


Использование метода бластоцистной комплементации для получения донорских органов в химерных животных

Т.И. Бабочкина , Л.А. Герлинская, М.П. Мошкин


Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 e-mail: babochkinat@yahoo.com

Аннотация. Сегодня актуальной проблемой в медицине является нехватка органов для трансплантаций. Одна из предполагаемых технологий получения этих органов – выращивание их из клеток человека в организме химерных животных с использованием метода межвидовой бластоцистной комплементации в комбинации с методами геномного редактирования и получения плюрипотентных стволовых клеток. Метод CRISPR/Cas9 позволяет создавать животных для бластоцистной комплементации с так называемыми свободными нишами. Совершенствование методов получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток дает возможность получать донорские клетки человека, способные заселять свободную нишу. Таким образом, с помощью современных технологий можно осуществить межвидовую бластоцистную комплементацию между человеком и другими животными, что в будущем позволит выращивать органы человека внутри химерных животных. Однако на практике для проведения успешной межвидовой бластоцистной комплементации необходимо решить ряд проблем: усовершенствовать методы получения «химер-компетентных клеток», преодолеть специфические межвидовые барьеры, подобрать совместимые стадии развития клеток для инъекции и соответствующего этапа развития эмбриона-реципиента, предотвратить апоптоз донорских клеток, добиться эффективной колонизации донорскими клетками человека организма животного-реципиента. Кроме того, очень важно проанализировать и законодательно урегулировать этические аспекты, возникающие при разработке технологий, связанных с получением химерных организмов с участием клеток человека. Многочисленные исследования направлены на решение этих проблем, а также на поиски новых подходов в создании межвидовых химерных организмов с целью выращивания органов человека для трансплантаций. В настоящем обзоре описаны исторические этапы развития технологии бластоцистной комплементации, детально разобраны методы, лежащие в основе ее современного варианта, и проанализированы достижения, позволяющие приблизиться к возможности выращивания органов человека в химерных животных. Рассмотрены также барьеры и проблемы, мешающие успешному применению данного подхода на практике, и дальнейшие перспективы его развития.
Ключевые слова: химеризм; межвидовой химеризм; ЭС клетки; ИПСК; CRISPR/Cas9; органы для трансплантаций.

Для цитирования: Бабочкина Т.И., Герлинская Л.А., Мошкин М.П. Использование метода бластоцистной комплементации для получения донорских органов в химерных животных. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(8):913-921. DOI 10.18699/VJ20.690

Generation of donor organs in chimeric animals via blastocyst complementation

T.I. Babochkina , L.A. Gerlinskaya, M.P. Moshkin

Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
 e-mail: babochkinat@yahoo.com

Abstract. The lack of organs for transplantation is an important problem in medicine today. The growth of organs in chimeric animals may be the solution of this. The proposed technology is the interspecific blastocyst complementation method in combination with genomic editing for obtaining “free niches” and pluripotent stem cell production methods. The CRISPR/Cas9 method allows the so-called “free niches” to be obtained for blastocyst complementation. The technologies of producing induced pluripotent stem cells give us the opportunity to obtain human donor cells capable of populating a “free niche”. Taken together, those technologies allow interspecific blastocyst complementation between humans and other animals, which makes it possible in future to grow human organs for transplantations inside chimeric animals. However, in practice, in order to achieve successful interspecific blastocyst complementation, it is necessary to solve a number of problems: to improve methods for producing “chimeric competent” cells, to overcome specific interspecific barriers, to select compatible cell developmental stages for injection and the corresponding developmental stage of the host embryo, to prevent apoptosis of donor cells and to achieve effective proliferation of the human donor cells in the host animal. Also, it is very important

to analyze the ethical aspects related to developing technologies of production of chimeric organisms with the participation of human cells. Today, many researchers are trying to solve these problems and also to establish new approaches in the creation of interspecific chimeric organisms in order to grow human organs for transplantation. In the present review we described the historical stages of the development of the blastocyst complementation method, examined in detail the technologies that underlie modern blastocyst complementation, and analyzed current progress that gives us the possibility to grow human organs in chimeric animals. We also considered the barriers and issues preventing the successful implementation of interspecific blastocyst complementation in practice, and discussed the further development of this method.

Key words: chimerism; interspecies chimera; embryo SC; iPSC; CRISPR/Cas9; organ generation.

For citation: Babochkina T.I., Gerlinskaya L.A., Moshkin M.P. Generation of donor organs in chimeric animals via blastocyst complementation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020; 24(8):913-921. DOI 10.18699/VJ20.690

Химеризм: современные определения и классификации

Первые работы по получению химерных животных были проведены в 60-х гг. прошлого века (Tarkowski, 1961; Mintz, 1965; McLaren, Bowman, 1969). С тех пор накоплен значительный объем научных знаний по химеризму, сформулированы современные определения и предложены различные классификации химер.

Животные химеры – это организмы, которые состоят из генетически различных клеток, происходящих от двух и более разных зигот (Tirpett, 1983). Существуют разные виды химеризма, в зависимости от количества и типа донорских клеток и их распределения в химерных организмах. Химеризм может быть врожденным или искусственным (артифициальным). Встречаются две формы врожденного химеризма: тетрагаметизм и микрохимеризм. Тетрагаметизм возникает в результате оплодотворения двух отдельных яйцеклеток двумя сперматозоидами с последующим развитием единого организма со смешанными клеточными линиями (Drexler et al., 2005). Микрохимеризм – это явление, при котором в многоклеточном организме оказывается небольшое количество клеток другого представителя данного вида. Примеры врожденного микрохимеризма – химеризм близнецов (Chen K. et al., 2013) и фетоматеринский микрохимеризм (Nelson et al., 1998). Искусственный химеризм возникает, например, при трансплантации органов и тканей или в результате гемотрансфузий.

В зависимости от степени распределения донорских клеток в химерном организме химеризм бывает частичным и системным (Suchy, Nakauchi, 2017). Так, при трансплантации органов и тканей распределение донорских клеток ограничивается определенным органом или тканью, что проявляется частичным химеризмом. Системный химеризм может наблюдаться, например, при слиянии эмбрионов на ранней стадии развития. В результате такого слияния формируется эмбрион с распределенными по разным органам и тканям клеточными линиями, берущими свое начало от двух разных зигот.

Химеризм может быть первичным – возникает на ранних стадиях эмбриогенеза, и вторичным – возникает после начала гастрюляции (Mascetti, Pedersen, 2016a, b), внутривидовым и межвидовым. Внутривидовые химеры состоят из клеточных линий, берущих свое начало от разных зигот одного вида. Межвидовые химеры состоят из клеточных линий, берущих свое начало от двух и более зигот представителей разных видов.

Методы получения химер, лежащие в основе развития метода бластоцистной комплементации

В лабораторных условиях химер чаще всего получают методами агрегации клеток (Tarkowski, 1961) или при помощи микроинъекций в эмбрион (Gardner, 1968). Агрегационные методы технически более легкие, не требуют дорогостоящего микроманипуляционного оборудования и, в зависимости от выбора вида объекта, могут работать эффективнее, чем инъекционные методы (Tachibana et al., 2012). Однако в некоторых случаях при получении межвидовых химер трофоэктодерма с донорскими клетками может препятствовать имплантации, и тогда предпочтительны инъекционные методы (MacLaren et al., 1992), которые также позволяют строго контролировать количество введенных клеток.

В 2019 г. японские исследователи сравнили степень распределения клеток крысы в химерных крыса-мышь эмбрионах методом 8-клеточной агрегации, методом инъекции в 8-клеточный эмбрион и методом инъекции в бластоцисту (Okumura et al., 2019). Степень химеризма оказалась самой высокой при использовании метода инъекции в 8-клеточный эмбрион, хотя процент получения химерных мышей был выше при инъекции в бластоцисту.

Общераспространенным и наиболее перспективным методом для получения органов человека в организмах межвидовых химерных животных являются инъекции в бластоцисту – метод бластоцистной комплементации. Далее мы рассмотрим данный метод на примере грызунов и проследим развитие сопутствующих технологий: получение свободных ниш животных и получение «химер-компетентных» клеток человека. Эти методы позволили осуществить современную межвидовую бластоцистную комплементацию между человеком и другими животными.

Использование первоначального варианта метода бластоцистной комплементации для получения химер грызунов

Внутривидовые химеры. В 1993 г. впервые был успешно продемонстрирован метод внутривидовой бластоцистной комплементации. Суть метода заключалась в том, что эмбриональные стволовые (ЭС) клетки мыши были инъецированы в бластоцисту *Rag2^{-/-}* иммунодефицитной мыши с отсутствием Т и В лимфоцитов. В результате у химерных животных наблюдали Т и В лимфоциты донора (Chen J. et al., 1993). Важный результат этого исследова-

ния состоял в том, что донорские ЭС клетки оказались способны дифференцироваться в Т и В лимфоциты, используя вакантную лимфоидную Т и В клеточную нишу в иммунодефицитном организме. Благодаря этому стало возможным выращивание органов в организме химерных животных с так называемыми свободными нишами. В 2007 г. с помощью метода бластоцистной комплементации был выращен эпителий поджелудочной железы мыши в *Pdx1^{-/-}* дефицитных мышцах с нарушением развития поджелудочной железы (Stanger et al., 2007). В 2012 г. была продемонстрирована успешная внутривидовая бластоцистная комплементация ЭС клеток здоровой мыши в бластоцисту *Sall1^{-/-}* дефицитной мыши с нарушением развития почек (Usui et al., 2012).

Межвидовые химеры. В 2010 г. впервые методом бластоцистной комплементации были получены жизнеспособные межвидовые химеры с развитым эпителием поджелудочной железы крысы в организме *Pdx1^{-/-}* дефицитной мыши (Kobayashi et al., 2010). В своем исследовании ученые успешно инъецировали донорские плюрипотентные ЭС клетки крысы в мышинные *Pdx1^{-/-}* бластоцисты, которые были генетически модифицированы с целью получения нарушений развития поджелудочной железы. Спустя год метод межвидовой бластоцистной комплементации был использован для инъекций ЭС клеток крысы в бластоцисту *nude* мыши, с отсутствием тимуса, и получена химерная мышь с функционирующим тимусом крысиного происхождения (Isotani et al., 2011). Недавно появилось сообщение об успешной генерации почки мыши в химерном организме *Sall1^{-/-}* крысы (Goto et al., 2019).

В 2017 г. группа под руководством Накаучи продемонстрировала успешную трансплантацию тканей поджелудочной железы, выращенной из плюрипотентных стволовых клеток в организме *Pdx1^{-/-}* дефицитных крыс, мышам, больным сахарным диабетом (Yamaguchi et al., 2017). Эти результаты доказали возможность использования тканей, выращенных в организме межвидовых химер, для трансплантации органов.

Далее мы подробно обсудим технологии, лежащие в основе современной бластоцистной комплементации: получение животных с так называемыми свободными нишами и «химер-компетентных» клеток для инъекций в бластоцисту.

Получение животных со свободными нишами

Для создания химерных животных с донорскими органами методом бластоцистной комплементации большой интерес представляют животные с так называемыми свободными нишами в органогенезе, т.е. с отсутствием или частичным развитием определенных органов или особых клеточных линий. Животных со свободными нишами в органогенезе получают при выключении экспрессии генов, вовлеченных в органогенез. У таких животных определенные типы стволовых клеток теряют способность специализироваться, пролиферировать или дифференцироваться, т.е. они не могут участвовать в органогенезе и орган не развивается.

При инъекции донорских клеток с нормальным органогенезом в бластоцисту животных со свободными нишами

могут быть сформированы отсутствующие органы. Для выращивания донорских органов в химерных организмах необходимо, чтобы клетки донора имели преимущество при органогенезе определенной ткани или органа, так как эти клетки вносятся в малом количестве и изначально не имеют селективного преимущества. Свободные ниши позволяют донорским клеткам пролиферировать без конкуренции с хозяйскими клетками в химерном организме и формировать заданный орган. Свободная ниша может быть создана методом генетического нокаута (Offield et al., 1996; Ohinata et al., 2005) и методами направленного редактирования геномов: цинковопальцевые нуклеазы (ZFN), TALE-ассоциированные нуклеазы (transcription activator-like effector nucleases, TALEN) и CRISPR/Cas9 (clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated system (Cas)).

Возможность получения нокаутных мышей путем инъекции матричной РНК (мРНК) нуклеазы на основе ZFN метода в зиготы мыши была показана в 2010 г. (Carbery et al., 2010). В 2013 г. были получены нокаутные мыши с применением технологии TALEN при помощи инъекции мРНК TALEN в цитоплазму зигот (Sung et al., 2013). Метод CRISPR/Cas9 был впервые продемонстрирован в 2013 г. (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013). Сегодня это наиболее популярный и востребованный в геномной инженерии метод. В нем целенаправленное редактирование генома осуществляется за счет комплементарного взаимодействия между некодирующей синтетической РНК и ДНК целевых сайтов. При этом образуется комплекс из некодирующих РНК и белков Cas, которые обладают нуклеазной активностью. В 2014 г. была продемонстрирована возможность использования метода CRISPR/Cas9 для внесения модификации в клетки эмбриона свиньи на стадии бластоцисты *in vitro* и получены свиньи с заданной мутацией в генах (Whitworth et al., 2014). В 2018 г. впервые проведена успешная внутривидовая бластоцистная комплементация у мышей со свободными нишами в головном мозге, полученными в том числе при использовании CRISPR/Cas9 метода (Chang et al., 2018).

Виды «химер-компетентных» клеток для инъекций в бластоцисту

Для получения химерных животных используют ЭС клетки, а также индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК).

ЭС клетки. Для выращивания органов в химерных животных наиболее подходящими кандидатами являются плюрипотентные клетки, выделенные из внутренней клеточной массы (ВКМ) и эпибласта эмбриона, так как они способны дифференцироваться в ткани эмбриона. Оказалось, что плюрипотентные клетки ВКМ и эпибласта различаются по степени плюрипотентности у мыши. Было предложено называть «истинные» плюрипотентные клетки, полученные из ВКМ на «ранней» стадии плюрипотентности, naïve клетками, а эпибластные, полученные на более «поздней» стадии плюрипотентности, – primed клетками (Nichols, Smith, 2009; Hanna et al., 2010). Кроме того, плюрипотентные клетки, выделенные на одной стадии развития у разных видов, различаются по степени плюрипотентности. Например, ЭС клетки мыши, выделенные

из ВКМ, относятся к naïve статусу, а аналогичные клетки человека – к primed статусу плюрипотентности.

Для получения химерных животных интерес представляют плюрипотентные ЭС клетки в naïve статусе, выделенные из ВКМ бластоцисты до стадии имплантации, поскольку клетки в primed статусе не способны принимать участие в формировании химер при их инъекции в доимплантационную бластоцисту (Tesar et al., 2007).

ЭС клетки мыши впервые были получены в 1981 г. (Evans, Kaufman, 1981). Они проявляют типичные характеристики плюрипотентности: обладают способностью формировать клетки эктодермального, мезодермального и эндодермального происхождения (Martin, 1981), участвуют в формировании всех тканей взрослого организма при инъекции в бластоцисту (Bradley et al., 1984; Hayashi et al., 2017). И самое главное, ЭС клетки мыши участвуют в формировании химер после инъекции в бластоцисту (Nichols, Smith, 2009; Betschinger et al., 2013).

В 1995 г. впервые были получены ЭС клетки *Rhesus macaque* (Thomson et al., 1995), а в 1998 г. эти же исследователи получили линии ЭС клеток человека из предимплантационных человеческих эмбрионов. При проведении теста на плюрипотентность *in vivo* была продемонстрирована способность ЭС клеток человека к образованию тератом с тканями эндодермального, мезодермального и эктодермального происхождения (Thomson et al., 1998). При тестировании на плюрипотентность ЭС клеток человека *in vitro* была показана дифференцировка с образованием эмбрионных телес и дифференцировка в различные типы клеток (Wobus, Boheler, 2005). Провести тест на химеризм в организме человека или приматов и дать точную оценку плюрипотентности ЭС клеток человека и приматов невозможно вследствие этических ограничений. Оказалось, что ЭС клетки человека, хотя и похожи по ряду характеристик на ЭС клетки мыши (Wobus, Boheler, 2005; Huang et al., 2014), однако существенно от них отличаются (Friel et al., 2005; Watanabe et al., 2007). Предполагают, что ЭС клетки человека относятся к primed, а ЭС клетки мыши – к naïve статусу плюрипотентности.

Получение плюрипотентных ЭС клеток человека и приматов в naïve статусе. ЭС клетки человека в naïve статусе впервые были получены в 2010 г. методом эктопической индукции факторов Oct4, Klf4 и Klf2 в комбинации с LIF и ингибиторами GSK3 β и ERK1/2 (Hanna et al., 2010). Затем были подобраны среда и оптимальные условия культивирования (Gafni et al., 2013). Также были предприняты попытки получения плюрипотентных клеток в naïve статусе у приматов (Fang et al., 2014; Chen Y. et al., 2015; De Los Angeles et al., 2019). Сегодня многочисленные исследования направлены на то, чтобы получить плюрипотентные ЭС клетки в naïve статусе и сохранить этот статус в условиях культивирования (Liu et al., 2017; Kilens et al., 2018). По этическим причинам невозможно проверить naïve статус этих клеток человека, однако можно определить предполагаемые критерии, по которым эти клетки считались бы плюрипотентными в naïve статусе. К настоящему времени описаны так называемые naïve факторы плюрипотентности. Один из этих факторов – KLF4, специфичный для мышечных naïve плюрипотентных стволовых клеток и для предимплан-

тационных эмбрионов человека (Guo et al., 2009; Dunn et al., 2014; Boroviak et al., 2016). Кроме того, для клеток в naïve статусе характерна ядерная локализация TFE3 и высокий уровень митохондриального дыхания (Zhou et al., 2012; Betschinger et al., 2013). Другие исследователи продемонстрировали, что уровень транскрипции транскрипционных факторов соответствует статусу плюрипотентности; помимо того, индукция naïve статуса клетки сопровождается ДНК гипометилированием (Theunissen et al., 2016; Wang, Li, 2017).

Получение naïve статуса в соматических клетках. ИПСК. Одновременно с изучением naïve статуса плюрипотентных ЭС клеток активно развивались технологии получения ИПСК из соматических клеток. ИПСК – это новый тип плюрипотентных клеток, которые можно получать путем перепрограммирования дифференцированных соматических клеток. Впервые ИПСК из соматических клеток были выделены в 2006 г. путем экзогенной экспрессии транскрипционных факторов (Takahashi, Yamanaka, 2006). Суть метода заключается в трансфекции взрослой клетки четырьмя генами (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*), которые кодируют факторы транскрипции, связанные с плюрипотентным состоянием эмбриональных клеток. Исследователи смогли получить линии ИПСК человека, отвечающие всем критериям ЭС клеток, из фибробластов кожи человека (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007) и из кератицитов кожи человека (Aasen et al., 2008). Так как эктопическая экспрессия генов *c-Myc* и *Klf4* является нежелательной из-за высокой вероятности образования злокачественных опухолей, в 2007 г. эти гены были успешно замещены на менее опасные гены *Nanog* и *Lin28* (Okita et al., 2007; Yu et al., 2007).

ИПСК очень похожи на ЭС клетки: сходная морфология и способы роста, одинаковые условия культивирования (ростовые факторы и сигнальные молекулы). ИПСК сохраняют нормальный кариотип при культивировании, имеют высокую теломеразную активность и дифференцируются *in vitro* в клетки тканей всех трех зародышевых листков (Yu et al., 2007).

Возможности и ограничения использования naïve ЭС клеток и ИПСК. Уникальные свойства ЭС клеток и ИПСК позволяют получать «химер-компетентные» клетки для бластоцистной комплементации. При инъекции в бластоцисту ЭС клетки и ИПСК включаются в развитие, приводя к формированию животных с высокой степенью химеризации. Свойства ЭС клеток и ИПСК человека делают их исключительным источником для получения тканей и органов в трансплантологии и создают перспективы для разработки новых подходов к терапии неизлечимых заболеваний. Технология получения ИПСК также демонстрирует возможности для получения аутологичных стволовых клеток, что позволит в будущем решить проблему иммунологической совместимости при трансплантации пациенту органов, выращенных в химерных животных. Кроме того, данная технология позволяет создавать плюрипотентные стволовые клетки из соматических клеток различных типов, избегая при этом этических проблем, связанных с использованием живых эмбрионов.

Однако существует ряд ограничений. Линии ЭС клеток и ИПСК существенно варьируют по потенциалу плюри-

потентности и по профилю экспрессии генов (Yu et al., 2007). В популяции полученных ЭС клеток и ИПСК остаются недифференцированные клетки, которые могут дать опухоль или же реактивацию вирусов. Также остается проблемой получение большого количества «химер-компетентных» клеток высокого качества, пригодных для клинического применения. Кроме того, в культивируемых ЭС клетках были обнаружены наследуемые эпигенетические нарушения, которые могут быть связаны с развитием наследственных заболеваний и канцерогенезом (Allegrucci et al., 2007). Следовательно, существует потребность в максимальной стандартизации методов получения, культивирования и оценки статуса плюрипотентности ИПСК и ЭС клеток.

Использование современного метода бластоцистной комплементации

Межвидовые химеры человека и грызунов. Получение «химер-компетентных» клеток человека, животных со свободными нишами в органогенезе и межвидовых химер животных методом бластоцистной комплементации позволило предпринять попытки для создания химерных организмов между человеком и другими животными. Впервые в 2006 г. ЭС клетки человека на ранних этапах эмбриогенеза были инъецированы в бластоцисту мыши; у полученных химер наблюдались аномалии развития (James et al., 2006). В 2013 г. при инъекции человеческих ИПСК были получены химерные мыши, однако по этическим соображениям мышинные эмбрионы были умерщвлены на ранних стадиях развития (Gafni et al., 2013). Затем в 2014 г. были созданы химерные животные при микроинъекции naïve ИПСК, полученных из фибробластов *Rhesus macaque*, в эмбрион мыши на стадии бластоцисты (Fang et al., 2014).

Однако в этих межвидовых химерах степень выявленного химеризма была невысокой, особенно в сравнении со степенью химеризма у внутривидовых химер среди грызунов. Предполагается, что это обусловлено эволюционным расстоянием между человеком и другими животными. Интересно, что попытки получить межвидовую химеру человека оказались успешными, когда инъекцию ИПСК человека в эмбрион мыши проводили на более поздней стадии эмбрионального развития – гастрюлы (Mascetti, Pedersen, 2016b). Таким образом, способность к формированию химер зависит от согласования стадий развития *in vitro* донорских клеток со стадией развития эмбриона *in vivo*.

Межвидовые химеры человека и крупных домашних животных. В 2017 г. были получены химерные эмбрионы между человеком и свиньей, а также между человеком и коровой (Wu et al., 2017). В данном исследовании ученые применили метод генетического редактирования CRISPR/Cas9 для создания так называемой свободной ниши в комбинации с методом бластоцистной комплементации. Согласно этим результатам, naïve плюрипотентные стволовые клетки человека пролиферируют в преимплантационных бластоцистах свиной и коровы, а в постимплантационных бластоцистах свиной их способность пролиферировать ограничена. Интересно, что при использовании так называемых промежуточных плюри-

потентных стволовых клеток человека степень химеризма и способность пролиферировать в различные клеточные типы в постимплантационных эмбрионах свиной была выше (Tsukiyama, Ohinata, 2014; Wu et al., 2017). Недавно появилось сообщение о создании химерного эмбриона между *Macaca fascicularis* и свиньей, в тканях которого были детектированы функционирующие донорские ЭС клетки примата (Fu et al., 2020).

Искусственный эмбрион

Создание искусственного эмбриона является интересной альтернативой использованию эмбрионов животных и человека в исследовательских целях. Ученые продемонстрировали получение эмбрионоподобных образований на культуре стволовых клеток (Pera et al., 2015; Harrison et al., 2017). В 2017 г. была показана возможность создания искусственных эмбрионов путем агрегации трофобластных стволовых клеток и тотипотентных ЭС клеток, которые самостоятельно собираются в бластоцисту на подложке из трехмерного внеклеточного матрикса. При этом развитие эмбриона, его морфогенез, строение и клеточный состав следуют тем же схемам развития, что и у нормального эмбриона (Harrison et al., 2017).

Затем в 2018 г. была создана полноценная модель бластоцисты, которую назвали бластоидом (Rivron et al., 2018). Вскоре из фибробластов были получены три основных типа стволовых клеток: эпибластные клетки, клетки примитивной энтодермы и клетки трофоэктодермы. Для получения определенного типа плюрипотентных клеток была подобрана комбинация пяти транскрипционных факторов: Gata3, Eomes, Tfap2c, Muc и Esrrb. Это достижение может привести к созданию *in vitro* полноценных искусственных эмбрионов без использования яйцеклетки и сперматозоида (Benchetrit et al., 2019). Успехи в создании искусственного эмбриона говорят о возможности в будущем использовать его для получения химерных организмов.

Основные проблемы, препятствующие развитию технологий выращивания органов в химерных животных, и возможные пути их решения

Выращивание органов крысы в организме мыши и получение химер человек-свинья, человек-корова предполагают в будущем возможность создания ксеногенных организмов среди различных видов животных и выращивания человеческих органов. Рассматриваемые животные для выращивания органов для трансплантации – это свиньи, коровы, овцы и приматы.

Развитию технологии выращивания человеческих органов в ксеногенных животных, таких как свиньи, препятствует ряд факторов. Существует риск зооноза и риск заражения человеческих органов клетками или белками животного-реципиента (Rashid et al., 2014; Matsunari et al., 2020). Проблема заключается в том, что ретровирусы, интегрированные в геном химерных животных при выращивании человеческих органов, могут быть переданы человеку. Последствия встраивания ретровирусов животных в геном человека невозможно предсказать. И есть опасения, что человеческие органы, полученные из химерных животных, могут оказаться источником опасности.

Кроме того, существует ряд биологических плохо идентифицированных и плохо понимаемых факторов, связанных с различиями в скорости эмбрионального развития у разных видов (Barry et al., 2017). Понимание механизмов этих различий, возможность модулировать время и стадию развития клеток донора *in vitro* и влиять на стадию развития *in vivo* позволили бы синхронизировать клетки донора и хозяина в химерной модели. Помимо этого, последние исследования показали, что синхронизация стадий развития между донорскими культивируемыми плюрипотентными ЭС клетками и реципиентом является значимым критерием для успешного формирования химеры. Например, naïve ЭС клетки мыши участвуют в формировании химеры только при инъекции на стадии бластоцисты, а primed ЭС клетки мыши, выделенные из эпибласта, – при инъекции на стадии гастрюлы (Huang et al., 2012).

Интересно также, что попытки получить межвидовую химеру человека оказались успешными, когда инъекцию проводили на более поздней стадии эмбрионального развития. В 2016 г. была продемонстрирована успешная микроинъекция ИПСК человека в эмбрион мыши на стадии гастрюлы, что подтверждает гипотезу, что способность к формированию химер зависит от согласования стадий развития *in vitro* донорских клеток со стадией развития эмбриона *in vivo* (Mascetti, Pedersen, 2016b).

Одна из проблем получения межвидовых химер человека – это низкое процентное содержание донорских клеток в химерном организме. Предполагается, что отрицательные результаты и низкая степень химеризма в экспериментах по получению химер связаны с апоптозом клеток. В 2016 г. было показано, что экспрессия антиапоптозного гена *Bcl2* в «химер-некомпетентных» эпибластных стволовых клетках крысы позволяет этим клеткам превратиться в «химер-компетентные» клетки и участвовать в формировании всех тканей в химерном эмбрионе крысы-мыши при инъекции в бластоцисту мыши (Masaki et al., 2016).

Совсем недавно удалось создать химерные зародыши человека и мыши, в которых доля человеческих клеток впервые составила 4 %. В данном исследовании в бластоцисты мыши микроинъектировали naïve hPSC, полученные при ингибировании протеинкиназы mTOR (Hu et al., 2020).

Другая важная проблема, которую предстоит решить для осуществления успешного выращивания донорских органов человека в химерных организмах, – это проблема васкуляризации органа. Предыдущие исследования продемонстрировали, что сосуды в химерных организмах сформированы из клеток донора и хозяина-реципиента (Kobayashi et al., 2010; Usui et al., 2012; Yamaguchi et al., 2017). Для успешной трансплантации органов человека, выращенных в животных, необходимо, чтобы кровеносная система органа была сформирована, как и орган, из клеток человека с целью минимизации ксеногенного компонента при трансплантации. Над этим работают многие исследователи (Hamanaka et al., 2018; Matsunari et al., 2020). Для решения перечисленных проблем предстоит также определить и исследовать факторы, влияющие на успешность заселения плюрипотентных клеток донора

в организм животного реципиента, и механизмы, лежащие в основе дифференцировки этих клеток в условиях свободной ниши.

Помимо биологических, существуют еще этические барьеры. Например, одна из проблем, которая может возникнуть с межвидовыми химерами человек-животное, – это возможность продуцирования химерными животными гамет с человеческим геномом (Bourret et al., 2016; Farahany et al., 2018). Опасения вызывает также вероятность очеловечивания химерных животных при случайной дифференцировке клеток человека в тканях мозга реципиента (Shaw et al., 2015). В 2019 г. было продемонстрировано, что данные проблемы возможно решить путем отключения ответственных за формирование гамет и мозга генов *Prdm14* и *Otx2* в микроинъектируемых «химер-компетентных» клетках (Hashimoto et al., 2019).

Заключение

Таким образом, для того чтобы осуществить успешную бластоцистную комплементацию и получить межвидовую химеру между человеком и другим животным с целью выращивания органов для трансплантации, необходимо совершенствовать две ключевые технологии: 1) подобрать эффективный метод для генного редактирования генома животного-реципиента с целью получения так называемых свободных ниш; 2) получить этичным способом плюрипотентные «химер-компетентные» клетки человека, способные дифференцироваться в заданный орган или ткань в организме животного. Кроме того, необходимо понять и преодолеть биологические барьеры, обусловленные отсутствием или низким уровнем химеризма плюрипотентных «химер-компетентных» ЭС клеток в организме животного. Также важно на законодательном уровне урегулировать возникающие этические моменты. Несмотря на все трудности и сложности, технология выращивания донорских органов в химерных организмах является весьма перспективной и многообещающей.

Список литературы / References

- Aasen T., Raya A., Barrero M.J., Garreta E., Consiglio A., Gonzalez F., Vassena R., Bilić J., Pekarik V., Tiscornia G., Edel M., Boué S., Izpisua Belmonte J.C. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* 2008;26(11):1276-1284. DOI 10.1038/nbt.1503.
- Allegrucci C., Wu Y.Z., Thurston A., Denning C.N., Priddle H., Mumery C.L., Ward-van Oostwaard D., Andrews P.W., Stojkovic M., Smith N., Parkin T., Jones M.E., Warren G., Yu L., Brena R.M., Plass C., Young L.E. Restriction landmark genome scanning identifies culture-induced DNA methylation instability in the human embryonic stem cell epigenome. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16(10):1253-1268. DOI 10.1093/hmg/ddm074.
- Barry C., Schmitz M.T., Jiang P., Schwartz M.P., Duffin B.M., Swanson S., Bacher R., Bolin J.M., Elwell A.L., McIntosh B.E., Stewart R., Thomson J.A. Species-specific developmental timing is maintained by pluripotent stem cells *ex utero*. *Dev. Biol.* 2017;423(2):101-110. DOI 10.1016/j.ydbio.2017.02.002.
- Benchetrit H., Jaber M., Zayat V., Sebban S., Pushett A., Makedonski K., Zakheim Z., Radwan A., Maoz N., Lasry R., Renous N., Inbar M., Ram O., Kaplan T., Buganim Y. Direct induction of the three pre-implantation blastocyst cell types from fibroblasts. *Cell Stem Cell.* 2019;24(6):983-994.e7. DOI 10.1016/j.stem.2019.03.018.
- Betschinger J., Nichols J., Dietmann S., Corrin P.D., Paddison P.J., Smith A. Exit from pluripotency is gated by intracellular redistribu-

- tion of the bHLH transcription factor Tfe3. *Cell*. 2013;153(2):335-347. DOI 10.1016/j.cell.2013.03.012.
- Boroviak K., Doe B., Banerjee R., Yang F., Bradley A. Chromosome engineering in zygotes with CRISPR/Cas9. *Genesis*. 2016;54(2):78-85. DOI 10.1002/dvg.22915.
- Bourret R., Martinez E., Vialla F., Giquel C., Thonnat-Marin A., De Vos J. Human-animal chimeras: ethical issues about farming chimeric animals bearing human organs. *Stem Cell Res. Ther.* 2016;7(1):87. DOI 10.1186/s13287-016-0345-9.
- Bradley A., Evans M., Kaufman M.H., Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*. 1984;309(5965):255-256. DOI 10.1038/309255a0.
- Carbery I.D., Ji D., Harrington A., Brown V., Weinstein E.J., Liaw L., Cui X. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2010;186(2):451-459. DOI 10.1534/genetics.110.117002.
- Chang A.N., Liang Z., Dai H.Q., Chapdelaine-Williams A.M., Andrews N., Bronson R.T., Schwer B., Alt F.W. Neural blastocyst complementation enables mouse forebrain organogenesis. *Nature*. 2018;563(7729):126-130. DOI 10.1038/s41586-018-0586-0.
- Chen J., Lansford R., Stewart V., Young F., Alt F.W. RAG-2-deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993;90(10):4528-4532. DOI 10.1073/pnas.90.10.4528.
- Chen K., Chmait R.H., Vanderbilt D., Wu S., Randolph L. Chimerism in monozygotic dizygotic twins: case study and review. *Am. J. Med. Genet. A*. 2013;161A(7):1817-1824. DOI 10.1002/ajmg.a.35957.
- Chen Y., Niu Y., Li Y., Ai Z., Kang Y., Shi H., Xiang Z., Yang Z., Tan T., Si W., Li W., Xia X., Zhou Q., Ji W., Li T. Generation of cynomolgus monkey chimeric fetuses using embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2015;17(1):116-124. DOI 10.1016/j.stem.2015.06.004.
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-823. DOI 10.1126/science.1231143.
- De Los Angeles A., Elsworth J.D., Redmond D.E. ERK-independent African Green monkey pluripotent stem cells in a putative chimera-competent state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019;510(1):78-84. DOI 10.1016/j.bbrc.2019.01.037.
- Drexler C., Glock B., Vadon M., Staudacher E., Dauber E.M., Ulrich S., Reischer B.K., Mayr W.R., Lanzer G., Wagner T. Tetragametic chimerism detected in a healthy woman with mixed-field agglutination reactions in ABO blood grouping. *Transfusion*. 2005;45(5):698-703. DOI 10.1111/j.1537-2995.2005.04304.x.
- Dunn S.J., Martello G., Yordanov B., Emmott S., Smith A.G. Defining an essential transcription factor program for naïve pluripotency. *Science*. 2014;344(6188):1156-1160. DOI 10.1126/science.1248882.
- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-156. DOI 10.1038/292154a.
- Fang R., Liu K., Zhao Y., Li H., Zhu D., Du Y., Xiang C., Li X., Liu H., Miao Z., Zhang X., Shi Y., Yang W., Xu J., Deng H. Generation of naïve induced pluripotent stem cells from rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2014;15(4):488-497. DOI 10.1016/j.stem.2014.09.004.
- Farahany N.A., Greely H.T., Hyman S., Koch C., Grady C., Paşca S.P., Sestan N., Arlotta P., Bernat J.L., Ting J., Lunshof J.E., Iyer E., Hyun I., Capestany B.H., Church G.M., Huang H., Song H. The ethics of experimenting with human brain tissue. *Nature*. 2018;556(7702):429-432. DOI 10.1038/d41586-018-04813-x.
- Friel R., van der Sar S., Mee P.J. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2005;57(13):1894-1903. DOI 10.1016/j.addr.2005.08.002.
- Fu R., Yu D., Ren J., Li C., Wang J., Feng G., Wang X., Wan H., Li T., Wang L., Zhang Y., Hai T., Li W., Zhou Q. Domesticated cynomolgus monkey embryonic stem cells allow the generation of neonatal interspecies chimeric pigs. *Protein Cell*. 2020;11(2):97-107. DOI 10.1007/s13238-019-00676-8.
- Gafni O., Weinberger L., Mansour A.A., Manor Y.S., Chomsky E., Ben-Yosef D., Kalma Y., Viukov S., Maza I., Zviran A., Rais Y., Shpony Z., Mukamel Z., Krupalnik V., Zerbib M., Geula S., Caspi I., Schneir D., Shwartz T., Gilad S., Amann-Zalcenstein D., Benjamin S., Amit I., Tanay A., Massarwa R., Novershtern N., Hanna J.H. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*. 2013;504(7479):282-286. DOI 10.1038/nature12745.
- Gardner R.L. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature*. 1968;220(5167):596-597. DOI 10.1038/220596a0.
- Goto T., Hara H., Sanbo M., Masaki H., Sato H., Yamaguchi T., Hoshi S., Kobayashi T., Nakauchi H., Hirabayashi M. Generation of pluripotent stem cell-derived mouse kidneys in *Sall1*-targeted anephric rats. *Nat. Commun.* 2019;10(1):451. DOI 10.1038/s41467-019-08394-9.
- Guo G., Yang J., Nichols J., Hall J.S., Eyres I., Mansfield W., Smith A. *Klf4* reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development*. 2009;136(7):1063-1069. DOI 10.1242/dev.030957.
- Hamanaka S., Umino A., Sato H., Hayama T., Yanagida A., Mizuno N., Kobayashi T., Kasai M., Suchy F.P., Yamazaki S., Masaki H., Yamaguchi T., Nakauchi H. Generation of vascular endothelial cells and hematopoietic cells by blastocyst complementation. *Stem Cell Reports*. 2018;11(4):988-997. DOI 10.1016/j.stemcr.2018.08.015.
- Hanna J., Cheng A.W., Saha K., Kim J., Lengner C.J., Soldner F., Casady J.P., Muffat J., Carey B.W., Jaenisch R. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107(20):9222-9227. DOI 10.1073/pnas.1004584107.
- Harrison S.E., Sozen B., Christodoulou N., Kyprianou C., Zernicka-Goetz M. Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis *in vitro*. *Science*. 2017;356(6334). DOI 10.1126/science.aal1810.
- Hashimoto H., Eto T., Yamamoto M., Yagoto M., Goto M., Kagawa T., Kojima K., Kawai K., Akimoto T., Takahashi R.I. Development of blastocyst complementation technology without contributions to gametes and the brain. *Exp. Anim.* 2019;68(3):361-370. DOI 10.1538/expanim.18-0173.
- Hayashi K., Hikabe O., Obata Y., Hirao Y. Reconstitution of mouse oogenesis in a dish from pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 2017;12(9):1733-1744. DOI 10.1038/nprot.2017.070.
- Hu Z., Li H., Jiang H., Ren Y., Yu X., Qiu J., Stablewski A.B., Zhang B., Buck M.J., Feng J. Transient inhibition of mTOR in human pluripotent stem cells enables robust formation of mouse-human chimeric embryos. *Sci. Adv.* 2020;6(20):eaz0298. DOI 10.1126/sciadv.aaz0298.
- Huang Y., Liang P., Liu D., Huang J., Songyang Z. Telomere regulation in pluripotent stem cells. *Protein Cell*. 2014;5(3):194-202. DOI 10.1007/s13238-014-0028-1.
- Huang Y., Osorno R., Tsakiridis A., Wilson V. *In vivo* differentiation potential of epiblast stem cells revealed by chimeric embryo formation. *Cell Rep.* 2012;2(6):1571-1578. DOI 10.1016/j.celrep.2012.10.022.
- Isotani A., Hatayama H., Kaseda K., Ikawa M., Okabe M. Formation of a thymus from rat ES cells in xenogeneic nude mouse-rat ES chimeras. *Genes Cells*. 2011;16(4):397-405. DOI 10.1111/j.1365-2443.2011.01495.x.
- James D., Noggle S.A., Swigut T., Brivanlou A.H. Contribution of human embryonic stem cells to mouse blastocysts. *Dev. Biol.* 2006;295(1):90-102. DOI 10.1016/j.ydbio.2006.03.026.
- Kilens S., Meistermann D., Moreno D., Chariou C., Gaignerie A., Reignier A., Lelièvre Y., Casanova M., Vallot C., Nedellec S., Flippe L., Firmin J., Song J., Charpentier E., Lammers J., Donnat A., Marec N., Deb W., Bihouée A., Le Caignec C., Pecqueur C., Redon R., Barrière P., Bourdon J., Pasque V., Soumillon M., Mikelsen T.S., Rougeulle C., Fréour T., David L., Milieu Intérieur Consortium. Parallel derivation of isogenic human primed and naive induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 2018;9(1):360. DOI 10.1038/s41467-017-02107-w.

- Kobayashi T., Yamaguchi T., Hamanaka S., Kato-Itoh M., Yamazaki Y., Iyata M., Sato H., Lee Y.S., Usui J., Knisely A.S., Hirabayashi M., Nakauchi H. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell*. 2010;142(5):787-799. DOI 10.1016/j.cell.2010.07.039.
- Liu X., Nefzger C.M., Rossello F.J., Chen J., Knaupp A.S., Firas J., Ford E., Pflueger J., Paynter J.M., Chy H.S., O'Brien C.M., Huang C., Mishra K., Hodgson-Garms M., Jansz N., Williams S.M., Blewitt M.E., Nilsson S.K., Schittenhelm R.B., Laslett A.L., Lister R., Polo J.M. Comprehensive characterization of distinct states of human naive pluripotency generated by reprogramming. *Nat. Methods*. 2017;14(11):1055-1062. DOI 10.1038/nmeth.4436.
- MacLaren L.A., Anderson G.B., BonDurant R.H., Edmondson A.J. Inter- and intraspecific placentae in sheep, goats and sheep-goat chimaeras. *J. Comp. Pathol.* 1992;106(3):279-297. DOI 10.1016/0021-9975(92)90056-z.
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339(6121):823-826. DOI 10.1126/science.1232033.
- Martin G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981;78(12):7634-7638. DOI 10.1073/pnas.78.12.7634.
- Masaki H., Kato-Itoh M., Takahashi Y., Umino A., Sato H., Ito K., Yanagida A., Nishimura T., Yamaguchi T., Hirabayashi M., Era T., Loh K.M., Wu S.M., Weissman I.L., Nakauchi H. Inhibition of apoptosis overcomes stage-related compatibility barriers to chimera formation in mouse embryos. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5):587-592. DOI 10.1016/j.stem.2016.10.013.
- Mascetti V.L., Pedersen R.A. Contributions of mammalian chimeras to pluripotent stem cell research. *Cell Stem Cell*. 2016a;19(2):163-175. DOI 10.1016/j.stem.2016.07.018.
- Mascetti V.L., Pedersen R.A. Human-mouse chimerism validates human stem cell pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2016b;18(1):67-72. DOI 10.1016/j.stem.2015.11.017.
- Matsunari H., Watanabe M., Hasegawa K., Uchikura A., Nakano K., Umeyama K., Masaki H., Hamanaka S., Yamaguchi T., Nagaya M., Nishinakamura R., Nakauchi H., Nagashima H. Compensation of disabled organogenesis in genetically modified pig fetuses by blastocyst complementation. *Stem Cell Reports*. 2020;14(1):21-33. DOI 10.1016/j.stemcr.2019.11.008.
- McLaren A., Bowman P. Mouse chimaeras derived from fusion of embryos differing by nine genetic factors. *Nature*. 1969;224(5216):238-240. DOI 10.1038/224238a0.
- Mintz B. Genetic mosaicism in adult mice of quadruparental lineage. *Science*. 1965;148(3674):1232-1233. DOI 10.1126/science.148.3674.1232.
- Nelson J.L., Furst D.E., Maloney S., Gooley T., Evans P.C., Smith A., Bean M.A., Ober C., Bianchi D.W. Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet*. 1998;351(9102):559-562. DOI 10.1016/S0140-6736(97)08357-8.
- Nichols J., Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*. 2009;4(6):487-492. DOI 10.1016/j.stem.2009.05.015.
- Offield M.F., Jetton T.L., Labosky P.A., Ray M., Stein R.W., Magnuson M.A., Hogan B.L., Wright C.V. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*. 1996;122(3):983-995.
- Ohinata Y., Payer B., O'Carroll D., Ancelin K., Ono Y., Sano M., Barton S.C., Obukhanych T., Nussenzweig M., Tarakhovskiy A., Saitou M., Surani M.A. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*. 2005;436(7048):207-213. DOI 10.1038/nature03813.
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007;448(7151):313-317. DOI 10.1038/nature05934.
- Okumura H., Nakanishi A., Toyama S., Yamanoue M., Yamada K., Ukai A., Hashita T., Iwao T., Miyamoto T., Tagawa Y.I., Hirabayashi M., Miyoshi I., Matsunaga T. Contribution of rat embryonic stem cells to xenogeneic chimeras in blastocyst or 8-cell embryo injection and aggregation. *Xenotransplantation*. 2019;26(1):e12468. DOI 10.1111/xen.12468.
- Pera M.F., de Wert G., Dondorp W., Lovell-Badge R., Mummery C.L., Munsie M., Tam P.P. What if stem cells turn into embryos in a dish? *Nat. Methods*. 2015;12(10):917-919. DOI 10.1038/nmeth.3586.
- Rashid T., Kobayashi T., Nakauchi H. Revisiting the flight of Icarus: making human organs from PSCs with large animal chimeras. *Cell Stem Cell*. 2014;15(4):406-409. DOI 10.1016/j.stem.2014.09.013.
- Rivron N.C., Frias-Aldeguer J., Vrij E.J., Boisset J.C., Korving J., Vivie J., Truckenmüller R.K., van Oudenaarden A., van Blitterswijk C.A., Geijsen N. Blastocyst-like structures generated solely from stem cells. *Nature*. 2018;557(7703):106-111. DOI 10.1038/s41586-018-0051-0.
- Shaw D., Dondorp W., Geijsen N., de Wert G. Creating human organs in chimera pigs: an ethical source of immunocompatible organs? *J. Med. Ethics*. 2015;41(12):970-974. DOI 10.1136/medethics-2014-102224.
- Stanger B.Z., Tanaka A.J., Melton D.A. Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. *Nature*. 2007;445(7130):886-891. DOI 10.1038/nature05537.
- Suchy F., Nakauchi H. Lessons from interspecies mammalian chimeras. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2017;33:203-217. DOI 10.1146/annurev-cellbio-100616-060654.
- Sung Y.H., Baek I.J., Kim D.H., Jeon J., Lee J., Lee K., Jeong D., Kim J.S., Lee H.W. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(1):23-24. DOI 10.1038/nbt.2477.
- Tachibana M., Sparman M., Ramsey C., Ma H., Lee H.S., Penedo M.C., Mitalipov S. Generation of chimeric rhesus monkeys. *Cell*. 2012;148(1-2):285-295. DOI 10.1016/j.cell.2011.12.007.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872. DOI 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676. DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Tarkowski A.K. Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature*. 1961;190:857-860. DOI 10.1038/190857a0.
- Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A., Davies T.J., Evans E.P., Mack D.L., Gardner R.L., McKay R.D. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*. 2007;448(7150):196-199. DOI 10.1038/nature05972.
- Theunissen T.W., Friedli M., He Y., Planet E., O'Neil R.C., Markoulaki S., Pontis J., Wang H., Iouranova A., Imbeault M., Duc J., Cohen M.A., Wert K.J., Castanon R., Zhang Z., Huang Y., Nery J.R., Drotar J., Lungjangwa T., Trono D., Ecker J.R., Jaenisch R. Molecular criteria for defining the naive human pluripotent state. *Cell Stem Cell*. 2016;19(4):502-515. DOI 10.1016/j.stem.2016.06.011.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-1147. DOI 10.1126/science.282.5391.1145.
- Thomson J.A., Kalishman J., Golos T.G., Durning M., Harris C.P., Becker R.A., Hearn J.P. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995;92(17):7844-7848. DOI 10.1073/pnas.92.17.7844.
- Tippett P. Blood group chimeras. A review. *Vox Sang*. 1983;44(6):333-359. DOI 10.1111/j.1423-0410.1983.tb03657.x.
- Tsukiyama T., Ohinata Y. A modified EpiSC culture condition containing a GSK3 inhibitor can support germline-competent pluripotency in mice. *PLoS One*. 2014;9(4):e95329. DOI 10.1371/journal.pone.0095329.
- Usui J., Kobayashi T., Yamaguchi T., Knisely A.S., Nishinakamura R., Nakauchi H. Generation of kidney from pluripotent stem cells via

- blastocyst complementation. *Am. J. Pathol.* 2012;180(6):2417-2426. DOI 10.1016/j.ajpath.2012.03.007.
- Wang R., Li T. DNA methylation is correlated with pluripotency of stem cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2017;12(6):442-446. DOI 10.2174/1574888X11666161226145432.
- Watanabe K., Ueno M., Kamiya D., Nishiyama A., Matsumura M., Wataya T., Takahashi J.B., Nishikawa S., Nishikawa S., Muguruma K., Sasai Y. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2007;25(6):681-686. DOI 10.1038/nbt1310.
- Whitworth K.M., Lee K., Benne J.A., Beaton B.P., Spate L.D., Murphy S.L., Samuel M.S., Mao J., O’Gorman C., Walters E.M., Murphy C.N., Driver J., Mileham A., McLaren D., Wells K.D., Prather R.S. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. *Biol. Reprod.* 2014;91(3):78. DOI 10.1095/biolreprod.114.121723.
- Wobus A.M., Boheler K.R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol. Rev.* 2005;85(2):635-678. DOI 10.1152/physrev.00054.2003.
- Wu J., Platero-Luengo A., Sakurai M., Sugawara A., Gil M.A., Yamachi T., Suzuki K., Bogliotti Y.S., Cuello C., Morales Valencia M., Okumura D., Luo J., Vilariño M., Parrilla I., Soto D.A., Martinez C.A., Hishida T., Sánchez-Bautista S., Martínez-Martínez M.L., Wang H., Nohalez A., Aizawa E., Martínez-Redondo P., Ocampo A., Reddy P., Roca J., Maga E.A., Esteban C.R., Berggren W.T., Nuñez Delicado E., Lajara J., Guillen I., Guillen P., Campistol J.M., Martínez E.A., Ross P.J., Izpisua Belmonte J.C. Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells. *Cell.* 2017;168(3):473-486. e415. DOI 10.1016/j.cell.2016.12.036.
- Yamaguchi T., Sato H., Kato-Itoh M., Goto T., Hara H., Sanbo M., Mizuno N., Kobayashi T., Yanagida A., Umino A., Ota Y., Hamanaka S., Masaki H., Rashid S.T., Hirabayashi M., Nakauchi H. Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. *Nature.* 2017;542(7640):191-196. DOI 10.1038/nature21070.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Franke J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007;318(5858):1917-1920. DOI 10.1126/science.1151526.
- Zhou W., Choi M., Margineantu D., Margaretha L., Hesson J., Cavanaugh C., Blau C.A., Horwitz M.S., Hockenbery D., Ware C., Ruo-hola-Baker H. HIF1 α induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC/hESC transition. *EMBO J.* 2012;31(9):2103-2116. DOI 10.1038/emboj.2012.71.

ORCID ID

T.I. Babochkina orcid.org/0000-0003-3041-2789
L.A. Gerlinskaya orcid.org/0000-0002-8118-1362
M.P. Moshkin orcid.org/0000-0002-5388-2946

Благодарности. Исследования поддержаны грантом РНФ № 20-14-00055, бюджетным проектом № 0324-2019-0041 и выполнены с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

Авторы выражают благодарность А.Г. Мензорову и С.А. Федоровой за ценные замечания в процессе подготовки рукописи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 10.04.2020. После доработки 21.10.2020. Принята к публикации 17.11.2020.