

ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ И ПЕРСПЕКТИВЫ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

© 2023 г. Е. Д. Ерофеева^{а,*,}, В. К. Абдыев^{а,**}, А. В. Еремеев^{а,с,***},
Е. А. Воротеляк^{а,б,****}, А. В. Васильев^{а,б,*****}

^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

^бБиологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

^сФедеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

*E-mail: erofeeva.zhenya@gmail.com

**E-mail: mailtovepa@gmail.com

***E-mail: art-eremeev@yandex.ru

****E-mail: vorotelyak@yandex.ru

*****E-mail: 113162@bk.ru

Поступила в редакцию 14.08.2023 г.

После доработки 20.08.2023 г.

Принята к публикации 25.08.2023 г.

Биология плюрипотентности — это современная область биологической науки, и одновременно инструмент для моделирования морфогенеза человека *in vitro*. Плюрипотентность — это свойство клеток самообновляться и дифференцироваться во все типы клеток взрослого организма, которое образуется в раннем эмбриогенезе у млекопитающих. Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) имеют в принципе безграничный потенциал в регенеративной и трансляционной медицине, открывая возможности лечения множества заболеваний, в том числе наследственных. В обзоре описаны характерные черты ПСК, моделирование раннего морфогенеза человека *in vitro* в бластоцисто-подобных структурах и гастролоидах, моделирование органогенеза в органоидах. Рассмотрены примеры применения ПСК в регенеративной медицине и его риски. ПСК — это один из ключевых объектов современной клеточной биологии. Однако клиническое использование ПСК еще находится на стадии разработок и требует дальнейшего исследования для безопасного и эффективного применения.

Ключевые слова: плюрипотентные стволовые клетки, ИПСК, ЭСК, наивные ПСК, праймированные ПСК, репрограммирование, регенеративная медицина.

DOI: 10.31857/S0869587323090062, **EDN:** IOTAJY

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) обладают такими уникальными характеристика-

ЕРОФЕЕВА Евгения Дмитриевна — студент кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. АБДЫЕВ Вера Керимбердыевич — кандидат биологических наук, научный сотрудник ИБР РАН. ЕРЕМЕЕВ Артём Валерьевич — кандидат биологических наук, заведующий лабораторией ФНКЦ ФХМ ФМБА, старший научный сотрудник ИБР РАН. ВОРОТЕЛЯК Екатерина Андреевна — член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией ИБР РАН, профессор кафедры клеточной биологии и гистологии биофака МГУ им. М.В. Ломоносова. ВАСИЛЬЕВ Андрей Валентинович — член-корреспондент РАН, директор ИБР РАН, заведующий кафедрой эмбриологии биофака МГУ им. М.В. Ломоносова.

ми, как способность к неограниченному делению и дифференцировке в любой тип соматических клеток [1]. Эти свойства делают их перспективным инструментом для клеточной терапии заболеваний человека, иммунотерапии опухолей, создания трансплантатов для заместительной терапии [2]. Плюрипотентное состояние клетки обуславливается совместным действием внутренних и внешних сигнальных факторов, которые способствуют формированию транскрипционного и эпигенетического профиля, характерного для ПСК [1]. Впервые из внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцист были получены эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), которые обладают свойствами плюрипотентности [3]. Одна-

ко применение ЭСК в заместительной клеточной терапии ограничено. ЭСК для терапии получают путём выделения клеток из человеческих эмбрионов, и это вызывает серьёзные морально-этические проблемы [4]. К тому же при попытке трансплантации ЭСК реципиенту может возникать их отторжение из-за иммунной несовместимости. Было показано, что использование ЭСК часто сопровождается их трансформацией в организме реципиента [5].

Благодаря открытию С. Яманаки в 2006 г. стало возможным репрограммирование соматических клеток в плюрипотентные путём эктопической экспрессии нескольких генов: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* [6]. Плюрипотентные клетки, полученные из соматических, были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК). ИПСК, полученные этим способом, по своим характеристикам похожи на ЭСК: обладают способностью к непрерывному делению, могут дифференцироваться в производные трёх зародышевых листков, формируют тератомы при подкожной инъекции мышам, способны к формированию химер [6]. В 2012 г. данное открытие было отмечено Нобелевской премией по физиологии и медицине.

Появление метода получения ИПСК позволило разработать протоколы дифференцировки в различные типы соматических клеток, а значит, исследовать механизмы развития и формирования специализированных клеток, тканей и органов.

Потенциально ИПСК можно использовать для лечения заболеваний, связанных с большой потерей клеточных популяций (таких, как болезнь Паркинсона, диабет, поражения сетчатки глаза и т.д.) [7]. Однако существует ряд ограничений и нерешённых проблем, связанных с получением и использованием ПСК для исследования и лечения ряда заболеваний.

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНИЗМОВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) образуются в преимплантационном эмбрионе и обладают способностью дифференцироваться во все типы клеток взрослого организма. С созреванием и развитием эмбрионов мыши и человека различаются такие состояния плюрипотентности [8–17], как наивное, розеточное, формативное и праймированное [15]. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мыши выделяются из клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты, находясь в наивном состоянии *in vitro* [3, 18, 19]. Наивное состояние плюрипотентности — это состояние ПСК с большей пластичностью к каноническим (все типы соматических клеток организма) и неканоническим (клетки амниона) диф-

ференцировкам. Хотя ЭСК человека получают из клеток ВКМ преимплантационной бластоцисты [20], их не удаётся поддерживать в культуре в аналогичном состоянии ЭСК мыши. ЭСК человека культивируются и поддерживаются в праймированном состоянии. Праймированное состояние плюрипотентности — это состояние с меньшей пластичностью к каноническим дифференцировкам. Причина различного состояния ЭСК *in vitro* заключается в условиях культивирования. Для сохранения плюрипотентного потенциала и самообновления в культуре наивной ЭСК мыши требуется наличие фактора LIF (лейкемия-ингибирующий фактор), который действует посредством активации сигнального каскада STAT3 [8, 21]. Фосфорилированный транскрипционный фактор STAT3 активирует экспрессию генов *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4* и *Sall4*, которые ответственны за поддержание плюрипотентности и самообновления ЭСК мыши *in vitro*, тогда как ростовые факторы FGF2 [9] и TGFb [10] определяют праймированное состояние ЭСК человека *in vitro* [11]. Сегодня успешно разработаны протоколы и условия культивирования праймированных ПСК человека, например использование сред NHSM, RSeT, 5iLAF и t2iLGdY, для репрограммирования в наивное состояние [12].

Розеткоподобные плюрипотентные стволовые клетки (РПСК) образуются в результате утраты наивного состояния плюрипотентности и демонстрируют совместную экспрессию маркеров *Klf4* и *Esrrb* наивных ПСК и факторов *Oct6*, *Otx2* праймированных ПСК у мыши [14]. Это состояние достигается за счёт ингибирования Wnt-сигнального пути и FGF-пути [15], то есть, с одной стороны, ингибируется поддержание наивной плюрипотентности, а с другой — тормозится дальнейшее созревание ПСК в праймированное состояние.

Формативные ПСК обладают потенциалом дифференцироваться в первичные половые клетки (ППК) под действием BMP4 [22–25] и в клетки эктодермы, мезодермы и энтодермы [25]. Формативное состояние плюрипотентности ПСК *in vitro* стабилизируется ростовыми факторами *Fgf2* и *Activin A* [15]. Было показано, что из клеток, обладающих свойствами формативных ПСК, в результате направленной дифференцировки формируются ППК-подобные клетки [23, 26].

Репrogramмирование праймированных ПСК человека в наивное состояние позволяет ответить на фундаментальные вопросы биологии плюрипотентности и эпигенетической регуляции в раннем развитии человека. Изучение плюрипотентности — современная область биологической науки и одновременно инструмент для моделирования морфогенеза человека *in vitro*. Применение ПСК в регенеративной и трансляционной меди-

цине открывает возможности лечения многих заболеваний, в том числе наследственных.

ФОРМИРОВАНИЕ ЭМБРИОПОДОБНЫХ СТРУКТУР *DE NOVO*, БЛАСТОИДЫ-ГАСТРУЛОИДЫ И СИНТЕТИЧЕСКАЯ ЭМБРИОЛОГИЯ

ПСК способны к агрегации в 3D-системах *in vitro* в эмбриоподобные структуры (эмбрионидные тельца). Для эмбрионидных телец характерно отсутствие осевой организации. Из эмбрионидных телец были получены глазной бокал [27], кортикальные нейроны [28], клетки энтодермальных [29] и мезодермальных линий [30]. Недавние исследования показали, что из ПСК можно получать эмбриоподобные структуры, которые воссоздают ранний эмбриогенез [31]. Были предложены преимплантационные эмбриоподобные модели, которые позволяют моделировать взаимодействия между зародышевыми и внезародышевыми клетками [32]. Бластицисты состоят из клеток трофобластодермы, которые становятся плацентой, и клеток ВКМ, из которых дальше развивается сам эмбрион. Путём комбинирования ЭСК и стволовых клеток трофобласта были созданы бластоиды — бластоцистоподобные структуры [33]. В результате взаимодействия между наивными ПСК и стволовыми клетками трофобласта развивается 3D-структура с полостью, аналогичной бластоцели. Клетки бластоида демонстрируют схожий профиль экспрессии и эпигенетический паттерн с клетками ВКМ и трофобластодермы бластоцисты [33]. Бластоиды продемонстрировали способность имплантироваться на искусственный эндометрий [33].

Эмбрион человека на стадии гаструлы недоступен для изучения, в то время как ПСК позволяют моделировать и изучать механизмы гаструляционного движения эмбриона человека *in vitro*. Так, из ЭСК человека получили гастролоиды, имитирующие постимплантационную стадию развития, клетки которых способны к дифференцировке в три зародышевых листка [34]. При добавлении агониста Wnt-пути культуры ЭСК формировали компактные сферические агрегаты, которые впоследствии утрачивали симметрию и экспрессировали маркеры энтодермы, мезодермы и эктодермы [34]. Комбинирование внеклеточного матрикса с гастролоидами привело к формированию в них сомитов [35].

Бластоиды и гастролоиды, полученные из ПСК, дают возможность изучения редких заболеваний человека и аномалий развития. Используя технологии репрограммирования соматических клеток в ИПСК, можно создать пациент-специфичные бластоиды и гастролоиды, которые моделируют генетические заболевания. С использованием клеточных инженерных конструкций удаётся

тестировать перспективные лекарства, изучать раннее эмбриональное развитие. Оптимизированные условия культивирования позволяют изучать причины потери беременности [36] методом имитирования имплантации эмбриона человека и/или бластоидов. Более того, из ИПСК получают органоиды, которые активно используются для моделирования наследственных, приобретённых, а также инфекционных заболеваний.

Органоиды — самоорганизованные клеточные агрегаты, содержащие разные типы клеток, моделирующие органы и ткани человека. В результате направленной дифференцировки ПСК человека была *de novo* сгенерирована 3D-модель ткани желудка, которая образует слизистую оболочку [37]. Эта 3D-модель была названа органоидом желудка человека, её использовали для моделирования инфекции *Helicobacter pylori* [37]. Было показано, что в результате инфекции *H. pylori* токсичный фактор CagA, кодируемый *H. pylori*, взаимодействует с c-Met-рецептором эпителиальных клеток органоида, вызывая пролиферацию эпителия органоида и патофизиологический ответ [37]. Активация c-Met-рецептора гепатоцитов связана с ростом опухолевых клеток [38]. Были созданы органоиды, имитирующие тимус [39], внутреннее ухо [40], кожу [41]. Органоиды, генетически модифицированные с помощью системы CRISPR/Cas9, являются перспективным инструментом для исследования наследственных заболеваний [42].

Из ПСК человека были получены органоиды мозга за счёт ингибирования TGF β -пути и индукции фактором FGF2 [43]. Эти органоиды используют для моделирования болезни Альцгеймера, микроцефалии, вызванной вирусом Зика, для моделирования раннего развития мозга [44]. Например, было показано, что гиперэкспрессия белка ZIKV-NS2A в органоидах переднего мозга приводит к нарушению пролиферации нейронов радиальной глии [45]. Однако использование органоидов мозга связано с существенными сложностями, обусловленными их невоспроизводимым специфическим клеточным составом и такими характеристиками зрелой нервной ткани, как электрофизиологическая активность, способность образовывать нейронные сети с электрической активностью [46, 47]. Другая важная проблема — гибель клеток в результате длительного культивирования из-за затруднённой диффузии кислорода и питательных веществ [47, 48]. Улучшению созревания органоидов способствует введение эндотелиальных клеток или сосудистых структур, васкуляризация или длительное культивирование [49, 50].

Боковой амиотрофический склероз [51], при котором происходит дегенерация моторных нейронов в коре головного мозга и в спинном мозге [52], приводит к параличам и последующей атро-

фии мышц [52]. Из ЭСК человека были получены мотонейроны, которые культивировались совместно с трансгенными глиальными клетками с мутацией бокового амиотрофического склероза [53]. Так было обнаружено токсичное воздействие астроцитов с мутацией бокового амиотрофического склероза на мотонейроны [53].

В настоящее время существует множество протоколов дифференцировки ИПСК в различные типы клеток. Путём направленной дифференцировки были получены дофаминэргические нейроны [54], различные типы клеток сетчатки глаза [55], а в результате спонтанной дифференцировки ИПСК — клетки пигментного эпителия сетчатки [56]. Из ИПСК также удалось получить кардиомиоциты, по своим характеристикам сходные с кардиомиоцитами сердца. Было показано, что при трансплантации ИПСК происходит восстановление мышечной и эндотелиальной сердечных тканей, повреждённых вследствие инфаркта миокарда [57]. Разрабатываются протоколы по получению из ИПСК первичных половых клеток (ППК), что в перспективе позволит найти новые способы лечения бесплодия [58]. Из ИПСК также были получены макрофаги, проявляющие выраженную противомикробную активность [59].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПСК В ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Одним из препятствий практического применения ПСК является их потенциал к формированию опухолей после трансплантации [2]. При подкожном введении ПСК иммунодефицитным мышам ПСК образуют тератомы — доброкачественные опухоли, содержащие клетки трёх зародышевых листков. Это свойство — одна из главных характеристик состояния плюрипотентности [60]. При этом онкогенность ПСК и их производных после трансплантации можно разделить на две отдельные категории: формирование доброкачественных тератом и формирование злокачественных тератокарцином, содержащих клетки трёх зародышевых листков и плюрипотентные эмбриональные карциномные клетки [61]. Способность ПСК вызывать развитие опухолей исследовалась на многих животных моделях — мышах [62, 63] и приматах [64]. Трансплантированные в мозг обезьян дофаминэргические нейроны, полученные из ЭСК человека, формировали опухоли [64].

Сигнальные пути и экспрессия генов, которые поддерживают плюрипотентность и вызывают онкогенез, тесно связаны [65]. В раковых клетках могут быть задействованы механизмы и координированно функционирующие гены, характерные для ПСК и способствующие высокому темпу

пролиферации, самообновлению. К этим генам относятся *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* [66]. К тому же отсутствие p53-опосредованной регуляции клеточного цикла, устойчивость к апоптозу, отсутствие Rb-чекпойнтов являются пересекающимися механизмами поддержания ПСК и раковых клеток [61]. Была описана корреляция между генной экспрессией клеток агрессивных раковых опухолей и экспрессией транскрипционных факторов плюрипотентности, в особенности связанных с транскрипционным фактором c-Myc [66]. При этом для ПСК характерны механизм контроля деления и бесконечная пролиферация только в условиях поддержания плюрипотентности [13]. При изменении этих условий ПСК теряют данные свойства и переходят к дифференцировке [13]. Исследования показали, что дифференцированные клетки могут реактивировать или поддерживать активность генов плюрипотентности [66].

Безопасные методы репрограммирования соматических клеток в ИПСК могут помочь преодолеть проблему их трансформации в раковые клетки. К таким методам относится использование векторов, которые могут быть вырезаны из генома ИПСК. Это, например, доксициклин-индуцируемые лентивирусные конструкции [67]. Для того чтобы обойти реактивацию потенциально онкогенных факторов репрограммирования, используют вирусы и плазмиды, которые не встраиваются в геном и не вызывают его модификаций, а также прямую доставку мРНК и белков плюрипотентности [68, 69].

Способность ПСК и их производных формировать опухоли — это одно из главных препятствий их клинического применения. Образованию опухоли способствует иммунный ответ организма на дифференцированные и недифференцированные ПСК. С одной стороны, сильная иммунная реакция снижает вероятность формирования опухоли, но и приводит к отторжению всего трансплантата. С другой стороны, сниженная иммуногенность, напротив, способствует приживлению имплантата, но повышает вероятность возникновения опухоли.

Существуют аутогенные и аллогенные трансплантаты ПСК, различающиеся по иммуногенным свойствам. Очевидное решение проблемы несовместимости — создание аутогенных трансплантатов ПСК, которые не вызывают сильного иммунного ответа и считаются иммунотолерантными [70]. Было показано, что трансплантация мышам тканей кожи и костного мозга, полученных из ИПСК, проходит успешно без признаков отторжения [71]. Сниженная иммуногенность трансплантатов ПСК более предпочтительна, так как это не требует жёсткой иммуносупрессии, характерной для аллогенной трансплантации. Однако метод создания индивидуальных аутоген-

ных ПСК является дорогостоящим и требует длительного времени, поэтому в клинической практике он не применяется повсеместно [72]. Недавние исследования показали, что производные ИПСК могут активировать цитотоксический ответ аутогенных лимфоцитов и тем самым вызывать воспаление [73] и что производные ИПСК подвержены цитотоксическому воздействию натуральных киллеров вне зависимости от статуса HLA-1 [73]. Это может быть связано с нарушением баланса активирующих и ингибирующих лигандов натуральных киллеров на поверхности производных ИПСК [73].

При аллогенной трансплантации тканей генетически неидентичных организмов возникает иммунная реакция, вызванная несовместимостью групп крови, молекул главного комплекса гистосовместимости, минорных антигенов гистосовместимости. Однако аллогенная трансплантация подробно охарактеризованных линий ПСК является более осуществимым способом клеточной терапии, чем аутогенная трансплантация. Разработаны методы снижения иммуногенности ПСК, при которых подавляют либо удаляют гены, связанные с комплексом HLA, и используют иммуносупрессоры [74, 75]. Высокий практический потенциал решения проблемы гистосовместимости имеет создание банков линий ИПСК и их производных, гомозиготных по генам HLA [76].

Несмотря на описанные трудности, проводятся клинические исследования по трансплантации производных ИПСК пациентам. Так, четырём пациентам с повреждениями спинного мозга в области C3/4-Th10 сегментов были трансплантированы нейральные стволовые клетки-предшественники, дифференцированные из ИПСК [77]. Проводятся клинические исследования по тестированию кардиомиоцитов [78], пигментного эпителия сетчатки, которые получают из ПСК [79].

МОДЕЛИРОВАНИЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ТЕСТИРОВАНИЕ ЛЕКАРСТВ

Критический аспект в определении патофизиологии болезни и поиске лекарства — наличие физиологически релевантной модели заболевания. Часто переход испытаний лекарств на модельных животных к клиническим испытаниям на людях терпит неудачу вследствие физиологических различий видов. Клеточное моделирование заболеваний ограничено из-за недостатка труднодоступных клеток, таких как нейроны, кардиомиоциты, бета-клетки поджелудочной железы и др. Моделирование заболеваний с использованием ИПСК обладает такими преимуществами, как неограниченное количество клеток различных фенотипов, получение клеток от любого человека, генетическое редактирование.

Тестирование лекарств с использованием ИПСК имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами тестирования, в частности, с использованием животных моделей, так как с помощью ИПСК можно моделировать заболевания, включающие нарушения работы сразу нескольких генов, при этом исследование проводится на клетках или тканях человека. На основе этого метода было проведено несколько успешных проверок лекарств на их токсичность и эффективность.

ИПСК, репрограммированные из клеток пациентов с недостаточностью альфа-1-антитрипсина (A1AT), дифференцировали в гепатоциты. Дефицит A1AT вызывается мутацией в гене *A1AT* и приводит к нарушениям работы печени. При использовании производных ИПСК были обнаружены вещества, уменьшающие накопление мутантного A1AT в клетках. Так, карбамазепин оказался эффективен и способствовал лечению фиброза печени мышей с дефицитом A1AT [80].

Некоторые лекарства, не прошедшие достаточного тестирования, оказываются кардиотоксичными. В настоящее время общепринятые тесты на кардиотоксичность детектируют компоненты лекарства, блокирующие калиевые каналы (hERG-тест). Известно, что hERG-тест является неточным показателем кардиотоксичности и регулярно приводит к ложноположительным и ложноотрицательным результатам [81]. Токсичность лекарств проверяют на immortalized клетках, которые накапливают мутации и становятся нечувствительны к воздействию лекарств [82]. Кардиомиоциты животных отличаются от кардиомиоцитов человека по электрофизиологическим характеристикам, поэтому использование животных моделей также ограничено. Тестирование новых препаратов может происходить с использованием тканей, полученных от человека. Однако изоляция ткани и протокол её подготовки — трудоёмкие процессы. Поэтому создание кардиомиоцитов из ЭСК и ИПСК человека — потенциальный метод генерации более точного теста на кардиотоксичность. Обнаружено, что чувствительность к ингибиторам калиевого тока проаритмогенных препаратов более достоверна в кардиомиоцитах, полученных из ЭСК/ИПСК человека, чем в коммерческих hERG-клеточных линиях (hERG-HEK293) [82].

ПОЛУЧЕНИЕ ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫХ ИПСК. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ

Генетически модифицированные пациент-специфичные ИПСК имеют высокий потенциал к лечению широкого спектра заболеваний. Системы редактирования генома, такие как нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), TALEN (transcription activator like effector nucleases), CRISPR/CAS9,

позволяют исправлять мутации, приводящие к заболеваниям [83]. Для генотерапии также используются искусственные хромосомы. Alphoid^{tetO}-искусственная хромосома человека применяется для векторной доставки генов в ИПСК, в клетки пациентов с нарушениями работы определённых генов. Проводятся исследования по разработке протокола доставки Alphoid^{tetO}-искусственной хромосомы в ИПСК, однако пока это остаётся трудной задачей [84].

Удалось получить фибробласты “гуманизированной” мыши с мутацией β -цепи гемоглобина ($h\beta^S$) человека, моделирующей развитие серповидно-клеточной анемии [84]. Выделенные фибробласты были репрограммированы в ИПСК ретровирусной конструкцией, кодирующей Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мус [85]. Далее в полученных ИПСК мыши с мутацией $h\beta^S$ была исправлена мутация с помощью гомологичной рекомбинации с диким типом гемоглобина цепи β^A человека [85]. Направленной дифференцировкой модифицированных ИПСК в эмбрионидных тельцах получали гематопоэтические клетки-предшественники, которые трансплантировали в мышь, в результате чего произошло улучшение фенотипа мутантных мышей [85].

В другом исследовании были получены дермальные фибробласты и кератиноциты человека, страдающего анемией Фанкони [86]. В эти соматические клетки с помощью лентивирусной трансдукции был введён нормальный аллель мутантного гена *FANCA*, вызвавшего анемию. Затем клетки репрограммировали в ИПСК путём ретровирусной трансдукции генов, кодирующих транскрипционные факторы OCT4, SOX2, KLF4, с или без C-МУС. Из ИПСК, которые несли здоровый аллель гена *FANCA*, удалось получить клетки гематопоэтического ряда, которые также несли здоровый аллель гена. Однако авторы этого исследования подчёркивают необходимость дальнейшего изучения онкогенности ИПСК перед их трансплантацией в организм человека [86].

* * *

Таким образом, не вызывает сомнений, что ПСК (ЭСК и ИПСК) — это многообещающая модель, которая применяется в биомедицине, фармакологии, клеточной терапии, а также в исследованиях раннего эмбриогенеза. Несмотря на нерешённость некоторых вопросов безопасности (онкогенность, иммуногенность) и на технологические проблемы, терапия на основе ПСК человека начинает использоваться для лечения различных заболеваний и, это не менее важно, благодаря клеточным моделям на основе ПСК наблюдается прогресс в области изучения многих заболеваний. Тем не менее терапевтические под-

ходы с использованием ПСК всё ещё находятся в зачаточном состоянии и требуют дальнейшего исследования для безопасного и эффективного их применения.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания ИБР РАН № 088-2021-0016, а также поддержана Министерством науки и высшего образования РФ, соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Smith A.G.* Embryo-Derived Stem Cells: Of Mice and Men // Annual Review of Cell and Developmental Biology. 2001. V. 17. № 1. P. 435–462.
2. *Lee A.S., Tang C., Rao M.S. et al.* Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies // Nat. Med. 2013. V. 19. № 8. P. 998–1004.
3. *Evans M.J., Kaufman M.H.* Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // Nature. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.
4. *Zacharias D.G., Nelson T.J., Mueller P.S., Hook C.C.* The Science and Ethics of Induced Pluripotency: What Will Become of Embryonic Stem Cells? // Mayo Clinic Proceedings. 2011. V. 86. № 7. P. 634–640.
5. *Hochedlinger K., Jaenisch R.* Nuclear reprogramming and pluripotency // Nature. 2006. V. 441. № 7097. P. 1061–1067.
6. *Takahashi K., Yamanaka S.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors // Cell. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
7. *Rowe R.G., Daley G.Q.* Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery // Nat. Rev. Genet. 2019. V. 20. № 7. P. 377–388.
8. *Ying Q.-L., Wray J., Nichols J. et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal // Nature. 2008. V. 453. May. P. 519–23.
9. *Levenstein M.E., Ludwig T.E., Xu R.-H. et al.* Basic Fibroblast Growth Factor Support of Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal // Stem Cells. 2006. V. 24. № 3. P. 568–574.
10. *Vallier L., Mendjan S., Brown S. et al.* Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression // Development. 2009. V. 136. № 8. P. 1339–1349.
11. *Ávila-González D., Portillo W., García-López G. et al.* Unraveling the Spatiotemporal Human Pluripotency in Embryonic Development // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021. V. 9. P. 1539.
12. *Liu L., Michowski W., Inuzuka H. et al.* G1 cyclins link proliferation, pluripotency and differentiation of em-

- bryonic stem cells // *Nat. Cell Biol.* 2017a. V. 19. № 3. P. 177–188.
13. Liu X., Nefzger C.M., Rossello F.J. et al. Comprehensive characterization of distinct states of human naive pluripotency generated by reprogramming // *Nature Publishing Group*. 2017b. № September.
 14. Neagu A., van Genderen E., Escudero I. et al. In vitro capture and characterization of embryonic rosette-stage pluripotency between naive and primed states // *Nature Cell Biology*. 2020. V. 22 № 5. P. 534–545. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0508-x>
 15. Gordeev M.N., Bakhmet E.I., Tomilin A.N. Pluripotency Dynamics during Embryogenesis and in Cell Culture // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2021. V. 52. № 6. P. 379–389.
 16. Sim Y.-J., Kim M.-S., Nayfeh A. et al. 2i Maintains a Naive Ground State in ESCs through Two Distinct Epigenetic Mechanisms // *Stem Cell Reports*. 2017. V. 8. № 5. P. 1312–1328.
 17. Novo C.L. A Tale of Two States: Pluripotency Regulation of Telomeres // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021. V. 9.
 18. Nichols J., Smith A. Naive and Primed Pluripotent States // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 4. № 6. P. 487–492.
 19. Lagarkova M.A., Ereemeev A.V., Svetlakov A.V. et al. Human embryonic stem cell lines isolation, cultivation, and characterization // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 2010. V. 46. № 3–4. P. 284–293.
 20. Rossant J., Tam P.P.L. New insights into early human development: lessons for stem cell derivation and differentiation // *Cell Stem Cell*. 2017. V. 20. № 1. P. 18–28.
 21. Dahéron L., Opitz S.L., Zaehres H. et al. LIF/STAT3 Signaling Fails to Maintain Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells // *Stem Cells*. 2004. V. 22. № 5. P. 770–778.
 22. Kinoshita M., Smith A. Pluripotency Deconstructed // *Development Growth and Differentiation*. 2018. V. 60. № 1. P. 44–52.
 23. Kinoshita M., Barber M., Mansfield W. et al. Capture of Mouse and Human Stem Cells with Features of Formative Pluripotency // *Cell Stem Cell*. 2021. V. 28. № 3. P. 453–471.e8.
 24. Hoogland S.H.A., Marks H. Developments in pluripotency: a new formative state // *Cell Research*. 2021. V. 31. № 5. P. 493–494.
 25. Yeh C.Y., Huang W.H., Chen H.C., Meir Y.J.J. Capturing Pluripotency and Beyond // *Cells*. 2021. V. 10. № 12. P. 3558.
 26. Abdyev V.K., Sant D.W., Kiseleva E.V. et al. In vitro derived female hPGCLCs are unable to complete meiosis in embryoid bodies // *Experimental Cell Research*. 2020. V. 397. № 2. P. 112358.
 27. Nakano T., Ando S., Takata N. et al. Self-Formation of Optic Cups and Storable Stratified Neural Retina from Human ESCs // *Cell Stem Cell*. 2012. V. 10. № 6. P. 771–785.
 28. Nestor M.W., Paull D., Jacob S. et al. Differentiation of serum-free embryoid bodies from human induced pluripotent stem cells into networks // *Stem Cell Research*. 2013. V. 10. № 3. P. 454–463.
 29. Yabe S.G., Nishida J., Fukuda S. et al. Definitive endoderm differentiation is promoted in suspension cultured human iPS-derived spheroids more than in adherent cells // *Int. J. Dev. Biol.* 2019. V. 63. № 6–7. P. 271–280.
 30. Darabi R., Gehlbach K., Bachoo R.M. et al. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells // *Nat Med*. 2008. V. 14. № 2. P. 134–143.
 31. Shahbazi M.N., Zernicka-Goetz M. Deconstructing and reconstructing the mouse and human early embryo // *Nat. Cell Biol.* 2018. V. 20. № 8. P. 878–887.
 32. Harrison S.E., Sozen B., Christodoulou N. et al. Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro // *Science*. 2017. V. 356. № 6334. P. eaal1810.
 33. Rivron N.C., Frias-Aldeguer J., Vrij E.J. et al. Blastocyst-like structures generated solely from stem cells // *Nature*. 2018. V. 557. № 7703. P. 106–111.
 34. Moris N., Anlas K., Brink S.C. van den et al. An in vitro model of early anteroposterior organization during human development // *Nature*. 2020. V. 582. № 7812. P. 410–415.
 35. Brink S.C. van den, Alemany A., Batenburg V. van et al. Single-cell and spatial transcriptomics reveal somitogenesis in gastruloids // *Nature*. 2020. V. 582. № 7812. P. 405–409.
 36. Berlo D. van, Nguyen V.V.T., Gkouzioti V. et al. Stem cells, organoids, and organ-on-a-chip models for personalized in vitro drug testing // *Current Opinion in Toxicology*. 2021. V. 28. P. 7–14.
 37. McCracken K.W., Catá E.M., Crawford C.M. et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids // *Nature*. 2014. V. 516. № 7531. P. 400–404.
 38. Churin Y., Al-Ghoul L., Kepp O. et al. Helicobacter pylori CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response // *J Cell Biol.* 2003. V. 161. № 2. P. 249–255.
 39. Provin N., Giraud M. Differentiation of Pluripotent Stem Cells Into Thymic Epithelial Cells and Generation of Thymic Organoids: Applications for Therapeutic Strategies Against APECED // *Frontiers in Immunology*. 2022. V. 13. P. 930963
 40. Koehler K.R., Hashino E. 3D mouse embryonic stem cell culture for generating inner ear organoids // *Nat. Protoc.* 2014. V. 9. № 6. P. 1229–1244.
 41. Miyake T., Shimada M. 3D Organoid Culture Using Skin Keratinocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells // *Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells: Methods and Protocols Methods in Molecular Biology / A. Nagy, K. Turksen (ed.). New York: Springer US, 2022. P. 285–295.*
 42. Sahu S., Sharan S.K. Translating Embryogenesis to Generate Organoids: Novel Approaches to Personalized Medicine // *iScience*. 2020. V. 23. № 9. P. 101485.
 43. Muguruma K., Nishiyama A., Kawakami H. et al. Self-Organization of Polarized Cerebellar Tissue in 3D Culture of Human Pluripotent Stem Cells // *Cell Reports*. 2015. V. 10. № 4. P. 537–550.

44. *Amin N.D., Pasca S.P.* Building Models of Brain Disorders with Three-Dimensional Organoids // *Neuron*. 2018. V. 100. № 2. P. 389–405.
45. *Yoon K.-J., Song G., Qian X. et al.* Zika-Virus-Encoded NS2A Disrupts Mammalian Cortical Neurogenesis by Degrading Adherens Junction Proteins // *Cell Stem Cell*. 2017. V. 21. № 3. P. 349–358.e6.
46. *Quadrato G., Nguyen T., Macosko E.Z. et al.* Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids // *Nature*. 2017. V. 545. № 7652. P. 48–53.
47. *Eremeev A.V., Lebedeva O.S., Bogomiakova M.E. et al.* Cerebral Organoids – Challenges to Establish a Brain Prototype // *Cells*. 2021. V. 10. № 7. P. 1790.
48. *Berger E., Magliaro C., Paczia N. et al.* Millifluidic culture improves human midbrain organoid vitality and differentiation // *Lab. on a Chip*. 2018. V. 18. № 20. P. 3172–3183.
49. *Mansour A.A., Gonçalves J.T., Bloyd C.W. et al.* An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids // *Nat. Biotechnol.* 2018. V. 36. № 5. P. 432–441.
50. *Еремеев А.В., Воловиков Е.А., Шувалова Л.Д., Давиденко А.В., Хомякова Е.А., Богомякова М.Е., Лебедева О.С., Зубкова О.А., Лагарькова М.А.* “Голь на выдумки хитра”, или дешёвый, надёжный и воспроизводимый способ получения органоидов // *Биохимия*. 2019. V. 84. P. 448–456.
51. *Kiernan M.C., Vucic S., Cheah B.C. et al.* Amyotrophic lateral sclerosis // *The Lancet*. 2011. V. 377. № 9769. P. 942–955.
52. *Martin L.J., Price A.C., Kaiser A. et al.* Mechanisms for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and in models of motor neuron death (Review) // *International Journal of Molecular Medicine*. 2000. V. 5. № 1. P. 3–16.
53. *Di Giorgio F.P., Boulting G.L., Bobrowicz S., Eggan K.C.* Human Embryonic Stem Cell-Derived Motor Neurons Are Sensitive to the Toxic Effect of Glial Cells Carrying an ALS-Causing Mutation // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 3. № 6. P. 637–648.
54. *Karumbayaram S., Novitsch B.G., Patterson M. et al.* Directed Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells Generates Active Motor Neurons // *Stem Cells*. 2009. V. 27. № 4. P. 806–811.
55. *Carr A.-J., Vugler A.A., Hikita S.T. et al.* Protective Effects of Human iPS-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Transplantation in the Retinal Dystrophic Rat // *PLOS ONE*. 2009. V. 4. № 12. P. e8152.
56. *Buchholz D.E., Hikita S.T., Rowland T.J. et al.* Derivation of Functional Retinal Pigmented Epithelium from Induced Pluripotent Stem Cells // *Stem Cells*. 2009. V. 27. № 10. P. 2427–2434.
57. *Nelson T.J., Martinez-Fernandez A., Yamada S. et al.* Repair of Acute Myocardial Infarction by Human Stemness Factors Induced Pluripotent Stem Cells // *Circulation*. 2009. V. 120. № 5. P. 408–416.
58. *Абдыев В.К., Дашинимаев Э.Б., Неклюдова И.В. и др.* Современные технологии получения первичных половых клеток человека in vitro // *Биохимия*. 2019. V. 84. № 3. P. 330–342.
59. *Lyadova I., Gerasimova T., Nenasheva T.* Macrophages Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells: The Diversity of Protocols, Future Prospects, and Outstanding Questions // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021. № 9.
60. *Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al.* Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts // *Science*. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.
61. *Ben-David U., Benvenisty N.* The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells // *Nat. Rev. Cancer*. 2011. V. 11. № 4. P. 268–277.
62. *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. V. 78. № 12. P. 7634–7638.
63. *Shih C.-C., Forman S.J., Chu P., Slovak M.* Human embryonic stem cells are prone to generate primitive, undifferentiated tumors in engrafted human fetal tissues in severe combined immunodeficient mice // *Stem Cells Dev*. 2007. V. 16. № 6. P. 893–902.
64. *Doi D., Morizane A., Kikuchi T. et al.* Prolonged maturation culture favors a reduction in the tumorigenicity and the dopaminergic function of human ESC-derived neural cells in a primate model of Parkinson’s disease // *Stem Cells*. 2012. V. 30. № 5. P. 935–945.
65. *Schoenhals M., Kassambara A., De Vos J.* Embryonic stem cell markers expression in cancers // *Biochemical and biophysical research communications*. 2009. V. 383. № 2.
66. *Ben-Porath I., Thomson M.W., Carey V.J. et al.* An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors // *Nat. Genet.* 2008. V. 40. № 5. P. 499–507.
67. *Soldner F., Hockemeyer D., Beard C. et al.* Parkinson’s disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors // *Cell*. 2009. V. 136. № 5. P. 964–977.
68. *Warren L., Manos P.D., Ahfeldt T. et al.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 7. № 5. P. 618–630.
69. *Ban H., Nishishita N., Fusaki N. et al.* Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 34. P. 14234–14239.
70. *Pearl J.I., Kean L.S., Davis M.M., Wu J.C.* Pluripotent Stem Cells: Immune to the Immune System? // *Science Translational Medicine*. 2012. V. 4. № 164. P. 164ps25–164ps25.
71. *Guha P., Morgan J.W., Mostoslavsky G. et al.* Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells // *Cell Stem Cell*. 2013. V. 12. № 4. P. 407–412.
72. *Hanna J.H., Saha K., Jaenisch R.* Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues // *Cell*. 2010. V. 143. № 4. P. 508–525.
73. *Bogomiakova M.E., Sekretova E.K., Anufrieva K.S. et al.* iPSC-derived cells lack immune tolerance to autologous NK-cells due to imbalance in ligands for activating and inhibitory NK-cell receptors // *Stem Cell Res. Ther.* 2023. V. 14. № 1. P. 77.

74. Zheng D., Wang X., Xu R.-H. Concise Review: One Stone for Multiple Birds: Generating Universally Compatible Human Embryonic Stem Cells // *Stem Cells*. 2016. V. 34. № 9. P. 2269–2275.
75. Bogomiakova M.E., Ereemeev A.V., Lagarkova M.A. At Home among Strangers: Is It Possible to Create Hypoimmunogenic Pluripotent Stem Cell Lines? // *Mol. Biol.* 2019. V. 53. № 5. P. 638–652.
76. Taylor C.J., Peacock S., Chaudhry A.N. et al. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types // *Cell Stem Cell*. 2012. V. 11. № 2. P. 147–152.
77. Curtis E., Martin J.R., Gabel B. et al. A First-in-Human, Phase I Study of Neural Stem Cell Transplantation for Chronic Spinal Cord Injury // *Cell Stem Cell*. 2018. V. 22. № 6. P. 941–950.e6.
78. HeartWorks, Inc. Safety and Feasibility of Autologous Induced Pluripotent Stem Cells of Cardiac Lineage in Subjects With Congenital Heart Disease: clinicaltrials.gov, 2023. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05647213>
79. Beijing Tongren Hospital. Safety and Efficacy of Autologous Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium in the Treatment of Macular Degeneration: clinicaltrials.gov, 2022. <https://hpscreg.eu/browse/trial/119>
80. Choi S.M., Kim Y., Shim J.S. et al. Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells // *Hepatology*. 2013. V. 57. № 6. P. 2458–2468.
81. Lu H.R., Vlamincx E., Hermans A.N. et al. Predicting drug-induced changes in QT interval and arrhythmias: QT-shortening drugs point to gaps in the ICHS7B Guidelines // *Br. J. Pharmacol.* 2008. V. 154. № 7. P. 1427–1438.
82. Liang P., Lan F., Lee A.S. et al. Drug Screening Using a Library of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Reveals Disease-Specific Patterns of Cardiotoxicity // *Circulation*. 2013. V. 127. № 16. P. 1677–1691.
83. Tucker B.A., Mullins R.F., Stone E.M. Stem cells for investigation and treatment of inherited retinal disease // *Human Molecular Genetics*. 2014. V. 23. № R1. P. R9–R16.
84. Sinenko S.A., Skvortsova E.V., Liskovych M.A. et al. Transfer of Synthetic Human Chromosome into Human Induced Pluripotent Stem Cells for Biomedical Applications // *Cells*. 2018. V. 7. № 12. P. 261.
85. Hanna J., Wernig M., Markoulaki S. et al. Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin // *Science*. 2007. V. 318. № 5858. P. 1920–1923.
86. Raya Á., Rodríguez-Piñá I., Guenachea G. et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells // *Nature*. 2009. V. 460. № 7251. P. 53–59.

PLURIPOTENCY AND PERSPECTIVES OF CELL TECHNOLOGIES

E. D. Erofeeva^{1,#}, V. K. Abdyev^{1,##}, A. V. Yeremeyev^{1,3,###}, E. A. Vorotelyak^{1,2,####}, and A. V. Vasiliev^{1,2,#####}

¹N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²Biological Faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³Y.M. Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physico-Chemical Medicine, FMBA of Russia, Moscow, Russia

#E-mail: erofeeva.zhenya@gmail.com

##E-mail: mailtovepa@gmail.com

###E-mail: art-eremeev@yandex.ru

####E-mail: vorotelyak@yandex.ru

#####E-mail: 113162@bk.ru

Biology of pluripotency is a modern field of biological science, and at the same time a tool for modeling human morphogenesis *in vitro*. Pluripotency is the property of cells to self-renew and differentiate into all types of cells of an adult organism, which appears in early embryogenesis in mammals. Pluripotent stem cells (PSCs) have limitless potential in regenerative and translational medicine, which open up perspectives for solving multiple diseases, including hereditary ones. This review describes the characteristics and uniqueness of PSCs, modeling of early human morphogenesis *in vitro* in blastocyst-like structures and gastruloids, modeling of organogenesis in organoids. Next, we considered the use of PSCs in regenerative medicine with their risks of capability to oncogenicity and immunogenicity in implication of a cell replacement therapy. However, therapeutic approaches using PSCs are still in their infancy and need to be deeply scrutinized.

Keywords: pluripotent stem cells, iPSCs, ESCs, naive PSCs, primed PSCs, reprogramming, regenerative medicine.