

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ GAL-КО СВИНЕЙ В КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Н.А. ЗИНОВЬЕВА¹, А.В. МЕЛЕРЗАНОВ², Е.В. ПЕТЕРСЕН², Н. КЛИМЮК³,
Н.А. ВОЛКОВА¹, А.С. ДУХ², И.А. ТРУСОВА², Э. ВОЛЬФ³, Г. БРЕМ⁴

Ксенотрансплантация (межвидовая трансплантация) имеет огромный потенциал для решения проблемы нехватки внутренних органов, тканей и клеток для пересадки человеку. В статье рассматриваются возможности использования генетически модифицированных свиней в качестве доноров таких органов и тканей. Дано краткое описание процесса сверхострой реакции отторжения (HAR). Одним из способов предотвращения HAR может стать создание свиней, у которых отсутствуют α -1,3-Gal эпитопы — основные ксеноантигены при пересадке органов от свиней приматам. Проанализирована результативность работ по таргетингу гена α -1,3-галактозилтрансферазы (*GGTA1*) в клетках свиней с помощью различных методов: эффективность таргетинга *GGTA1* (доля полученных жизнеспособных поросят с нокаутом *GGTA1* от числа пересаженных клонированных эмбрионов) между лабораториями различалась и варьировала от 0,0 до 5,0 %. Кратко описаны технологии, применяемые при получении трансгенных свиней с «выключенным» геном *GGTA1* (GAL-КО свиньи). Дискутируются возможности использования органов и тканей GAL-КО свиней в ксенотрансплантации. Показаны преимущества применения кожи GAL-КО свиней как материала для временного покрытия ожоговых ран по сравнению с кожей обычных свиней и аллогенной трансплантацией. Рассматривается возможность использования GAL-КО свиней в качестве доноров сердечных клапанов. Обсуждаются задачи исследований на перспективу.

Ключевые слова: трансгенные свиньи, GAL-КО, ксенотрансплантация, доноры органов и тканей, пересадка кожи, сердечные клапаны свиней.

Ключевой проблемой трансплантационной медицины остается нехватка внутренних органов и тканей для пересадки человеку. Одним из перспективных направлений ее решения в настоящее время считают использование органов и тканей животных — ксенотрансплантацию.

В качестве наиболее подходящего вида животных — потенциальных доноров рассматриваются свиньи. Свиньи широко распространены, их легко выращивать и содержать, их органы сходны с человеческими по размерам и физиологии, многие люди принимают факт изъятия свиных донорских органов, поскольку свиней выращивают как источник пищи для человека (1). Однако до недавнего времени использование свиней в качестве доноров обсуждалось только теоретически, поскольку пересадка их органов и тканей приматам сопровождалась отторжением в течение нескольких суток или даже часов после трансплантации (сверхострая реакция отторжения, HAR). Было установлено, что у последних (в том числе у человека) HAR обусловлена преимущественно наличием в крови естественных антител к карбогидратным эпитопам (α -1,3-Gal), которые синтезируются α -1,3-галактозилтрансферазой (α -1,3-GalT), кодируемой *GGTA1*. *GGTA1* функционален у большинства видов животных, включая свиней, но неактивен у человека и мармышек. После пересадки органов свиней приматам, «натуральные» антитела связываются с эпитопами α -1,3-Gal на эндотелии трансплантата и активируют систему комплемента, приводя к активации коагуляционного каскада и обуславливая тем самым HAR (2).

Таким образом, проблема заключается в том, чтобы снять HAR, а следовательно, увеличить период функционирования трансплантатов. Ее решением может стать создание так называемых GAL-КО трансгенных свиней (α -1,3-GalT knock-out pigs) с «выключенным» геном *GGTA1*. Дос-

тижение существенного прогресса в этом научном направлении оказалось возможным благодаря разработке эффективного метода клонирования свиней с использованием соматических клеток в качестве доноров ядер (3). Все GAL-КО свиньи получены методом пересадки ядер генетически трансформированных соматических клеток свиней с нокаутом (в гомо- или гомозиготном состоянии) *GGTA1*. Как показано в таблице, эффективность таргетинга *GGTA1* (доля полученных жизнеспособных поросят с нокаутом *GGTA1* от числа пересаженных клонированных эмбрионов) между лабораториями сильно различается и варьирует от 0,0 до 5,0 %.

Эффективность таргетинга гена *GGTA1* в клетках свиней с использованием различных методов (4)

Выключаемый экзон	Позитивная селекция	Клонировано эмбрионов	Эффективность таргетинга	Суперосности после пересадки эмбрионов	Тип свиней	Число гемизиготных поросят с нокаутом	Ссылка литературы
4	Neo	215	9,3	Не отмечено		Нет данных	(5)
4	Neo	395	1,0	4/10	Обычные свиньи	18	(6)
4	Neo	217	0,9	3/20	Обычные свиньи	6	(7)
9	Neo	159	5,0	3/29	Минипиги	7	(8)
9	Neo	1005	0,5-2,3	3/21	Обычные свиньи	7	(9)
9	Puro	1400	0,1	Не отмечено		Нет данных	(7)
9	Neo	Не отмечено	Не отмечено	Не отмечено	Обычные свиньи	1	(10)
9	Neo	681	0,7	Не отмечено		Нет данных	(11)
9	Hugro	19738	0,0-0,7	2/12	Обычные свиньи	2	(12)
9	Neo	926	0,9	4/8	Обычные свиньи	9	(13)
9	Neo	1312	1,0	5/11	NIBS минипиги	13	(14)
9	Neo	1953	0,3	5/12	NIBS минипиги	6	(14)
6	Neo	1919	0,2	2/7	Banna минипиги	3	(15)

Впервые о создании GAL-КО свиней сообщили две лаборатории в США: компания «PPL Therapeutics Inc.» получила линию с нокаутом *GGTA1* на основе обычных домашних свиней, использованных в качестве доноров ядер (9, 16), в то время как группа исследователей из Университета Миссури (University of Missouri) — на основе минипигов (8, 17). В настоящее время первая линия свиней поддерживается компанией «Revivacor» (штат Виргиния, США), которая создана в 2003 году на базе американского отделения «PPL Therapeutics Inc.» совместно с инвестиционной группой, руководимой медицинским центром Университета Питтсбурга (University of Pittsburg), вторая — исследовательским центром трансплантационной биологии Бостона (Transplantation Biology Research Center — TBRC, штат Массачусетс, США). Обе линии активно вовлечены в различные доклинические исследования, а также служат донорами клеток для проведения дополнительных генетических манипуляций.

Принимая во внимание перспективы использования GAL-КО трансгенных свиней в трансплантационной медицине, в последующем еще по крайней мере шесть исследовательских групп из разных стран сообщили о создании таких животных. На базе коммерческих пород получены GAL-КО свиньи в Университете Аделаиды (University of Adelaide) в сотрудничестве с «BresaGen Ltd.» (Австралия) (6, 18) и в Университете Людвиг-Максимилиана (Ludwig-Maximilians Universität, Мюнхен, Германия) (19). Группа из исследовательского института по инженерии животных (Animal Engineering Research Institute, Тсукуба, Япония) получила гомозиготных GAL-КО свиней с помощью метода предварительной *in vitro* селекции клеток с нокаутом *GGTA1* в гомозиготном состоянии (12, 13). Учеными из института Фридриха-Леффлера (Friedrich-Loeffler Institut, Ной-

штадт, Германия) предложен новый подход для эффективного получения биаллельных GAL-КО свиней посредством нокаута *GGTA1* с использованием цинк-фингерных нуклеаз (20). Группа из института биологических наук Nippon (Nippon Institute for Biological Science, Хокуто, Япония) сообщила о создании GAL-КО свиней на базе собственной линии минипиггов (14). Китайские исследователи с применением метода транскрипции активатороподобных эффекторных нуклеаз (TALENs) получили инбредных минипиггов линии Banna (BMI) с биаллельным нокаутом *GGTA1* (15).

Некоторые ограничения в развитии работ по генетической модификации свиней в связи с целями ксенотрансплантации наблюдались в самом начале XXI века, когда было высказано предположение о том, что присутствующие в геноме этих животных эндогенные ретровирусы (porcine endogenous retroviruses — PERV) могут активироваться в геноме других видов и представлять опасность не только для самого пациента, но и для остальных людей. Однако проведенные исследования полностью опровергли подобное предположение (21).

Следует отметить, что создание GAL-КО свиней позволяет (в большей степени) решить только проблему предотвращения HAR при пересадке их органов и тканей человеку. Дальнейший прогресс в использовании таких животных в качестве доноров для ксенотрансплантации связывают с проведением с ними специальных манипуляций, в частности позволяющих экспрессировать белки-регуляторы комплемента человека — CD46, CD55 и CD59 (22). В качестве технологий, обеспечивающих предотвращение острого гуморального отторжения пересаженных органов и тканей, рассматриваются генетические модификации свиней с целью экспрессии белков человека: эндотелиальной экто-аденозиновой фосфатазы CD39 (эк-то-АДФазы), эндотелиального рецептора протеина С (endothelial protein C receptor — EPCR), гемоксигеназы 1, тромбомодулина 1 и ингибитора пути тканевого фактора (tissue factor path inhibitor — TFPI) (23). На следующем этапе предполагаются модификации этих животных-доноров, направленные на дополнительную экспрессию генов, которые препятствуют процессу клеточного отторжения (24).

Несмотря на то, что достижение вышеназванных целей требует проведения новых широкомасштабных исследований, достигнутые успехи в нокауте *GGTA1* позволяют уже сегодня говорить о потенциальном значении GAL-КО свиней для решения некоторых задач трансплантационной медицины.

Использование в качестве источника кожи в терапии ожоговых ран. Среди различных повреждений мирного времени на долю ожогов приходится 4-6 %. В России ежегодно ожоги различной степени тяжести получают более 500 тыс. человек. В 2009 году число ожогов на 1000 человек взрослого населения составило 2,1, на 1000 детей — 2,5 (25). Идеальным материалом для трансплантации, бесспорно, служит собственная (аутологичная) кожа пациента, взятая с необожженного участка, однако ее источники даже при применении техник тканевой экспансии ограничены (26, 27). В этой связи «золотым стандартом» для временного закрытия ожоговых ран после удаления некротических тканей считается аллогенная кожа (28). Такая пересадка стимулирует краевую эпителизацию, ограничивает микробную инвазию через поврежденные структуры в организм пострадавшего, обеспечивает прекращение раневой плазмопотери, снижение болевого синдрома и сокращение срока подготовки ожоговых ран к аутотрансплантации, кроме того, уменьшается потребность в аутологичной коже. К недостаткам при использовании аллогенной кожи

следует отнести этические вопросы, ее высокую стоимость, риск передачи заболеваний, а также нехватку доноров.

Кожа свиньи и человека сходна по многим характеристикам (29, 30). Зафиксированная в глутаровом альдегиде свиная кожа уже давно используется в качестве временного покрытия при ожогах III степени в условиях военных действий (31). Однако она быстро отторгается — как правило, в течение не более чем 3 сут (32, 33).

Уже первые результаты исследований GAL-КО свиней показали перспективы их использования в качестве доноров кожи для временного закрытия ожоговых ран. J. Weiner с соавт. (34) пересадили двум павианам аутологичную (собственную), аллогенную (от других неродственных павианов) и ксеногенную кожу (от обычных и GAL-КО свиней). Если полное отторжение кожи обычных свиней наблюдалось уже на 4-е сут, а аллогенной — на 9-е сут, то отторжение кожи GAL-КО свиней у одного павиана произошло на 11-е сут, у другого — на 14-е сут после пересадки. Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что кожа GAL-КО свиней в качестве первоначального покрытия обширных ожоговых ран может служить альтернативой аллогенной коже человека, при том что биоматериал от свиней дешевле, доступнее и потенциально способен сохранять жизнеспособность более длительное время.

Использование в качестве доноров сердечных клапанов. Ежегодно в мире проводится около 300 тыс. операций по замене сердечных клапанов (35). Оптимальной заменой считается имплантация аллогенного бесклеточного матрикса, обладающего неограниченной продолжительностью использования, исключительной гемодинамикой (не требуется применение антикоагулянтов) и способностью к росту. Такой трансплантат способен к ревитализации *in vivo* клетками реципиента, которые формируют функциональный эндотелий и интерстиций. Ограничение в источниках донорских сердечных клапанов обуславливает поиск новых подходов к решению проблемы. Использование для этих целей механических протезов или биопротезов имеет ряд недостатков, связанных с необходимостью применения антикоагуляционной терапии в течение всего последующего периода после пересадки или с возможностью потери функций вследствие кальциноза и стеноза. Применение биопротезов на основе клапанов животных, в частности свиней и коров, не исключает наличия у пациентов иммунного ответа (36), так как коммерческие биопротезы (даже от основных производителей) после подготовки содержат главный ксеноантиген *GGTA1* (37). Проведенные модельные исследования на крысах показали достоверно более низкий уровень кальциноза трансплантированных сердечных клапанов от GAL-КО свиней по сравнению с интактными особями как в присутствии, так в отсутствие специфических антител к *GGTA1*, что позволяет предположить преимущество GAL-КО свиней в качестве нового источника биоматериала для создания биопротезов сердечных клапанов (38).

Однако самым многообещающим и в то же время сложным направлением остается создание биотехнологии, позволяющей выращивать у свиней человеческие органы (39-43). Эта технология объединяет возможности использования организма геномодифицированного животного в качестве биореактора и стволовой ниши для формирования в ней человеческих органов из индуцированных стволовых клеток (*induced pluripotent stem cells* — *iPS*), поскольку с разработкой методов выращивания *iPS* стало возможным их получение непосредственно от пациента. В лаборатории профессора Н. Nakauchi такой подход для создания органов был реализо-

ван на модели мелких животных (39, 40) и в настоящий момент ведется работа по формированию человеческих органов в организме крупных животных — свиней (41). Можно предположить, что описанный прием с использованием полученной от GAL-КО свиней неиммуногенной матрицы для заселения аутологичных клеток снимет проблему отторжения пересаживаемых органов, с которой в настоящее время сталкивается трансплантология.

Обсуждая проблемы и перспективы ксенотрансплантации, следует отметить, что внедрение в практическую медицину технологий, предполагающих использование биоматериала GAL-КО свиней, потребует проведения дополнительных комплексных исследований этих животных для решения ряда ключевых задач. В частности, необходимо обосновать и разработать методологии поддержания гомозиготных линий GAL-КО свиней без снижения их жизнеспособности, определить критерии оценки и регламенты закладки банков генетического материала от трансгенных особей с целью быстрого наращивания (при необходимости, например в случае военных действий) ресурсов животных — потенциальных доноров. Должен быть выявлен оптимальный возраст свиней для получения от них каждого типа биоматериалов, оптимизированы способы хранения, криоконсервации и подготовки таких биоматериалов без последующей потери их свойств. К обязательным относятся исследования по иммуносупрессии с целью увеличения периода функционирования трансплантантов, по разработке требований биобезопасности в отношении ксеногенных материалов, получаемых от GAL-КО свиней, и др.

Принимая во внимание значение проблемы ксенотрансплантации и потенциальные преимущества GAL-КО свиней при ее решении, мы запланировали проведение исследований по комплексной экспериментальной оценке линии трансгенных свиней, полученных в институте молекулярного животноводства и биотехнологии Университета Людвиг-Максимилиана, в качестве доноров различных типов биоматериалов.

Итак, межвидовая трансплантация имеет огромный потенциал для решения проблемы нехватки внутренних органов, тканей и клеток для пересадки человеку. В качестве доноров таких органов и тканей рассматривают генетически модифицированных свиней. Одним из способов предотвращения сверхострой реакции (HAR) отторжения такого пересаженного биоматериала может быть использование линий, у которых отсутствуют α -1,3-Gal эпитопы — основные ксеноантигены для приматов. Работы по таргетингу гена α -1,3-галактозилтрансферазы (*GGTA1*) в клетках свиней с помощью различных методов позволили получить жизнеспособных трансгенных особей с «выключенным» геном *GGTA1* (GAL-КО свиньи с нокаутом *GGTA1*). Кожа GAL-КО свиней в качестве первоначального покрытия обширных ожоговых ран может служить альтернативой аллогенной коже человека, при том что биоматериал от свиней дешевле, доступнее и потенциально способен дольше сохранять жизнеспособность. Проведенные модельные исследования на крысах показали достоверно более низкий уровень кальциноза трансплантированных сердечных клапанов от GAL-КО свиней по сравнению с интактными особями как в присутствии, так в отсутствие специфических антител к *GGTA1*, что позволяет предположить преимущество GAL-КО свиней в качестве нового источника биоматериала для создания биопротезов сердечных клапанов. Самым многообещающим направлением остается создание биотехнологии, позволяющей выращивать у свиней человеческие органы. Решение этих проблем, наряду с со-

вершенствованием медицинских технологий, требует дальнейших дополнительных модификаций животных-доноров. Необходимы исследования их генетики, биохимии, физиологии, иммунологии, репродуктивной биологии и т.д., разработка биотехнологий и зоотехнических регламентов, обеспечивающих эффективное поддержание и использование популяций трансгенных свиней для целей ксенотрансплантации.

¹*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства Россельхозакадемии,*
142132 Россия, Московской обл., Подольский р-н,
пос. Дубровицы,
e-mail: n_zinovieva@mail.ru, natavolkova@inbox.ru;

*Поступила в редакцию
15 января 2014 года*

²*Московский физико-технический институт,
Государственный университет,*
141700 Россия, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9,
e-mail: m83071@gmail.com, petersen.elena.v@gmail.com,
a.s.dukh@gmail.com, innatrusova@gmail.com;

³*Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und
Biotechnologie Genzentrum der LMU,*
Feodor-Lynen Str. 25, 81377 Munich, Germany,
e-mail: N.Klymiuk@gen.vetmed.uni-muenchen.de,
ewolf@lmb.uni-muenchen.de;

⁴*Institut für Tierzucht und Genetik, VMU,*
Veterinärplatz, A-1210, Vienna, Austria,
e-mail: gottfried.brem@agrobiogen.de

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2014, № 2, pp. 42-49

APPLICATION OF GAL-KO TRANSGENIC PIGS IN XENOTRANSPLANTATION: PROBLEMS AND PROSPECTS FOR THE FUTURE

*N.A. Zinovieva¹, A.V. Melerzanov², E.V. Petersen², N. Klymiuk³, N.A. Volkova¹,
A.S. Dukh², I.A. Trusova², E. Wolf³, G. Brem⁴*

¹*All-Russian Research Institute of Animal Husbandry, Russian Academy of Agricultural Sciences, pos. Dubrovitsy, Podolsk Region, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail n_zinovieva@mail.ru, natavolkova@inbox.ru;*

²*Moscow Institute of Physics and Technology, State University, 9, Institutskii per., Dolgoprudnyi, Moscow Province, 141700 Russia, e-mail m83071@gmail.com, petersen.elena.v@gmail.com, a.s.dukh@gmail.com, innatrusova@gmail.com;*

³*Institute of Molecular Animal Breeding and Biotechnology LMU, Feodor-Lynen Str. 25, 81377 Munich, Germany, e-mail N.Klymiuk@gen.vetmed.uni-muenchen.de, ewolf@lmb.uni-muenchen.de;*

⁴*Institute of Animal Breeding and Genetics, VMU, Veterinärplatz, A-1210, Vienna, Austria, e-mail gottfried.brem@agrobiogen.de*

Received January 15, 2014

doi: 10.15389/agrobiology.2014.2.42eng

Abstract

Xenotransplantation (cross-species transplantation) has a great potential to serve the needs for organs, tissues and cells for transplantation. In this review, the applications of genetically modified pigs as the donors of organs and tissues for clinical transplantation are discussed. The hyperacute rejection (HAR) process is shortly described. One of the ways to overcome HAR is the creation of pigs lacking alpha-1,3-galactosyltransferase (alpha-1,3-GalT) epitopes — the major xenoantigene in pig-to-primate organ xenotransplantation. The analysis of the efficiency of targeting the alpha-1,3-galactosyltransferase gene (*GGTA1*) in porcine cells by using different methods was performed: the targeting efficiency (the number of piglets carrying the knock-out of *GGTA1* born alive from the number of the cloned embryos transferred) is differed between laboratories and varied of 0.0 to 5.0 per cent. The different techniques used for the development of transgenic pigs lacking *GGTA1* (GAL-KO pigs) are shortly described. The possible applications of organs and tissues of GAL-KO pigs for xenotransplantation are overviewed. The advantages of using of the skin derived from GAL-KO pigs as a potential alternative for a temporary cover of burns comparing to the alloskin and skin derived from the normal (GAL-positive) pigs are shown. Uses of GAL-KO pigs as donors of heart valves are briefly reviewed. The research aims for the future are discussed.

Keywords: transgenic pigs, GAL-KO, xenotransplantation, organs and tissues donors, skin transplantation, heart valves of pigs.

REFERENCES

1. Shumakov V., Tonevitskii A. *Chelovek*, 1999, № 6.
2. Yang Y.G., Sykes M. Xenotransplantation: Current status and a perspective on the future. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, 7: 519-531.
3. Polejaeva I.A., Chen S.H., Vaught T.D., Page R.L., Mullins J., Ball S., Dai Y., Boone J., Walker S., Ayares D.L., Colman A., Campbell K.H. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407: 86-90.
4. Klymiuk N., Aigner B., Brem G., Wolf E. Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Mol. Reprod. Dev.*, 2010, 77(3): 209-221.
5. Denning C., Dickinson P., Burl S., Wylie D., Fletcher J., Clark A.J. Gene targeting in primary fetal fibroblasts from sheep and pig. *Cloning Stem Cells*, 2001, 3: 221-231.
6. Harrison S., Boquest A., Grupen C., Faast R., Guildolin A., Giannakis C., Crocker L., McIlfatrick S., Ashman R., Wengle J., Lyons I., Tolstoshev P., Cowan P., Robins A., O'Connell P., d'Apice A.J., Nottle M. An efficient method for producing alpha(1,3)-galactosyltransferase gene knockout pigs. *Cloning Stem Cells*, 2004, 6: 327-331.
7. Ramsoondar J., Machaty Z., Costa C., Williams B.L., Fodor W.L., Bondioli K.R. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human alpha 1,2-fucosyltransferase. *Biol. Reprod.*, 2003, 69: 437-445.
8. Lai L., Kolber-Simonds D., Park K.W., Cheong H.T., Greenstein J.L., Im G.S., Samuel M., Bonk A., Rieke A., Day B.N., Murphy C.N., Carter D.B., Hawley R.J., Prather R.S. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295(5557): 1089-1092.
9. Dai Y., Vaught T.D., Boone J., Chen S.H., Phelps C.J., Ball S., Monahan J.A., Jobst P.M., McCreath K.J., Lamborn A.E., Cowell-Lucero J.L., Wells K.D., Colman A., Polejaeva I.A., Ayares D.L. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.*, 2002, 20(3): 251-255.
10. Sharma A., Naziruddin B., Cui C., Martin M.J., Xu H., Wan H., Lei Y., Harrison C., Yin J., Okabe J., Mathews C., Stark A., Adams C.S., Houtz J., Wiseman B.S., Byrne G.W., Logan J.S. Pig cells that lack the gene for alpha 1-3 galactosyltransferase express low levels of the gal antigen. *Transplantation*, 2003, 75: 430-436.
11. Jin D.I., Lee S.H., Choi J.H., Lee J.S., Lee J.E., Park K.W., Seo J.S. Targeting efficiency of α -1,3-galactosyl transferase gene in pig fetal fibroblast cells. *Exp. Mol. Med.*, 2003, 35: 572-577.
12. Takahagi Y., Fujimura T., Miyagawa S., Nagashima H., Shigehisa T., Shirakura R., Murakami H. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase gene knockout pigs expressing both human decay-accelerating factor and N-acetylglucosaminyltransferase III. *Mol. Reprod. Dev.*, 2005, 71: 331-338.
13. Fujimura T, Takahagi Y, Shigehisa T, Nagashima H, Miyagawa S, Shirakura R, Murakami H. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase gene-deficient pigs by somatic cell nuclear transfer: a novel selection method for gal alpha 1,3-Gal antigen-deficient cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 2008, 75(9): 1372-1378.
14. Shimatsu Y., Yamada K., Horii W., Hirakata A., Sakamoto Y., Waki S., Sano J., Saitoh T., Sahara H., Shimizu A., Yazawa H., Sachs D.H., Nunoya T. Production of cloned NIBS (Nippon Institute for Biological Science) and α -1, 3-galactosyltransferase knockout MGH miniature pigs by somatic cell nuclear transfer using the NIBS breed as surrogates. *Xenotransplantation*, 2013, 20(3): 157-64.
15. Xin J., Yang H., Fan N., Zhao B., Ouyang Z., Liu Z., Zhao Y., Li X., Song J., Yang Y., Zou Q., Yan Q., Zeng Y., Lai L. Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs. *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e84250.
16. Phelps C.J., Koike C., Vaught T.D., Boone J., Wells K.D., Chen S.H., Ball S., Specht S.M., Polejaeva I.A., Monahan J.A., Jobst P.M., Sharma S.B., Lamborn A.E., Garst A.S., Moore M., Demetris A.J., Rudert W.A., Bottino R., Bertera S., Trucco M., Starzl T.E., Dai Y., Ayares D.L. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 2003, 299(5605): 411-414.
17. Kolber-Simonds D., Lai L., Watt S.R., Denaro M., Arn S., Augenstein M.L., Betthausen J., Carter D.B., Greenstein J.L., Hao Y., Im G.S., Liu Z., Mell G.D., Murphy C.N., Park K.W., Rieke A., Ryan D.J., Sachs D.H., Forsberg E.J., Prather R.S., Hawley R.J. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *PNAS USA*, 2004, 101(19): 7335-7340.
18. Nottle M.B., Beebe L.F., Harrison S.J., McIlfatrick S.M., Ashman R.J., O'Connell P.J., Salvaris E.J., Fiscaro N., Pommey S., Cowan P.J., d'Apice A.J. Production of homozygous alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer. *Xenotransplantation*, 2007, 14(4): 339-344.
19. Baehr A. (Re)producing transgenic pigs for xenotransplantation — selection of founder animals and establishment of breeding herds. Inaugural Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen

- Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. München, Germany, 2011.
20. Hauschild J., Petersen B., Santiago Y., Queisser A.-L., Carnwath J.W., Lucas-Hahn A., Zhang L., Meng X., Gregory P.D., Schwinzer R., Cost G.J., Niemann H. Efficient generation of a bi-allelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *PNAS USA*, 2011, 108(29): 12013-12017.
 21. Denner J., Tönjes R.R. Infection barriers to successful xenotransplantation focusing on porcine endogenous retroviruses. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2012, 25(2): 318-343.
 22. Luo Y., Lin L., Bolund L., Jensen T.G., Sørensen C.B. Genetically modified pigs for biomedical research. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2012, 35(4): 695-713.
 23. d'Apice A.J., Cowan P.J. Xenotransplantation: The next generation of engineered animals. *Transpl. Immunol.*, 2009, 21: 111-115.
 24. Weiss E.H., Lilienfeld B.G., Muller S., Muller E., Herbach N., Kealer B., Wanke R., Schwinzer R., Seebach J.D., Wolf E., Brem G. HLA-E/human beta2-microglobulin transgenic pigs: Protection against xenogeneic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity. *Transplantation*, 2009, 87: 35-43.
 25. Andreeva T.M. *Social'nye aspekty zdorov'ya naseleniya*, 2010, 4(16) (<http://vestnik.mednet.ru/content/view/234/30/lang.ru/>).
 26. Vandeput J., Nelissen M., Tanner J.C., Boswick J. A review of skin meshers. *Burns*, 1995, 21: 364-370.
 27. Lari A.R., Gang R.K. Expansion technique for skin grafts (Meek technique) in the treatment of severely burned patients. *Burns*, 2001, 27: 61-66.
 28. Orgill D.P. Excision and skin grafting of thermal burns. *N. Engl. J. Med.*, 2009, 360: 893-901.
 29. Sullivan T.P., Eaglstein W.H., Davis S.C., Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen.*, 2001, 9: 66-76.
 30. Harunari N., Zhu K.Q., Armendariz R.T. Deubner H., Muangman P., Carrougher G.G.J., Isik F.F., Gibran N.S., Engrav L.H. Histology of the thick scar on the female, red Duroc pig: final similarities to human hypertrophic scar. *Burns*, 2006, 32: 669-677.
 31. Schechter I. Prolonged retention of glutaraldehyde-treated skin allografts and xenografts: immunological and histological studies. *Ann. Surg.*, 1975, 182: 699-704.
 32. Galili U., Shohet S.B., Kobrin E., Stults C.L., Macher B.A. Man, apes, and old world monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263: 17755-17762.
 33. Galili U., Wang L., Latemple D.C., Radic M.Z. The natural anti-Gal antibody. *Subcell Biochem.*, 1999, 32: 79-106.
 34. Weiner J., Yamada K., Ishikawa Y., Moran S., Etter J., Shimizu A., Smith R.N., Sachs D.H. Prolonged survival of GalT-KO swine skin on baboons. *Xenotransplantation*, 2010, 17(2): 147-152.
 35. Hilfiker A., Ramm R., Goecke T., Haverich A. Heart valve transplantation: the urgent need for non-immunogenic porcine heart valve matrices. *Xenotransplantation*, 2013, 20(1): 56.
 36. Konakci K.Z., Bohle B., Blumer R., Hoetzenecker W., Roth G., Moser B., Boltz-Nitulescu G., Grolitzer M., Klepetko W., Wolner E., Ankersmit H.J. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2005, 35(1): 17-23.
 37. Kasimir M.T., Reider E., Seebacher G., Wolner E., Weigel G., Simon P. Presence and elimination of the xenoantigen gal(alpha1,3) gal in tissue-engineered heart valves. *Tissue Eng.*, 2005, 11(7-8): 1274-1280.
 38. Lila N., McGregor C.G., Carpentier S., Rancic J., Byrne G.W., Carpentier A. Gal knockout pig pericardium: new source of material for heart valve bioprostheses. *J. Heart Lung Transplant.*, 2010, 29(5): 538-543.
 39. Kobayashi T., Yamaguchi T., Hamanaka S., Kato-Itoh, M., Yamazaki Y., Ibata 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.
 40. Usui J., Kobayashi T., Yamaguchi T., Knisely S., Nishinakamura R., Nakauchi H. Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation. *Am. J. Pathol.*, 2012, 180(6): 2417-2426.
 41. Matsunari H., Nagashima H., Watanabe M., Umeyama K., Nakano K., Nagaya M., Kobayashi T., Yamaguchi T., Sumazaki R., Herzenberg L.A., Nakauchi H. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *PNAS USA*, 2013, 110 (12), 4557-4562.
 42. Nakano K., Watanabe M., Matsunari H., Matsuda T., Honda K., Maehara M., Kanai T., Hayashida G., Kobayashi M., Kuramoto M., Arai Y., Umeyama K., Fujishiro S.H., Mizukami Y., Nagaya M., Hanazono Y., Nagashima H. Generating porcine chimeras using inner cell mass cells and parthenogenetic preimplantation embryos. *PLoS ONE*, 2013, 8(4): e61900.
 43. Eckardt S., McLaughlin, K.J., Willenbring H. Mouse chimeras as a system to investigate development, cell and tissue function, disease mechanisms and organ regeneration. *Cell Cycle*, 2011, 10(13): 2091-2099.