al. Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features // *Nature.* 2013. Vol. 502. P. 340–345. DOI: 10.1038/nature12586
13. Bulic-Jakus F., Katusic Bojanac A., Juric-Lekic G., et al. Teratoma: from spontaneous tumors to the pluripotency/malignancy assay // *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2016. Vol. 5, No. 2. P. 186–209. DOI: 10.1002/wdev.219
14. Silva M., Daheron L., Hurley H., et al. Generating iPSCs: translating cell reprogramming science into scalable and robust biomanufacturing strategies // *Cell Stem Cell.* 2015. Vol. 16, No. 1. P. 13–17. DOI: 10.1016/j.stem.2014.12.013
15. Sohni A., Verfaillie C.M. Multipotent adult progenitor cells // *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011. Vol. 24, No. 1. P. 3–11. DOI: 10.1016/j.beha.2011.01.006
16. Stadtfeld M., Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications // *Genes Dev.* 2010. Vol. 24, No. 20. P. 2239–2263. DOI: 10.1101/gad.1963910
17. Tamm C., Pijuan Galitó S., Annerén C. A comparative study of protocols for mouse embryonic stem cell culturing // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, No. 12. ID e81156. DOI: 10.1371/journal.pone.0081156
18. Ma H., Morey R., O’Neil R.C., et al. Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms // *Nature.* 2014. Vol. 511, No. 7508. P. 177–183. DOI: 10.1038/nature13551
19. Tachibana M., Amato P., Sparman M., et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer // *Cell.* 2013. Vol. 153, No. 6. P. 1228–1238. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.006
20. 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
21. Abbas A.K., Lichtman A.N., Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology.* 9-th edition. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 2018. 565 p.
22. 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
23. 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
24. 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
25. 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
26. Yamaguchi T., Sato H., Kato-Itoh M., et al. Interspecies organogenesis generates autologous functional islets // *Nature.* 2017. Vol. 542, No. 7640. P. 191–196. DOI: 10.1038/nature21070
27. 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
28. 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
29. 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
30. Liu N., Zang R., Yang S.T., Li Y. Stem cell engineering in bioreactors for large-scale bioprocessing // *Eng Life Sci.* 2014. Vol. 14. P. 4–15. DOI: 10.1002/elsc.201300013
31. 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
32. Slack J.M.W. *The science of stem cells.* John Wiley and Sons Inc., 2018. 248 p. DOI: 10.1002/9781119235293
33. 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
34. Wu Y., Chen L., Scott P.G., Tredget E.E. 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
35. 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
36. 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
37. 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

## REFERENCES

1. Moskalev AV, Sboichakov VB, Rudoi AS. *Obshchaya immunologiya s osnovami klinicheskoi immunologii.* Moscow: GEOTAR-Media, 2015. 351 p. (In Russ.).
2. Moskalev AV, Gumilevskii BYu, Sboichakov VB. *Meditinskaya immunologiya s voprosami immunnnoi nedostatochnosti i osnovami klinicheskoi immunologii.* Saint Petersburg: VMA, 2019. 327 p. (In Russ.).

3. Yarilin AA. *Immunologiya*. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 957 p. (In Russ.).
4. Ison K, De Nardin E. *Contemporary clinical immunology and serology*. New Jersey: Upper Saddle River, 2013. 439 p.
5. Duggal G, Warrior S, Ghimire S, et al. Alternative Routes to Induce Naïve Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 2015;33(9):2686–2698. DOI: 10.1002/stem.2071
6. González F, Huangfu D. Mechanisms underlying the formation of induced pluripotent stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2016;5(1):39–65. DOI: 10.1002/wdev.206
7. Nichols J, Smith A. The origin and identity of embryonic stem cells. *Development*. 2011;138(1):3–8. DOI: 10.1242/dev.050831
8. De Los Angeles A, Ferrari F, Xi R, et al. Hallmarks of pluripotency. *Nature*. 2015;525(7570):469–478. DOI: 10.1038/nature15515
9. Dunn SJ, Martello G, Yordanov B, et al. Defining an essential transcription factor program for naïve pluripotency. *Science*. 2014;344(6188):1156–1160. DOI: 10.1126/science.1248882
10. 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
11. 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
12. Abad M, Mosteiro L, Pantoja C, et al. Reprogramming *in vivo* produces teratomas and iPSCs with totipotency features. *Nature*. 2013;502:340–345. DOI: 10.1038/nature12586
13. Bulic-Jakus F, Katusic Bojanac A, Juric-Lekic G, et al. Teratoma: from spontaneous tumors to the pluripotency/malignancy assay. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2016;5(2):186–209. DOI: 10.1002/wdev.219
14. Silva M, Daheron L, Hurley H, et al. Generating iPSCs: translating cell reprogramming science into scalable and robust biomanufacturing strategies. *Cell Stem Cell*. 2015;16(1):13–17. DOI: 10.1016/j.stem.2014.12.013
15. Sohni A, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24(1):3–11. DOI: 10.1016/j.beha.2011.01.006
16. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev*. 2010;24(20):2239–2263. DOI: 10.1101/gad.1963910
17. Tamm C, Pijuan Galitó S, Annerén C. A comparative study of protocols for mouse embryonic stem cell culturing. *PLoS One*. 2013;8(12):e81156. DOI: 10.1371/journal.pone.0081156
18. Ma H, Morey R, O'Neil RC, et al. Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature*. 2014;511(7508):177–183. DOI: 10.1038/nature13551
19. Tachibana M, Amato P, Sparman M, et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*. 2013;153(6):1228–1238. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.006
20. 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
21. Abbas AK, Lichtman AN, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology. 9-th edition*. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 2018. 565 p.
22. 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
23. 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
24. 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
25. Kang H-W, 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
26. Yamaguchi T, Sato H, Kato-Itoh M, et al. Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. *Nature*. 2017;542(7640):191–196. DOI: 10.1038/nature21070
27. 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
28. 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
29. 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
30. Liu N, Zang R, Yang ST, Li Y. Stem cell engineering in bioreactors for large-scale bioprocessing. *Eng Life Sci*. 2014;14:4–15. DOI: 10.1002/elsc.201300013
31. 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
32. Slack JMW. *The science of stem cells*. John Wiley and Sons Inc., 2018. 248 p. DOI: 10.1002/9781119235293
33. 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
34. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget E.E. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 2007;25(10):2648–2659. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0226
35. 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
36. 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
37. 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; eLibrary SPIN: 8227-2647

**Борис Юрьевич Гумилевский**, доктор медицинских наук, профессор; SCOPUS: 6602391269; Researcher ID WoS: J-1841-2017; eLibrary SPIN: 3428-7704

**Василий Яковлевич Апчел**, доктор медицинских наук, профессор; ORCID: 0000-0001-7658-4856; SCOPUS: 6507529350; Researcher ID: E-8190-2019; Scholar ID: g9EKlssAAAAJ&hl; eLibrary SPIN: 4978-0785

**Василий Николаевич Цыган**, доктор медицинских наук, профессор; ORCID: 0000-0003-1199-0911; eLibrary SPIN: 7215-6206; SCOPUS: 6603136317

## AUTHORS INFO

**\*Alexander V. Moskalev**, doctor of medical sciences, professor; e-mail: alexmav195223@yandex.ru; ORCID: 0000-0002-3403-3850; eLibrary SPIN: 8227-2647

**Boris Yu. Gumilevsky**, doctor of medical sciences, professor; SCOPUS: 6602391269; Researcher ID WoS: J-1841-2017; eLibrary SPIN: 3428-7704

**Vasiliy Ya. Apchel**, doctor of medical sciences, professor; ORCID: 0000-0001-7658-4856; SCOPUS: 6507529350; Researcher ID: E-8190-2019; Scholar ID: g9EKlssAAAAJ&hl; eLibrary SPIN: 4978-0785

**Vasiliy N. Tsygan**, doctor of medical sciences, professor; ORCID: 0000-0003-1199-0911; eLibrary SPIN: 7215-6206; SCOPUS: 6603136317

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author