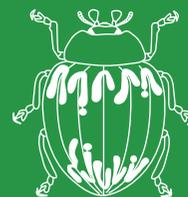




УСПЕХИ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ



СОДЕРЖАНИЕ

Том 144, номер 3, 2024

К 90-летию юбилею Ильи Артемьевича Захарова-Гезехуса <i>Редакционная коллегия</i>	247
Теория эволюционной роли наследуемых опухолей (<i>carcino-evo-devo</i>): история развития и современное состояние. Часть 1. От общих принципов к гипотезе и от гипотезы к концепции <i>А. П. Козлов</i>	249
Структура и морфогенетические свойства коллагеновых матриц, полученных из соединительнотканых оболочек паравerteбральных сухожилий <i>А. А. Гайдаш, А. И. Кулак, В. К. Крутько, М. И. Блинова, О. Н. Мусская, С. А. Александрова, К. В. Скроцкая, В. А. Кульчицкий</i>	265
Здоровье, экологический комфорт и благополучие человека. Часть 1. Инженерно-дизайнерские ресурсы биоиндустрии на пути к безопасной конкуренции с ресурсами природных биоценозов и систем здоровьесбережения <i>С. В. Сучков, Х. Абэ, Ш. Мёрфи, Д. Смит, В. С. Полякова, Д. Шерман, А. П. Глинушкин, П. Барах, А. О. Терентьев, М. Тан, А. Н. Суворов</i>	291
Здоровье, экологический комфорт и благополучие человека. Часть 2. Экологический комфорт – новый и стратегический фактор в охране здоровья современного человека <i>С. В. Сучков, Х. Абэ, Ш. Мёрфи, Д. Смит, В. С. Полякова, Д. Шерман, А. П. Глинушкин, П. Барах, А. О. Терентьев, М. Тан, А. Н. Суворов</i>	314
Расселение и акклиматизация пятнистого оленя в Российской Федерации <i>А. П. Каледин, Д. В. Жуков, С. В. Бекетов, В. И. Фертников, А. В. Смуров, В. М. Макеева</i>	335
Изменение содержания микроРНК775а и ее роль в посттранскрипционной регуляции генов-мишеней в листьях кукурузы при гипоксии <i>Д. Н. Федорин, А. Е. Хомутова, А. Т. Епринцев</i>	354

Contents

Vol. 144, No. 3, 2024

To the 90th Anniversary of Ilya Artemyevich Zakharov-Gezekhus <i>Editorial Board</i>	247
A Theory of the Evolutionary Role of Hereditary Tumors (<i>carcino-evo-devo</i>): the History and the Current State. Part 1. From General Principles to Hypothesis, and from Hypothesis to New Concept <i>A. P. Kozlov</i>	249
Structure and Morphogenetic Properties of Collagen Matrixes Obtained from Connective Tissue Sheaths of Paravertebral Tendons <i>A. A. Gaidash, A. I. Kulak, V. K. Krut'ko, M. I. Blinova, O. N. Musskaya, S. A. Aleksandrova, K. V. Skrotskaya, V. A. Kulchitsky</i>	265
Human Health, Environmental Comfort and Well-Being. Part 1. Engineering and Design Resources of the Bioindustry on the Way to Safe Competition with the Resources of Natural Biocenoses and Health-Saving Systems <i>S. V. Suchkov, H. Abe, S. Murphy, D. Smith, V. S. Polyakova, D. Scherman, A. P. Glinushkin, P. Barach, A. O. Terentyev, M. Tan, A. N. Suvorov</i>	291
Human Health, Environmental Comfort and Well-Being. Part 2. Ecological Comfort is a New and Strategic Factor in the Protection of Modern Human Health <i>S. V. Suchkov, H. Abe, S. Murphy, D. Smith, V. S. Polyakova, D. Scherman, A. P. Glinushkin, P. Barach, A. O. Terentyev, M. Tan, A. N. Suvorov</i>	314
Settlement and Acclimatization of Sika Deer in the Russian Federation <i>A. P. Kaledin, D. V. Zhukov, S. V. Beketov, V. I. Fertikov, A. V. Smurov, V. M. Makeeva</i>	335
Changes in the Content of microRNA775a and its Role in Post-Transcriptional Regulation of Targeted Genes in Corn Leaves under Hypoxia <i>D. N. Fedorin, A. E. Khomutova, A. T. Eprintsev</i>	354

К ЮБИЛЕЮ ИЛЬИ АРТЕМЬЕВИЧА ЗАХАРОВА (ЗАХАРОВА-ГЕЗЕХУСА)



18 июня исполняется 90 лет известному российскому генетику, заслуженному деятелю науки Российской Федерации, члену-корреспонденту РАН Илье Артемьевичу Захарову. Для всего коллектива журнала “Успехи общей биологии” — это особенное событие, так как в период с 2009 по 2021 г. И.А. Захаров был его главным редактором и по настоящее время является одним из самых активных членов редакционных коллегий двух старейших академических изданий, уже упомянутых “Успехов” и “Генетики”.

Илья Артемьевич Захаров (Захаров-Гезехус) родился в 1934 г. в Ленинграде. В 1957 г. окончил Ленинградский государственный университет и до 1964 г. работал на кафедре генетики и селекции ЛГУ, возглавляемой в то время М.Е. Лобашевым.

В 1965 г. при Ленинградском физико-техническом институте АН СССР (в настоящее время ПИЯФ РАН) по инициативе И.А. Захарова в Гатчине была образована лаборатория радиа-

ционной генетики, которую он возглавлял до 1987 г. После переезда в Москву начал работать в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, где заведовал лабораторией сравнительной генетики животных, а с 1992 г. — находился в должности заместителя директора института.

Основные научные труды И.А. Захарова посвящены изучению генетики микроорганизмов, мутационного процесса, цитоплазматической наследственности, популяционной биологии, истории генетики и философии науки.

В конце 1950-х гг. И.А. Захаров впервые в СССР применил генетические методы при изучении дрожжей. В опытах, проведенных на дрожжах рода *Saccharomyces* (1966–1967), им были выявлены температуро- и радиочувствительные мутанты и открыто явление цитодукции (1969) — автономной передачи цитоплазматических наследственных факторов, происходящей при половом процессе без слияния ядер.

С середины 1970-х гг. И.А. Захаров приступает к изучению генетики жуков-кокцид. В частности, исследует геногеографию популяций божьих коровок Европы и Сибири. В ходе этой работы он устанавливает географические закономерности распространения меланизма у кокцид и распространения в их популяциях паразитических бактерий. В последующем им были изучены эффекты внутриклеточных, цитоплазматически наследуемых бактерий жуков-кокцид, которые вызывают гибель зародышей мужского пола в потомстве зараженных матерей, проанализированы популяционно-генетические аспекты явления бессамцовости и открыты две новые бактерии, влияющие на соотношение полов у *Adalia bipunctata* (1998–1999).

По инициативе и при участии И.А. Захарова организовано изучение митохондриальных генофондов народов Центральной Азии, по результатам которого была выдвинута и обоснована теория происхождения аборигенов Америки из Алтае-Саянского региона (1998–2003), а непосредственно в ИОГен РАН им были развернуты долгосрочные исследования генетических ресурсов сельскохозяйственных животных с применением современных методов анализа ДНК-полиморфизма.

Всего под руководством И.А. Захарова защищено 30 кандидатских и 3 докторские диссертации, он заслуженно является руководителем одной из ведущих генетических научных школ России.

При этом несмотря на занятость И.А. Захаров всегда находил время на образовательную и просветительскую деятельность. В 1959 г. Илья Артемьевич начал читать университетский курс и вести практикум по генетике микроорганизмов. Лекции в ЛГУ И.А. Захаров продолжал читать вплоть до 1986 г. За это время были выпущены два его учебника (1967 и 1978 гг.), а также ряд методических пособий. В дальнейшем, уже

работая в Москве, Илья Артемьевич стал профессором кафедры генетики и селекции МГУ им. М.В. Ломоносова, выезжал с лекциями в другие университеты страны, проводил активную научно-общественную и организационную работу. В 1971–1986 гг. являлся председателем Ленинградского отделения Всероссийского общества генетиков и селекционеров (ВОГИС), в 1976–1977 гг. — вице-президентом ВОГИС, был заместителем председателя Научного совета по проблемам генетики и селекции РАН и заместителем главы Комиссии по разработке и сохранению научного наследия академика Н.И. Вавилова РАН. В 1992–2000 гг. И.А. Захаров — член Бюро научного совета государственной научно-технической программы “Приоритетные направления генетики” Министерства науки РФ, где курировал реализацию программы по разделу общей генетики. В 1994–1996 гг. он стал стипендиатом Государственной стипендии для выдающихся ученых, а в 1997–1999 гг. — Государственной научной стипендии.

И.А. Захаров — лауреат нескольких научных премий: им. Д.К. Заболотного Украинской академии наук (1990), им. проф. В.С. Кирпичникова ВОГИС (2000), премии МАИК-Наука, а также двух конкурсов научно-популярных статей РФФИ.

И.А. Захаров является автором 11 книг и около 200 научных статей.

Остается добавить, что Илья Артемьевич остается неизменно преданным науке и продолжает плодотворно трудиться в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, а его многочисленных учеников можно встретить в самых разных уголках России и в других странах.

От всей души поздравляем Илью Артемьевича Захарова с днем рождения, юбилеем и замечательной датой! Многая лета!

Редакционная коллегия

УДК 616-006-056

ТЕОРИЯ ЭВОЛЮЦИОННОЙ РОЛИ НАСЛЕДУЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ (CARCINO-EVO-DEVO): ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ. ЧАСТЬ 1. ОТ ОБЩИХ ПРИНЦИПОВ К ГИПОТЕЗЕ И ОТ ГИПОТЕЗЫ К КОНЦЕПЦИИ

© 2024 г. А. П. Козлов^{1, 2, 3, *}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

²Биомедицинский центр, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: contact@biomed.spb.ru

Поступила в редакцию 20.02.2024 г.

После доработки 20.02.2024 г.

Принята в печать 22.03.2024 г.

Теорию эволюционной роли наследуемых опухолей, или теорию *carcino-evo-devo*, можно считать следующим шагом в развитии теории филэмбриогенезов А.Н. Северцова, теории *evo-devo* и теории эволюции путем дубликации генов Сусуму Оно. Она претендует на роль объединяющей биологической теории, поскольку объединяет в рамках единого рассмотрения три основных вида биологического развития — индивидуальное, эволюционное и опухолевое развитие. Теория *carcino-evo-devo* объясняет целый ряд необъясненных биологических явлений, в первую очередь механизмы прогрессивной эволюции и увеличения сложности, с привлечением представлений об относительно нестабильных переходных формах и автономных нерегулируемых процессах. Теория эволюционной роли наследуемых опухолей сформулировала целый ряд нетривиальных предсказаний в различных областях биологии, которые были подтверждены в лаборатории автора и в других лабораториях. Выводы и следствия теории *carcino-evo-devo* имеют значение для биотехнологии и медицины. В первой части статьи рассматриваются исходные принципы, которые привели к возникновению концепции эволюционной роли наследуемых опухолей, поступательное развитие этой концепции и первые экспериментальные данные по подтверждению нетривиальных предсказаний, полученные в лаборатории автора в период до 2014 г., когда вышла в свет наша книга “Evolution by Tumor Neofunctionalization”.

Ключевые слова: генная конкуренция, эволюция генома, эволюционная роль опухолей

DOI: 10.31857/S0042132424030013, **EDN:** PSFNGP

“...Теория преследует две цели:

1. Охватить по возможности все явления в их взаимосвязи (полнота).
2. Добиваться этого, взяв за основу как можно меньше логически взаимосвязанных логических понятий и произвольно установленных соотношений между ними (основных законов и аксиом). Эту цель я буду называть “логической единственностью”.

Эйнштейн А. Физика и реальность. М., 1965. С. 264.

ВВЕДЕНИЕ

В статье рассматривается история развития концепции эволюционной роли наследуемых опухолей, которая привела к возникновению на ее основе новой биологической теории *carcino-evo-devo*.

Теория *carcino-evo-devo* предлагает механизм увеличения сложности в процессе прогрессивной эволюции — неофункционализацию наследуемых опухолей в результате экспрессии эволюционно новых генов и сочетаний генов; развивает представления об относительно нестабильных

переходных формах в эволюции — организмах-опухоленосителях; рассматривает наследуемые опухоли как поисковики в пространстве биологических возможностей. Она находится в комплементарных отношениях с существующими биологическими теориями, объясняя целый ряд необъясненных биологических феноменов и формулируя нетривиальные предсказания в нескольких областях биологии.

Учение об эволюционно новых опухолеподобных органах, являющееся составной частью теории *carcino-evo-devo*, позволяет объяснить целый ряд медицинских проблем, в частности проблему ожирения, намечая радикальный переворот в этой области медицины.

Новый класс генов *TSEEN* (*tumor specifically expressed, evolutionarily new*), открытый в соответствии с предсказанием теории *carcino-evo-devo*, может использоваться в биотехнологических целях для создания противоопухолевой реagenтики.

Работа над теорией *carcino-evo-devo* охватывает длительное время, что не удивительно для новой эволюционной теории. С определенной долей условности можно выделить два периода — до и после выхода в свет монографии “*Evolution by Tumor Neofunctionalization*” (Kozlov, 2014), которая обозначила переход концепции в теорию.

В период, предшествовавший выходу книги, можно выделить следующие основные направления работы: 1) работа над исходными принципами и формулировка основной гипотезы; 2) разработка более широкой концепции эволюционной роли наследуемых опухолей; 3) накопление и анализ биологических свидетельств в пользу эволюционной роли наследуемых опухолей; 4) экспериментальное подтверждение нетривиальных предсказаний концепции. Статьи, посвященные принципу генной конкуренции и другим исходным принципам, были опубликованы в 1976–1983 гг. (Козлов, 1976, 1983; Kozlov, 1979). Гипотеза эволюционной роли опухолей была впервые сформулирована в 1979 г. (Kozlov, 1979). Первый анализ биологических примеров в поддержку эволюционной роли опухолей был опубликован в 1987 г. (Козлов, 1987). Собственные экспериментальные данные в поддержку нетривиальных предсказаний теории впервые опубликованы в 1989 г. (Евтушенко и др., 1989). Работы по каждому из перечисленных направлений продолжаются до сих пор.

Ниже мы рассмотрим историю развития теории *carcino-evo-devo* в период с 1976 по 2014 г. более подробно.

ИСХОДНЫЕ ПРИНЦИПЫ И ОСНОВНАЯ ГИПОТЕЗА

Основной гипотезой теории *carcino-evo-devo* является гипотеза положительной эволюционной роли наследуемых опухолей, которая вытекает из более общих принципов. Формирование основной гипотезы напоминает подход, который осуществляется в физике.

Более общими принципами, из которых вытекает основная гипотеза, являются принцип генной конкуренции (Козлов, 1976; Weismann, 1893; Waddington, 1948; Spiegelman, 1948; Kozlov, 1979), принцип увеличения числа генов в геномах эволюционирующих организмов в прогрессивной эволюции, или принцип эволюции генетической информации (Козлов, 1976; Kozlov, 1979), и принципы многоуровневого развития организмов (Козлов, 1983; Kozlov, 1979).

В наших статьях 1976 и 1979 гг. принцип генной конкуренции обсуждался впервые после длительного периода молчания на эту тему в литературе.

В статье “Регуляторные механизмы как выражение и результат эволюции конкурентных отношений между генами” (Козлов, 1976) мы рассматривали генную конкуренцию как общий принцип взаимодействия генов. Под генной конкуренцией мы понимали отношения борьбы, определяющиеся общностью ресурсов, в которые вступают гены через посредство своих продуктов (Козлов, 1976).

В нашей статье 1979 г. было дано развернутое определение принципа генной конкуренции:

“I would like to suggest considering gene competition, or genes’ struggle for the realization of their genetic information, as a general principle of the functioning of the genome. It could be formulated as follows: at different levels of realization of genetic information genes (*via* gene products) come into relations of struggle, which result from community of their aims and resources and the consequence of which is mutual restriction of the synthetic capacities of the genes, mutual restriction of the functional abilities of enzymes, which have been already synthesized” (Kozlov, 1979, pp. 4–5).

В статье (Козлов, 1983) приводится следующая формулировка принципа генной конкуренции:

“На различных этапах реализации закодированной генетической информации гены (через генные продукты) вступают в отношения борьбы, которая вытекает из общности их целей и ресурсов и следствием которой является

взаимное ограничение синтетических способностей генов, взаимное ограничение функциональных возможностей уже синтезированных ферментов”.

К этой формулировке в статье (Козлов, 1988) была добавлена фраза “Крайним проявлением конкуренции между генами являются антагонистические отношения, или несовместимость между генами, при которой наблюдается инактивация гена или полное ингибирование фермента”.

В статье (Kozlov, 1996, p. 82) дается следующая формулировка принципа геновой конкуренции: “At different levels of the expression of genetic information genes (via gene products) enter the struggle for common resources and space, the consequence of which is mutual reduction of their activity (Kozlov, 1979). The increase in the gene number during genome evolution leads to the intensification of the gene competition and to the appearance in some cases of incompatibility between the genes (Kozlov, 1979)”.

Принцип геновой конкуренции основывался на теоретических соображениях и на анализе большого объема экспериментальных данных (Козлов, 1976; Kozlov, 1979). В нашей статье, в которой рассматривались законы молекулярной биологии, мы отнесли геновую конкуренцию к фундаментальным молекулярно-биологическим законам (Козлов, 1988). За прошедшее с тех пор время объем данных о конкурентных отношениях между генами значительно возрос, что подтверждает фундаментальный характер принципа геновой конкуренции (Sabi, Tuller, 2019; Wei et al., 2019; Hardison, 2022; Topfer et al., 2022; Goetz et al., 2022).

Принцип эволюции геномов был сформулирован нами следующим образом:

“Прогрессивная эволюция сопровождается увеличением количества генов в геномах эволюционирующих форм” (Козлов, 1976), или “Progressive evolution is connected with an increase of the number of qualitatively different genes in the genomes of evolving organisms” (Kozlov, 1979). В статье (Козлов, 1983) принцип эволюции генетической информации был сформулирован так: “Прогрессивная эволюция связана с увеличением числа качественно отличающихся генов в геномах эволюционирующих организмов”.

Принцип эволюции геномов основывался на идеях С. Оно о происхождении эволюционно новых генов путем дупликации (Ohno, 1970), что подтверждается последующим развитием представлений об эволюции генома, механиз-

мах происхождения эволюционно новых генов и связи этих процессов с эволюцией сложности (Kozlov, 2014; Markov et al., 2019).

Увеличение числа генов в геномах эволюционирующих организмов, которое происходит в соответствии с принципом эволюции геномов, должно сопровождаться обострением конкурентных отношений между генами и появлением антагонистических отношений, или отношений несовместимости между генами. В статье (Козлов, 1976) был сделан вывод, что для обеспечения дальнейшей эволюции генома необходима нейтрализация антагонистических отношений между генами, которая может быть достигнута за счет пространственного либо временного разграничения продуктов генов, между которыми возникают антагонистические отношения, на клеточном и многоклеточном уровнях организации, в том числе за счет специализации клеток у многоклеточных. Источник дополнительных клеток, необходимых для специализации, еще не обсуждался.

В статье (Kozlov, 1979) был сделан следующий принципиальный шаг вперед – была впервые сформулирована гипотеза, что опухоли могли принимать участие в эволюции организмов как источник дополнительных клеток (основная гипотеза):

“Gene incompatibility may be neutralized by spatio-temporal disconnection of products of incompatible genes at cellular and multicellular levels. The larger cells and multicellular aggregates can be stabilized by the increased complexity of their structure, which is the consequence of the origin of new genes. Using the concept of feedback, one may describe the reciprocity between processes of evolution at different levels in the following way:



Where MML is macromolecular level of organization, CL is cellular level of organization, and MCL is multicellular level of organization.

The concept of feedback is used here in its general meaning, as discussed by Ashby (1956). Arrows in this diagram denote influences, which the processes of evolutionary development at one level exert on the processes of development at another level. These processes are of different quality, and the influences denoted by the arrows are indirect. That is, the formation of stable organisms of higher complexity may be due to a coincidence of otherwise relatively independent processes of development at different levels. For example, tumors could have formed new tissues and organs

if neoplastic development occurred simultaneously with the origin and expression of new genes in their cells. Organisms of higher complexity are then subjected to natural selection and population processes. The origin of new species established a new step in progressive biological evolution” (Kozlov, 1979, pp. 11—12).

ПОСТУПАТЕЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ КОНЦЕПЦИИ ВОЗМОЖНОЙ ЭВОЛЮЦИОННОЙ РОЛИ НАСЛЕДУЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ

В начале нашей работы над принципом генной конкуренции роль опухолей совершенно не просматривалась. В 1975 г., вскоре после защиты кандидатской диссертации, автор выступил с докладом о генной конкуренции на семинаре лаборатории биохимии НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова. Заведующий лабораторией, выдающийся отечественный биохимик профессор И.Ф. Сейц, задал вопрос, какое все это имеет отношение к онкологии? И ответ автора был: “Пока не знаю”. В статье (Козлов, 1976) эволюционной роли опухолей еще не было, но уже в статье (Kozlov, 1979) эволюционная роль опухолей естественным образом “вывалилась” из более общих принципов (см. выше). Это может быть интересным примером для историков науки.

В нашей следующей статье, посвященной принципам многоуровневого эволюционного развития организмов (Козлов, 1983), уже целый раздел был посвящен возможной эволюционной роли опухолей. Этот раздел так и назывался: “Возможная эволюционная роль опухолей”. Автор писал: “Рассмотрим более детально, как могли реализоваться эволюционные обратные связи, описываемые нашей теорией. В частности, рассмотрим механизмы возникновения новых тканей. Прежде всего должны возникнуть новые тканеспецифические гены (Ohno, 1970). После их возникновения новые гены должны экспрессировать закодированную в них генетическую информацию в таком количестве клеток, которое было бы достаточно для возникновения новой ткани (органа). Предсуществующие типы клеток имеют очень ограниченные возможности для экспрессии новых генов из-за высокого уровня генной конкуренции и несовместимости между генами. Согласно нашей теории, увеличение числа клеток в многоклеточном организме обеспечивало пространство для активации новых генов. Таким образом продукты новых генов пространственно разобщались с продуктами старых, и их несовместимость нейтрали-

зовывалась. Но невозможно представить, чтобы возникновение новых генов непосредственно вызывало адекватное увеличение числа клеток в многоклеточном организме. Даже если они потенциально адаптивно выгодны, наличие новых генов само по себе недостаточно для возникновения новых тканей. Новый ген в течение долгого времени может оставаться “молчащим” до тех пор, пока не появятся условия (главным образом, пространство) для его экспрессии. Увеличение числа клеток в многоклеточных организмах происходит за счет их пролиферации. В многоклеточных организмах имеет место множество пролиферативных процессов. Новые ткани могли образовываться, если новые гены активировались в клетках пролиферата. Какие именно пролиферативные процессы участвовали в формировании новых тканей? Как и в случае возникновения новых генов из экстракопий старых (Ohno, 1970), новые ткани должны возникать из избыточных клеточных масс, функционально не необходимых организму. Для того чтобы обеспечить активацию новых генов, генная конкуренция в этих клетках должна быть понижена. Требование уменьшения генной конкуренции означает, что старые гены должны быть неактивны или менее активны по сравнению с их активностью в предсуществующих типах клеток. Таким образом, для обеспечения активации новых генов клетки избыточной клеточной массы должны быть недифференцированными. Это находится в соответствии с требованием о том, чтобы они не были функционально необходимы организму.

Пролиферативный процесс, в результате которого образуются нефункциональные клетки, не может регулироваться и, следовательно, автономен. Автономный пролиферативный процесс, который поставляет недифференцированные (анапластические) клетки, приводит, как известно, к образованию опухоли. Таким образом, именно опухоли могли быть тем пролиферативным процессом, который снабжал эволюционирующие многоклеточные организмы клеточными массами для экспрессии новых генов.

После экспрессии новых генов клетки опухоли должны приобретать функцию в организме. После этого они с необходимостью должны терять свою прежнюю автономность” (Козлов, 1983, с. 57—58).

В нашей следующей работе (Козлов, 1987) было сделано еще несколько шагов вперед в развитии концепции позитивной эволюционной роли опухолей.

В этой работе впервые было сформулировано представление об эволюционной роли клеточных онкогенов и сделано предсказание о числе клеточных онкогенов, намного опередившее состояние науки на тот момент времени: “Эволюционной ролью клеточных онкогенов, или протоонкогенов, могло быть то, что они поддерживали в эволюционирующих популяциях организмов определенный, наследственно детерминированный уровень автономных пролиферативных процессов и способствовали экспрессии эволюционно новых генов в анапластических клетках избыточных клеточных масс. После возникновения новых типов клеток соответствующие онкогены должны были превратиться в типоспецифические регуляторы деления клеток. Отсюда, в частности, следует, что должно существовать около 200 различных протоонкогенов – по числу типов клеток, насчитывающихся у высших животных” (Козлов, 1987). Это предсказание было впоследствии нами доказано (Makashov et al., 2019). Напомним, что в 1987 г. было известно только 12 онкогенов, и считалось, что их может быть не больше 20.

В (Козлов, 1987) была приведена более точная формулировка основной гипотезы: “Итак, опухоли могут рассматриваться как проявление эволюционирующего организма или эволюционной тенденции к увеличению количества клеток в многоклеточных организмах (Kozlov, 1979). Опухоли могли давать начало новым типам клеток, если неопластическое развитие совпадало с экспрессией в этих клетках эволюционно новых генов, имеющих адаптивное значение. Имеется в виду, что эти гены возникли в ДНК зародышевых клеток предков, а не в клетках опухолей. До момента экспрессии эти гены могли быть “молчащими”. Таким образом, опухоли, хотя и редко, могли играть положительную эволюционную роль” (Козлов, 1987, с. 138–139).

Приведенная выше формулировка уже специально оговаривает, что эволюционно новые гены возникают в ДНК зародышевых клеток, а не в ДНК опухолевых клеток.

Кроме того, в работе (Козлов, 1987) были приведены первые факты и экспериментальные данные в поддержку основной гипотезы (см. ниже в разделе, посвященном накоплению и анализу материалов, свидетельствующих в пользу эволюционной роли наследуемых опухолей).

В резюме нашей следующей теоретической статьи, которая называлась “Gene competition and the possible evolutionary role of tumors” (Koz-

lov, 1996), была приведена развернутая формулировка концепции эволюционной роли опухолей:

“The evolutionary role of tumors might consist of providing the conditions for the expression of evolutionarily new genes and thus in providing material for the origin of new cell types. To approach this concept the principle of gene competition is essential. With an increase in gene number in the genomes of evolving multicellular organisms the enforcement of gene competition should take place. Therefore, the pre-existing cell types possess limited possibilities for the expression of evolutionarily new genes. Like evolutionarily new genes originated from extra copies (duplicates) of old genes, evolutionarily new cell types had to originate from extra cells which were not functionally necessary to the organism. Tumors could have supplied the evolving multicellular organisms with extra cells for the expression of originating evolutionarily new genes. Of course, on the basis of this proposal only tumors at the earlier stages of progression are considered to be meaningful, or some kind of tumor-like processes, but not the malignant tumors at late stages of progression. The evolutionarily new genes originate in the DNA of germ line cells but not in DNA of tumor cells. Until the moment of their expression in the tumor cells these genes could stay silent. After the expression of these genes, tumor cells should acquire the function in the organism, differentiate and lose their previous autonomy” (Kozlov, 1996, p. 81).

Этот текст содержит уточнение, что эволюционно значимыми являются опухоли на ранних стадиях прогрессии, но не злокачественные опухоли на поздних стадиях прогрессии.

В статье (Kozlov, 1996) эволюционная роль опухолей выводится из более общих принципов; приводится расширенный (по сравнению с (Козлов, 1987)) список свидетельств в поддержку этой гипотезы (см. обсуждение ниже); и впервые в ясном виде формулируется экспериментально проверяемое предсказание об экспрессии в опухолях эволюционно новых генов. Более того, в этой статье впервые обсуждается экспериментальная работа, которая уже проводилась в лаборатории автора в сотрудничестве с В.И. Евтушенко по экспериментальному подтверждению этого нетривиального предсказания (Евтушенко и др., 1989; Evtushenko et al., 1989; Kozlov et al., 1992) (более подробно см. ниже в разделе “Нетривиальные предсказания и их экспериментальное подтверждение”).

В статье “Опухоли и эволюция” (Козлов, 2008) мы впервые отошли от дедуктивного способа изложения концепции эволюционной роли

опухолей и использовали более традиционный для биологии подход, связанный с обобщением имеющегося биологического материала. В статье были рассмотрены данные в пользу возможной эволюционной роли опухолей: распространенность опухолей среди многоклеточных организмов; активацию многих генов и способность к дифференцировке с потерей злокачественности; примеры патологических процессов и патогенов, играющих роль в эволюции, и примеры опухолевых процессов, уже сыгравших роль в эволюции. Лишь после этого была сформулирована гипотеза возможной положительной роли опухолей: “Мы полагаем, что опухоли могли быть полигоном (или резервуаром) экспрессии эволюционно новых и/или спящих генов, возникающих в процессе эволюции генома в клетках зародышевой плазмы (но не в клетках опухолей). В тех случаях, когда экспрессия эволюционно нового гена в клетках опухоли приводила к возникновению новой функции, одновременно возникали новые обратные связи и регуляция. Клетки опухоли дифференцировались, и возникал новый тип клеток для данного вида многоклеточных организмов, который наследовался благодаря эпигеномным механизмам, как и предсуществовавшие типы клеток” (Козлов, 2008, с. 700).

В статье впервые было указано на наследуемую природу опухолей, сыгравших роль в эволюции, и впервые была предложена диаграмма, описывающая концепцию возможной эволюционной роли опухолей.

В ней впервые были рассмотрены отдельные положения концепции возможной эволюционной роли опухолей вместе с биологическими примерами, рассмотренными в этой статье: “Популяции организмов-опухоленосителей, у которых опухоли были генетически или эпигенетически детерминированы, могли представлять переходные формы между видами организмов, находящихся на разных ступенях прогрессивной эволюции. Примером такого рода популяций могут быть гадрозавры, обсуждавшиеся выше.

В определенные периоды филогенеза дифференцировка опухолевых клеток в популяциях опухоленосителей должна была быть достаточно частым явлением, чтобы давать популяции организмов с новым типом клеток. Организмы с новым клеточным типом затем должны были подвергаться отбору на приспособленность и конкурентоспособность. Примером могут служить рыбы рода *Xiphophorus*.

Новые типы клеток могли принимать участие в образовании новых тканей и органов. Примером могут служить клубеньки у бобовых, которые иногда называют новыми органами. У различными видов обсуждавшихся выше гадрозавров встречаются необычные разрастания на голове, имеющие форму гребня и участвовавшие в издании различных звуков” (Козлов, 2008, с. 700).

Также впервые в статье появился целый раздел, посвященный результатам экспериментального подтверждения нетривиальных предсказаний концепции возможной эволюционной роли опухолей. Были подробно обсуждены наши первые результаты, подтверждающие экспрессию эволюционно новых генов в опухолях.

Суммируя рассмотрение этой статьи, можно сказать, что она явилась кратким прообразом нашей будущей монографии, опубликованной в 2014 г. (Kozlov, 2014).

В следующей статье (Kozlov, 2010) сохраняется структура предыдущей статьи, т.е. сначала рассматриваются данные в пользу возможной эволюционной роли опухолей, а затем формулируются теоретические положения концепции. В разделе “The origin of cell types by means of expression of evolutionarily new genes in tumors or evolution by tumor cell differentiation”, наша концепция впервые получила название “эволюция путем дифференцировки опухолевых клеток”. Впервые приводится перечень типов опухолей, которые могли бы играть роль в эволюции: “Genetically or epigenetically predetermined tumors at the early stages of progression, benign tumors, and some tumor-like processes in invertebrates and plants, all of which are modes of excess cell growth which provide evolving multicellular organisms with extra cell masses, are considered as potentially evolutionarily meaningful. Malignant tumors at the late stages of progression, however, are not” (Kozlov, 2010, p. 180). Впервые формулируются “сильные” и более “слабые” нетривиальные предсказания (см. более подробное обсуждение ниже), а также впервые обсуждаются результаты альтернативного подхода к изучению эволюционно новых генов, экспрессирующихся в опухолях (см. ниже раздел “Экспериментальное подтверждение нетривиальных предсказаний”). Впервые добавлен раздел “Other evidence in support of the hypothesis of evolution by tumor cell differentiation”, в котором, в частности, обсуждается положительный отбор некоторых генов, связанных с опухолями. Впервые сделано важное заключение о генах, которые могут работать в опухолях: “So, in tumors, three kinds of sequenc-

es/genes are expressed: neutrally evolving sequences without function, positively selected evolutionarily new genes with recently originated and evolving functions, and older genes with established functions, which are negatively selected. From the point of view of the hypothesis under consideration, tumors are instrumental in the expression of non-functional neutrally evolving sequences and weakly functional (evolutionarily new) genes. After stronger function has evolved because of positive selection, tumor cells become differentiated and regulated, with the loss of autonomy” (Kozlov, 2010, p. 183).

В заключение автор пишет: “The theory of the positive evolutionary role of tumors as a new scientific paradigm may considerably expand our understanding of the nature of tumors and of possibilities for influencing tumor processes”, таким образом намечая переход от концепции к теории.

В работе (Козлов, 2011) были впервые рассмотрены механизмы эпигенетического наследования возникающего эволюционно нового типа клеток. Наследование эволюционно нового типа клеток – необходимое условие для того, чтобы опухоли могли играть эволюционную роль. Это вопрос, имеющий принципиальное значение для будущей теории.

Итак, основная гипотеза все время развивалась в рамках более широкой концепции. Концепция позитивной эволюционной роли опухолей развивалась в серии публикаций (Козлов 1983, 1987, 2008, 2011; Kozlov, 1979, 1996, 2010). В каждой публикации делался очередной шаг в развитии концепции. Сначала она формировалась как следствие некоторых общих принципов, затем – в контексте накапливавшихся данных в пользу возможной эволюционной роли опухолей и экспериментальных результатов по подтверждению нетривиальных предсказаний основной гипотезы, полученных в лаборатории автора.

НАКОПЛЕНИЕ И АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ, СВИДЕТЕЛЬСТВУЮЩИХ В ПОЛЬЗУ ПОЗИТИВНОЙ ЭВОЛЮЦИОННОЙ РОЛИ НАСЛЕДУЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ

Традиционным подходом в биологии всегда было формулирование обобщений на основе изучения большого числа биологических примеров. В нашей работе мы также использовали этот подход, который привел к представлениям, сходным с полученными при использова-

нии подхода, основывавшегося на более общих принципах.

Первые факты и экспериментальные данные в поддержку гипотезы эволюционной роли опухолей были приведены в работе (Козлов, 1987). К ним мы отнесли широкую распространенность опухолей и опухолеподобных процессов у многоклеточных организмов, в том числе у беспозвоночных и растений; тканеспецифичность экспрессии и эволюционный консерватизм клеточных онкогенов у позвоночных, наличие похожих протоонкогенов у беспозвоночных; способность опухолевых клеток к дифференцировке, в том числе в новых направлениях; активацию в опухолевых клетках большого числа генов, не работающих в гомологичных нормальных клетках; примеры процессов, патологичных для индивидуальных организмов, но имеющих положительное эволюционное значение. К таким процессам мы отнесли мутационный процесс и вирусы, переносящие гены между различными группами организмов. Здесь и ниже мы не цитируем соответствующие ссылки, которые могут быть найдены в наших оригинальных статьях.

Похожую классификацию групп данных, поддерживающих возможную положительную эволюционную роль опухолей, мы сохранили в последующих статьях, хотя объем данных увеличивался, а число и наименование разделов несколько изменялось.

В статье (Kozlov, 1996) приводится расширенный (по сравнению с (Козлов, 1987)) список свидетельств в поддержку основной гипотезы. Впервые было упомянуто о способности опухолей участвовать в морфогенетических процессах. В добавок к упомянутым выше примерам патологий, имеющим эволюционное значение, был приведен пример серповидноклеточной анемии: “Sickle cell trait provides some protection against *Plasmodium falciparum*, the parasite responsible for the most severe form of malaria”.

В этой статье сделан принципиально важный шаг вперед: впервые появился раздел, посвященный опухолям, уже сыгравшим роль в эволюции. В этом разделе приводится пример азотфиксирующих клубеньков бобовых растений, которые приобрели функцию в организме благодаря экспрессии эволюционно новых генов: “Thus, at least in legumes and *Parasponia* there is already evidence that the expression of evolutionarily new gene occurs in tumor-like nodules, which acquire new function in the organism” (Kozlov, 1996).

Статья “Опухоли и эволюция” (Козлов, 2008) включала следующие разделы, посвященные позитивной эволюционной роли наследуемых опухолей: распространенность опухолей среди многоклеточных организмов; активацию многих генов и способность к дифференцировке с потерей злокачественности; примеры патологических процессов и патогенов, играющих роль в эволюции, и примеры опухолевых процессов, сыгравших роль в эволюции. Эти разделы значительно увеличились в объеме по сравнению с предыдущими статьями – если раньше это были абзацы, то теперь – целые страницы текста. Увеличилось число ссылок и примеров. Так, число ссылок в разделе “Распространенность опухолей среди многоклеточных организмов” увеличилось с двух в (Козлов, 1987; Kozlov, 1996) до двадцати четырех в (Козлов, 2008). В разделе, посвященном активации новых генов в опухолях, впервые подробно обсуждались данные, полученные в сотрудничестве с В.И. Евтушенко и К.П. Хансоном методом молекулярной гибридизации. Согласно этим данным число генов, экспрессирующихся только в опухолях и ни в каких экспериментально доступных нормальных клетках, составляло от нескольких сотен до нескольких тысяч генов со средним размером 4.5 тыс. п.н. В более развернутой форме обсуждались примеры участия опухолей в морфогенетических процессах.

Интересный пример представляет парадокс эволюционной и патологической роли мутаций. В статье (Козлов, 1987) ему была посвящена одна строка, в (Kozlov, 1996) – один абзац, а в (Козлов, 2008) – три больших абзаца. Автор пишет: “Аналогичный парадокс может быть справедлив для опухолей. Опухоли можно представить как мутационный процесс на многоклеточном уровне. С одной стороны, опухолевые процессы приводят к различным злокачественным патологиям, вредным для и индивидуальных организмов. С другой стороны, опухолевые процессы поставляют избыточные клеточные массы, характеризующиеся высоким уровнем биосинтезов, и это может использоваться в прогрессивной эволюции организмов для возникновения новых клеточных типов” (Козлов, 2008, с. 698).

В разделе, посвященном опухолям, уже сыгравшим роль в эволюции, появилось два новых примера – макромеланофоры и “шапочки” у рыб.

У рыб рода *Xiphophorus* имеются макромеланофоры – гигатские меланоциты, локализованные по бокам тела. В нашей статье (Козлов, 2008) мы привели данные, согласно которым

макромеланофоры произошли из клеток меланомы, стабилизировавшихся в результате удачной комбинации онкогена *Xmrk*, гена опухолевого супрессора *R* и возникновения функции, связанной с геном *Mdl*.

Другим новым примером были “шапочки” золотых рыбок – доброкачественные папилломы, искусственно отобранные на декоративность с формированием нового органа – “шапочки” у львинноголовок.

Кроме того, в качестве контрпримера клубенькам бобовых, в статье был приведен пример истинных опухолей растений, вызываемых *Agrobacterium tumefaciens*. В случае корончатых галлов, индуцируемых *A. tumefaciens*, синтезируемые в них опиены используются только бактериями, т. е. имеет место паразитизм, вредный для растений. Интересно, что ризобии, вызывающие клубеньки, и *A. tumefaciens* принадлежат к одному роду *Rhizobium*.

В следующей статье (Kozlov, 2010) патологическая роль *A. tumefaciens* и молекулярные механизмы вызываемой этой бактерией патологии разбираются еще более подробно. В этой же статье более подробно и с новыми недавно опубликованными данными разбирается возможная эволюционная роль вирусов в переносе генетического материала между организмами и между экосистемами. В пример, касающийся макромеланофоров у рыб, была добавлена ссылка о роли полового отбора в возникновении признака spotted caudal.

В предыдущих статьях в качестве объяснения возможных механизмов наследования нового типа клеток делалась ссылка на аналогичные механизмы в предсуществующих типах клеток. В статье (Козлов, 2011) впервые более подробно рассматриваются *цис*- и *транс*-типы эпигенетической регуляции, краткосрочное (митотическое) и долгосрочное (мейотическое) сохранение активного или молчащего состояния гена, а также сохранение эпигенетических сигналов при мейозе, важное для наследования клеточных типов. Кроме того, в этой статье впервые в качестве примера был рассмотрен злокачественный папилломатоз, который у некоторых грызунов дал начало макроворсинкам, имеющим функциональное значение.

Следующей нашей публикацией по анализу биологических материалов, свидетельствующих в пользу позитивной эволюционной роли наследуемых опухолей, стала монография “Evolution by Tumor Neofunctionalization” (Kozlov, 2014).

Как можно видеть, результаты анализа биологических примеров начали публиковаться несколько позже первых работ по исходным принципам и теоретической концепции позитивной эволюционной роли опухолей, с 1987 г. (Козлов, 1987, 2008, 2011; Kozlov, 1996, 2010). Именно развитие новой концепции позволило увидеть в бесконечном разнообразии биологических данных примеры в пользу эволюционной роли наследуемых опухолей, которые раньше не замечали или интерпретировали иначе. Причем мы сразу опубликовали несколько групп таких примеров в (Козлов, 1987), после чего накопление биологических примеров происходило не быстро, в каждой из статей делался какой-то шаг в этом направлении. В результате к моменту начала написания книги в 2011 г. накопился значительный объем биологических данных, структурированных, как это было описано выше.

Наличие биологических данных, свидетельствовавших в пользу позитивной эволюционной роли наследуемых опухолей, помогло автору преодолеть психологический барьер, связанный с парадоксальностью основной гипотезы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ НЕТРИВИАЛЬНЫХ ПРЕДСКАЗАНИЙ

Следующим направлением работы в период “до книги” была работа по экспериментальному подтверждению нетривиальных предсказаний теории.

В этот период мы работали над тремя нетривиальными предсказаниями: 1) существуют гены, экспрессирующиеся только в опухолях и не экспрессирующиеся в нормальных тканях; 2) существуют эволюционно новые гены, которые экспрессируются в опухолях и не экспрессируются в нормальных тканях; 3) опухоли могут отбираться на новые функции в организме, и эволюционно молодые органы обладают признаками опухолей.

Эта работа существенным образом отличалась от традиционной работы биологов-экспериментаторов в раз и навсегда выбранном направлении, в котором вы со временем становитесь лучшим специалистом. Опыт такой работы также имеется у автора. В отличие от узкоспециализированной профессиональной работы экспериментальное подтверждение нетривиальных предсказаний теории отличалось тем, что теория формулировала предсказания в разных областях биологии, в которые нам приходилось вторгаться,

и иногда процесс освоения новой области занимал несколько лет.

ПОИСКИ ГЕНОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ ТОЛЬКО В ОПУХОЛЯХ

Эксперимент по насыщающей молекулярной гибридизации. Примером эксперимента, продолжавшегося около 10 лет, был эксперимент по определению верхнего предела величины экспрессии генома крысы (Евтушенко и др., 1989). Этот эксперимент был предпринят нами для того, чтобы доказать, что в опухолях экспрессируются гены, не работающие ни в одной из экспериментально доступных нормальных тканей (“слабое предсказание”).

Автор хочет высказать свое уважение памяти Дэвида Гиллеспи (David Gillespie, 1940–1993), классика метода молекулярной гибридизации, впервые осуществившего гибридизацию на фильтрах. У него автор освоил методологию насыщающей гибридизации, использовавшуюся в обсуждаемом эксперименте, во время своей стажировки в NCI/NIH (National Cancer Institute/National Institutes of Health) в 1978–1979 гг.

Мы использовали насыщающую молекулярную гибридизацию уникальной (неповторяющейся) ДНК, меченой радиоактивным йодом или радиоактивным фосфором, с суммарной ядерной РНК (яРНК). Препарат суммарной яРНК представлял собой смесь яРНК, выделенной из 12 органов крысы и из эмбрионов крысы на трех стадиях развития. Это было особенностью нашего подхода, который был применен впервые в мировой литературе и использовался нами в дальнейшем для получения генов, экспрессирующихся опухолеспецифически. Кроме того, нами использовались очень высокие концентрации РНК (до 80 мг/мл) и очень продолжительное время гибридизации (до 10 сут) при максимальной жесткости условий реакции и детекции гибридов. Согласно полученным нами данным суммарная экспрессия (со всеми соответствующими поправками, см. обсуждение в статье) составила 55% уникального генома (Евтушенко и др., 1989). По нашей оценке, а также по оценке независимых авторов (Lennon, Lehrach, 1991), это было самое большое значение экспрессии у высших организмов, описанное в литературе на тот период.

Этот эксперимент стал возможным благодаря высочайшему экспериментальному мастерству В.И. Евтушенко, ныне доктору биологических

наук, руководителю лаборатории Российского научного центра радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова.

Экспрессия 55% уникального генома соответствует экспрессии 2.2×10^5 различных транскриптов со средним размером 4500 нуклеотидов (Евтушенко и др., 1989). Современная оценка общего числа разных транскриптов у человека (total transcripts) методом RNA-seq в разных базах данных (Gencode, Ensemble, RefSeq, and CHES) дает значения 203835, 203903, 154484 и 323827 разных транскриптов, соответственно (Salzberg, 2018). То есть наша оценка верхнего предела величины экспрессии генома крысы была достаточно точной для своего времени.

Однако, при всей значимости этого результата, для нас он был лишь промежуточным для доказательства того, что в опухолях экспрессируются гены, не работающие ни в одной нормальной ткани многоклеточного организма.

Для этой цели мы использовали меченую пробу уникальной ДНК, рециркулированную после гибридизации с опухолевой РНК. Значения гибридизации рециркулированной пробы с опухолевой РНК были всегда на несколько процентов выше значений ее гибридизации с суммарным препаратом яРНК. Разница в значениях гибридизации соответствовала числу генов, экспрессирующихся только в опухолевых клетках. В наших экспериментах это число составляло от нескольких сотен до нескольких тысяч генов со средним размером 4500 п.н. (Козлов, 2008; Evtushenko et al., 1989; Kozlov et al., 1992).

В дальнейшем мы постоянно использовали вычитание суммарного значения экспрессии в нормальных тканях или сравнение с максимально возможным числом нормальных тканей (например, с последовательностями кДНК-библиотек из максимально доступного числа нормальных тканей) для поиска генов с опухолеспецифической экспрессией, или экспрессирующихся преимущественно в опухолях.

Работа с библиотеками кДНК *in silico*. К концу 1990-х гг. было получено большое число библиотек кДНК из нормальных и опухолевых тканей. По состоянию на сентябрь 2000 г., в базе данных Cancer Gene Anatomy Project Национального ракового института США (NCI, National Cancer Institute) содержалось 1.5 млн EST (expressed sequence tags), соответствовавших участкам экспрессирующихся генов. Были разработаны технологии работы с последовательностями EST (Vazmatzis et al., 1998), в том числе для поиска по-

следовательностей, экспрессирующихся в опухолях (Scheurle et al., 2000). При этом использовалось традиционное попарное сравнение норма–опухоль. Мы решили использовать эти технологии для глобального сравнения последовательностей кДНК всех библиотек, полученных из опухолей, с последовательностями кДНК всех библиотек, полученных из нормальных тканей. Это было повторением наших предыдущих экспериментов с суммарными препаратами РНК с использованием иного методического подхода.

В статье (Baranova et al., 2001) было сделано компьютерное вычитание всех описанных к этому времени последовательностей EST из библиотек кДНК нормальных тканей человека (1087 библиотек) из последовательностей EST кДНК библиотек опухолевых тканей человека (2681 библиотека). Было обнаружено несколько десятков кластеров EST (кластер EST приблизительно соответствует транскрипционной единице), сохранивших EST преимущественно из опухолей.

В этой работе ведущую роль сыграла Анча Баранова, в то время работавшая в ИОГен РАН им. Н.И. Вавилова и по совместительству в Биомедицинском центре (Санкт-Петербург).

В дальнейшем мы неоднократно повторяли глобальное вычитание суммарных EST из нормальных библиотек из суммарных EST опухолевых библиотек, используя модифицированное программное обеспечение и расширяя наборы нормальных библиотек (до 2304) и опухолевых библиотек (до 4564) (Galachyants, Kozlov, 2009). Соответственно росло число выявляемых опухолеспецифических кластеров EST.

В наших руках доля экспериментально подтвержденных за все время работы с библиотеками EST опухолеспецифически экспрессирующихся последовательностей составляла около 15% от всех проверенных последовательностей, полученных *in silico* (см. обзор в (Kozlov, 2014)).

Сходные результаты при экспериментальной проверке опухолеспецифичности экспрессии последовательностей, полученных *in silico* при работе с библиотеками кДНК, были получены другими авторами (Scheurle et al., 2000). В дальнейшем, с развитием геномных и транскриптомных технологий, для поиска опухолеспецифически экспрессирующихся генов мы использовали другие базы данных и другие компьютерные инструменты (Козлов и др., 2021).

Работа с панелями кДНК *in vitro*. Появление на рубеже веков коммерческих панелей кДНК из большого числа нормальных тканей человека

определило принципиально важный шаг в экспериментальном изучении опухолеспецифичности экспрессии тех или иных генов. Эта реагентика позволила перейти от попарного сравнения опухолевых и соответствующих им нормальных тканей к более основательному исключению экспрессии целевых генов в каких-то других нормальных тканях или в эмбриональных тканях.

В статье (Krukovskaja et al., 2005), с использованием кДНК 27 разных нормальных тканей и 8 разных опухолей, этим методом была показана экспрессия в опухолях шести последовательностей. Экспрессия двух из этих последовательностей (Hs.426704 и Hs.202247) экспериментально не была обнаружена ни в одной из 27 использованных нормальных тканей. Другие изучавшиеся в этой статье последовательности EST давали слабые сигналы также в некоторых нормальных тканях (Krukovskaja et al., 2005).

Работа с панелями кДНК была длительной и дорогой. Она заняла много лет и до сих пор используется нами для изучения опухолеспецифичности экспрессии генов. Общее число использованных в наших экспериментах кДНК из нормальных тканей достигало 37–38 типов, а опухолевых – более 20. В этой работе определяющую роль сыграла и продолжает играть сотрудница нашей лаборатории Лариса Круковская.

Описание опухолеспецифичности экспрессии гена *Brachyury*. С использованием вышеописанных подходов нами была впервые описана опухолеспецифичность экспрессии гена *Brachyury* человека (Круковская и др., 2008; Palena et al., 2007). Были получены данные об экспрессии *Brachyury* в 15 различных типах опухолей человека и об отсутствии экспрессии в подавляющем большинстве нормальных тканей. Очень незначительная экспрессия была обнаружена только в образцах тканей тонкого кишечника, яичках, CD19⁺-лимфоцитах и селезенке (возможно, из-за присутствия в ней В-лимфоцитов). Было также показано, что специфичные к белку *Brachyury* цитотоксические лимфоциты человека лизируют раковые клетки, экспрессирующие *Brachyury*. Вместе с данными других авторов об участии транскрипционного фактора *Brachyury* в формировании мезодермы, в эпителиально-мезенхимальном переходе и метастазировании, наши данные (Круковская и др., 2008; Palena et al., 2007) предопределили разработку и клинические испытания противоопухолевых вакцин на основе гена *Brachyury*. Более подробно это будет обсуждаться в третьей части настоящей работы.

Заключение по поиску генов, экспрессирующихся только в опухолях. Таким образом, в работах (Евтушенко и др., 1989; Козлов, 2008; Круковская и др., 2008; Evtushenko et al., 1989; Kozlov et al., 1992; Baranova et al., 2001; Krukovskaja et al., 2005; Palena et al., 2007; Galachyants, Kozlov, 2009) мы с использованием разных методов показали, что предсказанные основной гипотезой гены, экспрессирующиеся в опухолях и не экспрессирующиеся в экспериментально доступных нормальных тканях, действительно существуют. Это явилось подтверждением “слабого” предсказания.

ОПИСАНИЕ ПЕРВЫХ ЭВОЛЮЦИОННО НОВЫХ ГЕНОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ В ОПУХОЛЯХ

“Сильным” предсказанием основной гипотезы является предсказание о специфической или преимущественной экспрессии в опухолях эволюционно новых последовательностей/генов.

Очевидно, что для поиска эволюционно новых генов, экспрессирующихся в опухолях, необходимо либо сначала показать опухолеспецифичность экспрессии кандидатных генов, а затем их эволюционную новизну, либо сначала охарактеризовать эволюционно новые гены, а затем искать среди них экспрессирующиеся в опухолях и не экспрессирующиеся в нормальных тканях. В наших работах мы использовали оба подхода.

Впервые эволюционная новизна последовательностей, экспрессирующихся в опухолях, была описана в нашей статье (Kozlov et al., 2006).

В этой работе эволюционная новизна четырех последовательностей (GenBank: AA166653, AL040372, AI952931 и AI792557, все – некодирующие), экспрессировавшихся специфически или преимущественно в опухолях, изучалась методом Саузерн-гибридизации на так называемой эволюционной панели ДНК, а также сравнительно-геномными методами. Эволюционная панель содержала ДНК миноги, рыбы, лягушки, курицы, голубя, мыши, крысы, морской свинки, овцы, лошади и человека.

Я хорошо помню, как проявлялась первая рентгеновская пленка с результатами Саузерн-гибридизации. В ожидании мы с Л.Л. Круковской гадали, у каких организмов появится сигнал, и я сказал, что, учитывая роль рыб в эволюции позвоночных, даже в рыбах было бы хорошо. Каков же был наш восторг, когда для всех

генов, изучавшихся в этом опыте, сигнал появился только на дорожке, соответствовавшей ДНК человека! Это удивительное ощущение, когда теоретическое предсказание получает экспериментальное подтверждение...

В сравнительно-геномном анализе использовали секвенированные к тому времени геномы фугу, тетрадона, полосатого данио, лягушки, курицы, мыши, крысы, коровы, собаки, макаки и шимпанзе. Он показал присутствие родственных последовательностей только у приматов (93–99% гомологии) и некоторых млекопитающих (52–75% гомологии выровненных последовательностей).

Таким образом, данные, полученные в (Kozlov et al., 2006), свидетельствовали в пользу эволюционной новизны описанных ранее последовательностей с опухолеспецифической экспрессией.

В следующих статьях (Самусик и др., 2007, 2009; Samusik et al., 2011) было проанализировано большее число опухолеспецифических последовательностей, описанных нами ранее. В дополнение к сравнительно-геномному анализу был проведен анализ консервативности, основанный на сравнении скоростей нуклеотидных замен. Всего было проанализировано девять последовательностей, в том числе несколько белок-кодирующих. Было показано, что восемь из девяти последовательностей или эволюционно новые (три из них специфичны для приматов), или сравнительно молодые и эволюционируют нейтрально (Самусик и др., 2007, 2009; Samusik et al., 2011; Kozlov, 2014).

***ELFNI-ASI*: ген, экспрессирующийся преимущественно в опухолях, эволюционно новый.** В статьях (Самусик и др., 2007, 2009; Krukovskaja et al., 2005) была впервые описана экспрессирующаяся преимущественно в опухолях эволюционно новая последовательность Hs.633957. Более подробно эта последовательность была изучена в работах, где первым автором был Д. Полев, впоследствии защитивший на эту тему кандидатскую диссертацию (Полев и др., 2009, 2011; Polev et al., 2014). В работах Д. Полева с соавт. было доказано, что соответствующий локус, расположенный на 7-й хромосоме, является отдельным геном, имеющим собственный промотор и возможности для альтернативного сплайсинга. Ген возник *de novo* из интронной области гена *ELFNI* и поэтому получил название *ELFNI-ASI* – *ELFNI* антисенс РНК 1 (не кодирующая белок), которое было утверждено Комитетом

по номенклатуре генов человека (HUGO Gene Nomenclature Committee).

***PBOVI*: эволюционно новый ген с опухолеспецифической экспрессией.** Ген *PBOVI* привлек наше внимание в связи с тем, что в работе (Clamp et al., 2007) он был упомянут в числе генов человека, не имеющих ортологов в геномах мыши и собаки. Мы впервые описали его *de novo* происхождение у человека, его экспрессию в широком круге опухолей и отсутствие экспрессии в нормальных тканях (Круковская и др., 2010; Samusik et al., 2013). При этом сначала изучалась его эволюционная новизна, а затем была показана опухолеспецифичность его экспрессии, которая была предсказана нами на основании эволюционной новизны этого гена.

Описание эволюционной новизны целого класса генов, экспрессирующихся в опухолях, – генов, кодирующих раково-тестикулярные антигены. Как уже было известно к моменту начала нашей работы, гены раково-тестикулярных антигенов (СТА- или СТ-гены) экспрессируются в семенниках и в широком круге опухолей. Автора в течение некоторого времени занимал вопрос, может ли теория эволюционной роли опухолей объяснить феномен раково-тестикулярных антигенов. И решение пришло: поскольку эволюционно новые гены возникают в ДНК зародышевых клеток, и для этого в случае ретропозиции необходима экспрессия генов (см. обзор Kozlov, 2014), гены, кодирующие раково-тестикулярные антигены, должны быть эволюционно новыми, и поэтому экспрессируются в семенниках и опухолях. И действительно, в нашей работе (Dobrynin et al., 2013) мы впервые показали, что семейство генов, кодирующих раково-тестикулярные антигены, является относительно эволюционно новым.

Заключение по первым работам, посвященным поиску эволюционно новых генов, экспрессирующихся в опухолях. Таким образом, уже в наших первых работах по поиску эволюционно новых генов, экспрессирующихся в опухолях, мы обнаружили как отдельные гены (*ELFNI-ASI* и *PBOVI*), так и целый класс таких генов (СТ-генов). Мы использовали оба подхода, обозначенных выше, – изучение опухолеспецифичности экспрессии сначала, а эволюционной новизны потом, и, наоборот, изучение эволюционной новизны сначала, а опухолеспецифичности экспрессии потом. В наших руках второй подход в дальнейшем получил большее развитие (Круковская и др., 2016; Козлов и др., 2021). С его использованием нами впоследствии была полу-

чена и зарегистрирована база данных эволюционно новых генов, экспрессирующихся в опухолях (Козлов и др., 2021).

Гены *ELFN1-AS1* и *PBOV1* оказались одними из первых описанных в мировой литературе генов человека, возникших *de novo*, и сейчас активно изучаются и цитируются в мировой литературе (см. обзор в (Kozlov, 2022)).

Эволюционная новизна генов класса СТ (Cancer/Testis antigen genes) была подтверждена вскоре после выхода в свет нашей статьи в работе известных в области молекулярной эволюции авторов (Zhang, Long, 2014) со ссылкой на наш приоритет и стала достоянием науки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ “ШАПОЧЕК” ЗОЛОТЫХ РЫБОК

Следующим нетривиальным предсказанием, доказанным в период “до книги”, было предсказание того, что опухоли могут отбираться на новые функции в организме и что эволюционно молодые органы должны обладать признаками опухолей. Фактически, это два предсказания, изученные нами на модели “шапочек” золотых рыбок.

Как уже отмечалось выше, наша теория формулировала предсказания в разных областях биологии, в которые нам приходилось вторгаться, и иногда процесс освоения новой области занимал несколько лет. Выше уже приводился пример эксперимента по молекулярной гибридизации, продолжавшегося около 10 лет (Евтушенко и др., 1989). Эксперименты с “шапочками” золотых рыбок также продолжались несколько лет. Первая попытка, предпринятая в 1990-х гг., была неудачной. Эксперимент, проводившийся в 2009—2012 гг., оказался успешным. На первом этапе проводили макро- и микроскопические исследования уже сформировавшихся “шапочек” у львинноголовок и оранды (Шилов и др., 2009; Забежинский и др., 2010). На втором этапе изучали динамику развития “шапочек” (Козлов и др., 2012).

Взрослых рыбок и мальков золотых рыбок покупали у аквариумистов. Рыбок мы покупали на свои деньги, и я хорошо помню, что первая львинноголовка с большой “шапочкой” обошлась в половину “Жигулей”, что по тем временам было очень много.

Рабочей гипотезой эксперимента с “шапочками” золотых рыбок была гипотеза, что “шапочка” золотой рыбки является доброка-

чественной опухолью, прошедшей процесс искусственного отбора на красоту. Не все участники эксперимента в это верили. Так, выдающийся отечественный онколог, д.м.н. М.А. Забежинский был сначала настроен очень скептически. Но именно он получил данные, подтверждавшие эту гипотезу, и написал значительную часть текста статьи, опубликованной в 2012 г. (Козлов и др., 2012).

Рыбки находились под постоянным наблюдением. В ходе эксперимента периодически отбирали особей для гистологического исследования кожи головы. Большую роль в течение длительного времени в поддержании стада рыбок и обработке материалов исследования сыграли сотрудники Биомедицинского центра Б.В. Мурашев и Е.С. Шилов.

В результате в возрасте 6 месяцев “шапочки” были выявлены у 39% рыбок, а в возрасте 14 месяцев — у 60% рыбок. Гистологическое исследование “шапочек” на разных фазах их развития позволило сделать вывод, что изучавшееся разрастание кожи золотых рыбок представляет собой доброкачественную опухоль (Козлов и др., 2012).

Симметричная форма “шапочек”, расположение в определенном месте и появление на определенной стадии развития являются признаками нормального органа. Способность к неограниченному росту и данные гистологического анализа свидетельствуют об опухолевой природе “шапочек”.

Разновидности золотых рыбок, у которых развиваются “шапочки” (Oranda, Red cap Oranda, Lionhead, Ranchu), были искусственно отобраны селекционерами в течение последних нескольких сотен лет. То есть “шапочки” золотых рыбок являются самым молодым из описанных в литературе органов.

Таким образом, данные, полученные при изучении “шапочек” золотых рыбок, подтверждают предсказание о том, что эволюционно молодые органы должны обладать признаками опухолей.

“Шапочка” львинноголовок является примером искусственного отбора доброкачественной опухоли, которая приобрела функцию в организме (в данном случае — функцию красоты) и стала новым органом. Это первый пример такого рода, описанный в мировой литературе (Козлов и др., 2012).

Золотая рыбка с “шапочкой” была вынесена на обложку нашей монографии, опубликованной в 2014 г., и стала символом теории эволюционной роли наследуемых опухолей (рис. 1).

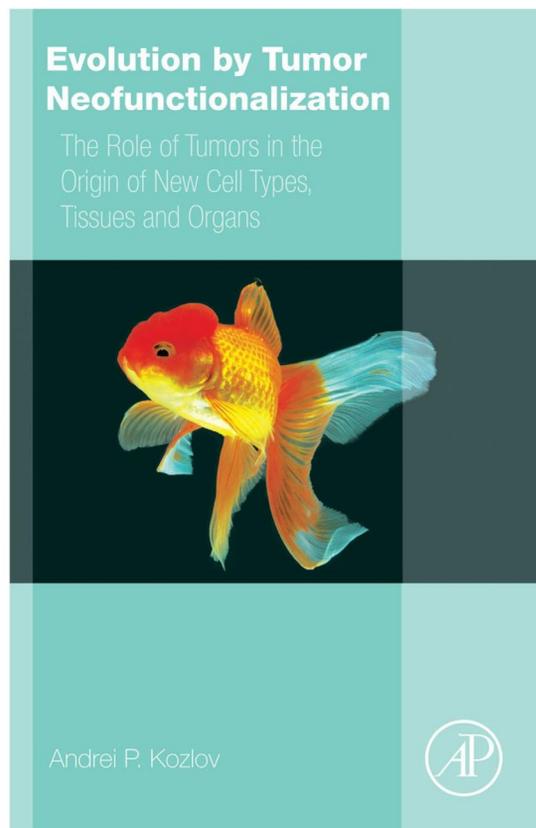


Рис. 1. Золотая рыбка с “шапочкой” на обложке монографии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, за период с 1976 по 2014 г., предшествовавший публикации книги “Evolution by Tumor Neofunctionalization”, была в основном сформирована концепция эволюционной роли наследуемых опухолей. Были определены фундаментальные исходные принципы, из которых вытекала основная гипотеза; были накоплены и проанализированы биологические примеры, свидетельствовавшие в пользу позитивной эволюционной роли наследуемых опухолей, и описаны первые примеры типов клеток, тканей и органов, произошедших из опухолей; были сформулированы и подтверждены экспериментально первые нетривиальные предсказания. Постоянно происходило накопление все новых и новых данных, концепция постепенно развивалась. Автор много выступал в различных аудиториях и в печати и получал многочисленные комментарии. В результате к 2011 г., когда началась работа над книгой, накопилась некая критическая масса материала, обуславливающая потребность в более глубоком обобщении.

Работа над книгой продолжалась три года. Монография “Evolution by Tumor Neofunctionalization”, опубликованная в 2014 г. в издательстве Elsevier/Academic Press (Kozlov, 2014), стала важным шагом в возникновении новой биологической теории *carcino-evo-devo*, и в значительной мере обусловила все ее дальнейшее развитие.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность эволюционной школе Санкт-Петербургского государственного университета, онкологической школе НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова, Национальному онкологическому институту, США (National Cancer Institute, National Institutes of Health, USA), Институту общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Санкт-Петербургскому Биомедицинскому центру и Санкт-Петербургскому политехническому университету Петра Великого.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования с участием человека или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Евтушенко В.И., Хансон К.П., Барабицкая О.В. и др.* Определение верхнего предела величины экспрессии генома // Мол. биол. 1989. Т. 23. С. 663–675.
- Забезинский М.А., Полев Д.Е., Шилов Е.С. и др.* Изучение развития “шапочек” на голове золотых рыбок // Рус. журн. “СПИД, рак и общественное здоровье”. 2010. Т. 14 (1). С. 21.
- Козлов А.П.* Регуляторные механизмы как выражение и результат эволюции конкурентных отношений между генами. Соленостные адаптации водных организмов. Л.: Наука, 1976. С. 237–245.
- Козлов А.П.* Принципы многоуровневого развития организмов. Проблемы анализа биологических систем. М.: МГУ, 1983. С. 48–62.
- Козлов А.П.* Генная конкуренция и возможная эволюционная роль опухолей и клеточных онкогенов. Теоретические и математические аспекты морфогенеза. М.: Наука, 1987. С. 136–140.
- Козлов А.П.* Принципы сохранения в системе молекулярно-биологических законов // Теоретическая биоло-

- гия: структурно-функциональный подход. Л.: ЛГУ, 1988. С. 4–21.
- Козлов А.П. Опухоли и эволюция // *Вопр. онкол.* 2008. Т. 54 (6). С. 695–705.
- Козлов А.П. Роль опухолей в эволюции многоклеточных организмов // *Биосфера.* 2011. Т. 3. С. 369–378.
- Козлов А.П., Забежинский М.А., Попович И.Г и др. Гиперпластические разрастания на коже головы золотых рыбок – сравнительно-онкологические аспекты // *Вопр. онкол.* 2012. Т. 58 (3). С. 387–393.
- Козлов А.П., Матюнина Е.А., Макашов А.А. База данных генов TSEEN Биомедицинского центра. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2021621840. Санкт-Петербург, 2021.
- Круковская Л.Л., Полев Д.Е., Носова Ю.К. и др. Изучение экспрессии транскрипционного фактора BRACHYURY (T) в нормальных и опухолевых тканях человека // *Вопр. онкол.* 2008. Т. 54 (6). С. 739–743.
- Круковская Л.Л., Самусик Н.Д., Шилов Е.С. и др. Опухольеспецифическая экспрессия эволюционно нового гена PBOV1 // *Вопр. онкол.* 2010. Т. 56 (3). С. 327–332.
- Круковская Л.Л., Полев Д.Е., Курбатова Т.В. и др. Изучение опухолюспецифичности экспрессии некоторых эволюционно новых генов // *Вопр. онкол.* 2016. Т. 62 (3). С. 495–500.
- Полев Д., Носова Ю., Круковская Л. и др. Экспрессия транскриптов, соответствующих кластеру HS.633957 в тканях и опухолях человека // *Мол. биол.* 2009. Т. 43 (1). С. 97–102.
- Полев Д.Е., Круковская Л.Л., Козлов А.П. Экспрессия локуса Hs.633957 в органах пищеварительной системы и опухолях человека // *Вопр. онкол.* 2011. Т. 57 (1). С. 48–49.
- Самусик Н.А., Галачьянц Ю.П., Козлов А.П. Сравнительно-геномный анализ опухолюспецифических транскрибируемых последовательностей человека // *Рус. журн. “СПИД, рак и общественное здоровье”.* 2007. Т. 10. С. 30–32.
- Самусик Н.А., Галачьянц Ю.П., Козлов А.П. Анализ эволюционной новизны последовательностей, экспрессирующихся в опухолях // *Экол. генетика.* 2009. Т. 7. С. 26–37.
- Шилов Е.С., Мурашев Б.В., Попович И.Г. и др. Возможная новая модель опухолей у рыб // *Рус. журн. “СПИД, рак и общественное здоровье”.* 2009. Т. 13 (2). С. 49–50.
- Ashby W.R. An introduction to cybernetics. London: Chapman & Hall, 1956. 295 p.
- Baranova A.V., Lobashev A.V., Ivanov D.V. et al. In silico screening for tumour-specific expressed sequences in human genome // *FEBS Lett.* 2001. V. 508. P. 143–148.
- Clamp M., Fry B., Kamal M. et al. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in human genome // *PNAS USA.* 2007. V. 104. P. 19428–19433.
- Dobrynin P., Matyunina E., Malov S., Kozlov A. The novelty of human cancer/testis antigen encoding genes in evolution // *Int. J. Genom.* 2013. V. 2013. № 105108.
- Evtushenko V.I., Barabitskaya O.V., Emeljanov A.V., Kozlov A.P. Estimation of the maximal expression of the rat genome and the complexity of tumor-specific transcripts // Abstracts of the First International Conference on Gene Regulation Oncogenesis, and AIDS. Loutráki, Greece, September 15–21, 1989.
- Galachyants Y., Kozlov A.P. CDD as a tool for discovery of specifically-expressed transcripts // *Russ. J. “AIDS, Cancer and Related Problems”.* 2009. V. 13 (2). P. 60–61.
- Goetz H., Stone A., Zhang R. et al. Double-edged role of resource competition in gene expression noise control // *Adv. Genet.* 2022. V. 3 (1). P. 2100050.
- Hardison R.C. Promoter competition in globin gene control // *Blood.* 2022. V. 139 (14). P. 2089–2091.
- Kozlov A.P. Evolution of living organisms as a multilevel process // *J. Theor. Biol.* 1979. V. 81 (1). P. 1–17.
- Kozlov A.P. Gene competition and the possible evolutionary role of tumors // *Med. Hypoth.* 1996. V. 46 (2). P. 81–84.
- Kozlov A.P. The possible evolutionary role of tumors in the origin of new cell types // *Med. Hypoth.* 2010. V. 74. P. 177–185.
- Kozlov A.P. Evolution by Tumor Neofunctionalization: The role of tumors in the origin of new cell types, tissues and organs. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Academic Press/Elsevier, 2014. 248 p.
- Kozlov A.P. The theory of carcino-evo-devo and its non-trivial predictions // *Genes.* 2022. V. 13 (1). P. 2347.
- Kozlov A.P., Emeljanov A.V., Barabitskaya O.V., Evtushenko V.I. The maximal expression of mammalian genome, the complexity of tumor-specific transcripts and the cloning of tumor-specific cDNAs // Abstract of Annual Meeting Sponsored by Laboratory of Tumor Cell Biology. Bethesda, Maryland: National Cancer Institute (U.S.), 1992.
- Kozlov A.P., Galachyants Y.P., Dukhovlinov I.V. et al. Evolutionarily new sequences expressed in tumors // *Infect. Agent Cancer.* 2006. V. 25. P. 1–8.
- Krukovskaja L.L., Baranova A., Tyezelova T. et al. Experimental study of human expressed sequences newly identified *in silico* as tumor specific // *Tumor Biol.* 2005. V. 26 (1). P. 17–24.
- Lennon G.G., Lehrach H. Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries // *Trends Genet.* 1991. V. 7. P. 314–317.
- Makashov A.A., Malov S.V., Kozlov A.P. Oncogenes, tumor suppressor and differentiation genes represent the oldest human gene classes and evolve concurrently // *Sci. Reports.* 2019. V. 9. № 16410.
- Markov A.V., Anisimov V.A., Korotayev A.V. Relationship between genome size and organismal complexity in the lineage leading from prokaryotes to mammals // *History & Mathematics: Big History Aspects.* Volgograd: ‘Uchitel’ Publishing House, 2019. P. 122–141.

- Ohno S. Evolution by gene duplication. New York, Berlin, Heidelberg, USA, Germany: Springer-Verlag, 1970. 175 p.
- Palena C., Tsang K.Y., Fernando R.I. et al. The human T-box mesodermal transcription factor *Brachyury* is a candidate target for T-cell-mediated cancer immunotherapy // Clin. Cancer Res. 2007. V. 13 (8). P. 2471–2478.
- Polev D.E., Karnaukhova I.K., Krukovskaya L.L., Kozlov A.P. *ELFN1-ASI*: a novel primate gene with possible microRNA function expressed predominantly in human tumors // BioMed. Res. Internat. 2014. V. 2014. № 398097.
- Sabi R., Tuller T. Modelling and measuring intracellular competition for finite resources during gene expression // J. R. Soc. Interface. 2019. V. 16. № 20180887.
- Salzberg S.L. Open questions: how many genes do we have? // BMC Biol. 2018. V. 16 (94).
- Samusik N., Galachyants Y., Kozlov A.P. Analysis of evolutionary novelty of tumor-specifically expressed sequences // Russ. J. Genet. Appl. Res. 2011. V. 1 (2). P. 138–148.
- Samusik N., Krukovskaya L., Meln I. et al. *PBOV1* is a human *de novo* gene with tumor-specific expression that is associated with a positive clinical outcome of cancer // PLoS One. 2013. V. 8 (2). P. e56162.
- Scheurle D., DeYoung M.P., Binniger D.V. et al. Cancer gene discovery using digital differential display // Cancer Res. 2000. V. 60 (15). P. 4037–4043.
- Spiegelman S. Differentiation is controlled production of unique enzymatic patterns // Symp. Soc. Exp. Biol. 1948. V. 2. P. 286–325.
- Topfer S.K., Feng R., Huang P. et al. Disrupting the adult globin promoter alleviates competition and reactivates fetal globin gene expression // Blood. 2022. V. 139 (14). P. 2107–2118.
- Vazmatzis G., Essand M., Brinkman U. et al. Discovery of three genes specifically expressed in human prostate by expressed sequence tag database analysis // PNAS USA. 1998. V. 95. P. 300–304.
- Waddington C.H. The genetic control of development // Symp. Soc. Exp. Biol. 1948. V. 2. P. 145–154.
- Weismann A. The germ plasm: a theory of heredity. New York: Charles Scribner's Sons, 1893. 517 p.
- Wei L., Yuan Y., Hu T. et al. Regulation by competition: a hidden layer of gene regulatory network // Quantitat. Biol. 2019. V. 7 (2). P. 110–121.
- Zhang Y.E., Long M. New genes contribute to genetic and phenotypic novelties in human evolution // Curr. Opin. Genet. Dev. 2014. V. 29. P. 90–96.

A Theory of the Evolutionary Role of Hereditary Tumors (*carcino-evo-devo*): the History and the Current State. Part 1. From General Principles to Hypothesis, and from Hypothesis to New Concept

A. P. Kozlov^{a, b, c, *}

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^bBiomedical Center, St. Petersburg, Russia

^cPeter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

*e-mail: contact@biomed.spb.ru

The theory of the evolutionary role of hereditary tumors, or *carcino-evo-devo* theory, may be considered as the next step after A.N. Severtsov theory of phylembryogenesis, the theory of *evo-devo*, and Susumu Ohno theory of evolution by gene duplication. The *carcino-evo-devo* theory pretends to be a unifying biological theory, because it unifies within an integrated consideration three main types of biological development – individual, evolutionary and neoplastic development. The *carcino-evo-devo* theory explains a series of unexplained biological phenomena. In the first place, it explains the mechanisms of progressive evolution and biological complexity increase using the concept of relatively unstable transitory forms and autonomous uncontrolled processes. The theory of the evolutionary role of hereditary tumors has formulated several non-trivial predictions in various fields of biology, which have been confirmed in the lab of the author and in other laboratories. The consequences of the *carcino-evo-devo* theory have implications in medicine and biotechnology. The first part of the article describes the basic principles from which the main hypothesis followed, the progressive developments of the concept, and the first experimental data in support of non-trivial predictions obtained in the laboratory of the author in the period before 2014, when our monograph “Evolution by Tumor Neofunctionalization” (Kozlov, 2014) has been published.

Keywords: gene competition, genome evolution, the evolutionary role of tumors

УДК 57.085

СТРУКТУРА И МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОЛЛАГЕНОВЫХ МАТРИЦ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ СОЕДИНИТЕЛЬНОВУСНЫХ ОБОЛОЧЕК ПАРАВЕРТЕБРАЛЬНЫХ СУХОЖИЛИЙ

© 2024 г. А. А. Гайдаш^{1,*}, А. И. Кулак¹, В. К. Крутько^{1,**}, М. И. Блинова²,
О. Н. Мусская¹, С. А. Александрова², К. В. Скроцкая³, В. А. Кульчицкий⁴

¹Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

²Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³Научно-исследовательский институт физико-химических проблем
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

⁴Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

*e-mail: algaidashspb@gmail.com, tsuber@igic.bas-net.by**

Поступила в редакцию 16.02.2024 г.

После доработки 04.03.2024 г.

Принята к публикации 05.03.2024 г.

Изучены морфогенетические свойства коллагенового геля, полученного ацетатной экстракцией из соединительнотканых оболочек (перитенонов) паравертебральных сухожилий крыс Вистар. Гель использовали в качестве подложки при культивировании *in vitro* совместно с мезенхимальными стромальными клетками в течение 14 сут в ростовой и остеогенной инкубационных средах. Установлено, что коллагеновый каркас перитеноновой подложки приобретает прочность за счет увеличения связности фибриллярных узлов и структурирован с формированием пластинчатых и клубковых образований. Сесамовидные глобулы, проникающие в подложку из исходного перитенонового геля, инертны в ходе культивирования в ростовой среде, а в остеогенной – проявляют повышенную способность к структурированию кальцийфосфатов. Формирование клеточно-опосредованных структур происходит по направлениям фибро-, тендо-, лигаменто- и остеогенной дифференцировки. Фиброгенное направление обеспечивает коллагеновым материалам структурирующийся каркас; теногенное – формирование сухожилий эмбрионального типа по механизму латеральной сборки коллагеновых субфибрилл на поверхностях клеток и их автономизацию в виде зачатков сухожильных нитей; лигаментогенное – структурирование коллагеновых лент, ассоциированных с клубками и эластическими волокнами; остеогенное – образование ламеллярных, трабекулоподобных и узелковых остеонидных структур путем внутримембранозной оссификации, сопровождающейся активацией щелочной фосфатазы и минерализации. Формирование предикторов энтез – организация комиссур между механически разнофазными компонентами остеонидных структур и каркаса. Разработана классификация таксономических форм и предложена гипотеза о роли эволюционных инструментов в структурировании коллагенового каркаса в тканевых культурах *in vitro*.

Ключевые слова: перитенон, сканирующая электронная микроскопия, фибриллярный коллаген, коллагеновый гель, структурирование коллагенового каркаса, гистогенез, кальцийфосфаты, классификация, микроэволюция

DOI: 10.31857/S0042132424030024, **EDN:** PSCJEW

ВВЕДЕНИЕ

Сухожильную ткань широко используют в качестве сырьевого источника для получения различных коллагенсодержащих материалов (подложки, гели, скаффолды). Наиболее распространено применение ахилловых, надколенных

и хвостовых сухожилий лабораторных крыс, лошадей, овец. Во всех технологических процессах используют в основном свободные сухожильные нити, а их соединительнотканые капсулы (перитеноны), как правило, не применяют. Вместе с тем перитеноны относят к биологически ак-

тивному сырью, из которого возможно получить, например, прогениторные клетки (Mienaltowski, 2014). Перитенон по определению медицинского словаря Мерриам—Уэбстер — это соединительнотканная оболочка сухожилия (<https://www.merriam-webster.com/medical/peritenon>). Оболочка представляет собой капсулу, образованную рыхлой волокнистой соединительной тканью, внутри которой расположены сухожильные нити второго—третьего уровней анатомической организации. В филогенезе и, соответственно, в эмбриогенезе возникают специализированные области с однонаправленной ориентацией коллагеновых массивов — линейные сухожилия, в ходе эволюции соединяющиеся с прилегающей формирующейся костной тканью. Массивы коллагеновых волокон в пограничных участках и, прежде всего, в областях остеотендинозных и остеолигаментозных соединений формируют перитеноны (Summers, Koob, 2002). В структурно-механическом и функциональном отношении — это области повышенного механического напряжения, что увеличивает риски износа и требует специальной защиты. В связи с этим в эти области мигрируют транскрипционные метаболиты (SOX-9 и склераксис), контролирующие хондрогенез и теногенез, трансформирующий фактор роста (TGF)- β , инсулиноподобный фактор роста-1, основной фактор роста фибробластов (bFGF) и тромбоцитарный фактор роста, участвующие в процессах репаративной регенерации сухожилий (Blitz et al., 2009; Rossetti et al., 2017). Механобиологический тренд поддерживает и формирование так называемых энтезисных органов с их размещением в областях, компенсирующих механическое напряжение, на границах раздела между структурами с различными механическими свойствами, что благодаря особой конструкции межфазных прикреплений в костно-сухожильных соединениях обеспечивает распределение нагрузки (Benjamin, Ralphs, 2001). Синхронно с энтезами возникает и сесамовидная ткань, гистогенетически представляющая собой продукт деятельности теноцитов и размещенная в перитенонах, нередко вблизи мягкой части энтез (Benjamin et al., 2002). К структурным компонентам сесамовидной ткани относят островки и глобулы. Островки часто локализованы в мягкой части энтез. Сесамовидные глобулы — подвижные частицы, цитогенетическими предшественниками которых служат матриксные везикулы, синтезируемые теноцитами. Матриксные везикулы и сесамовидные глобулы — ключевые акторы, упрочняющие ткань сухожилий посредством локальной минерализации

(Iwayama et al., 2022). В тканях перитенонов находят реализацию и физико-химические предпосылки к агрегации и компактизации фибриллярного коллагена с формированием пластинчатых структур в виде щелочного сдвига кислотности внеклеточного матрикса (Гайдаш и др., 2022).

Вышеприведенные обстоятельства позволяют рассматривать перитеноны как накопитель морфогенетических потенциалов. С учетом этого прогрессирует технологический интерес к перитенонам и возрастают сырьевые перспективы материала при проектировании различных матриц на основе фибриллярных коллагенов.

В соответствии с этим приобретает актуальность и задача разработки методологического инструментария для оценки морфогенетических свойств материала, включающая, в том числе, создание морфологической классификации надмолекулярных структур коллагенового каркаса, формирующихся в ходе культивирования в условиях *in vitro*.

Цель работы состояла в определении морфогенетических свойств и разработке классификации супрамолекулярных структур, формирующихся в условиях *in vitro* в коллагеновом каркасе подложки, полученной из перитенонового геля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сухожилия формируют клетки нервного гребня эктодермы, параксиальной мезодермы и мезодермы латеральной пластинки. Осевые сухожилия происходят из одного из четырех отделов сомитов с обособлением в проксимально-дистальном направлении из дорсолатеральной полоски (Schweitzer et al., 2001). Это позволяет предположить, что в дорсальном листке перитенона проксимального отрезка сухожилия камбиальный потенциал выше, чем в вентральном листке дистальной части хвоста. В соответствии с этим и производили вырезку перитенонов. Вначале обнажали сухожильные пучки, размещенные в соединительнотканной оболочке проксимальной трети хвоста. Затем оболочку вскрывали, выводили свободные сухожильные нити, отсекали вентральный и отсепаровывали дорсальный листки перитенона по линии прикрепления к наружной пластинке надкостницы позвоночного столба. Именно из этого сырья получали перитеноновые гели и подложки.

Ацетатные экстракты коллагена готовили по методикам, обеспечивающим сохранение концевых телопептидов, что необходимо для эф-

фективного гелеобразования (Кухарева и др., 2003; Chandrakasan et al., 1976). Стоковый раствор получен разведением экстракта коллагена до конечной концентрации 2 мг/мл десятикратной средой 199 (Gibco, США), нейтрализован 0.34 М NaOH (х.ч., ООО “СГС Хим”). Перитеноновый гель готовили экспонированием стокового раствора в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 30 мин.

Коллагеновую подложку получали, разливая перитеноновый гель, приготовленный непосредственно перед использованием в эксперименте *in vitro*, в чашки Петри, и оставляли в CO₂-инкубаторе при 37°C на 1 сутки. На отвердевшую перитеноновую подложку наливали питательные среды и высевали мезенхимальные стромальные клетки (МСК). Использовали мультипотентные МСК костного мозга новорожденного кролика породы Шиншилла. Культивирование осуществлено в питательной среде следующего состава: DMEM/F12 (Биолот, РФ), сыворотка эмбрионов коров (HyClone, США), раствор антибиотиков PenStrep (Sigma, США), раствор L-глутамина Ultraglutamine (Lonza, Belgium). Продолжительность культивирования без промежуточных переосевов составила 14 сут. Изучены образцы следующих групп: 1-я – перитеноновый гель *ex tempore*; 2-я – коллагеновая подложка с посеянными в ростовую питательную среду МСК; 3-я – коллагеновая подложка с МСК, посеянными в остеогенную питательную среду. Выборки: 1-я группа – пять покровных стекол с нанесенным гелем, 2-я – три культуральные чашки с биоматериалом, 3-я – пять культуральных чашек с биоматериалом. Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) готовили следующие образцы. Перитеноновый гель *ex tempore* (мазки на покровных стеклах) фиксировали в парах 1.5%-го водного раствора глutarового альдегида (25%, Thermo Scientific Chemicals), отмывали в деионизованной воде и высушивали при 37°C в течение 1 ч. Коллагеновые подложки 2-й и 3-й групп вместе с клетками фиксировали в культуральных чашках 1.5%-ным водным раствором глutarового альдегида, отмывали в деионизованной воде, высушивали при 37°C в течение 1 ч и обезвоживали в водных растворах этанола восходящей концентрации. Приготовленные образцы напыляли золотом на вакуумной установке K550X (Emitech, Англия). Исследование выполнено на микроскопах LEO 420 (Carl Zeiss, Германия) и JSM-7001F (Jeol, Япония). Морфометрические исследования произведены по СЭМ-изображениям в редакторе Photoshop

с применением калиброванных по масштабным отрезкам линейки для определения размеров структур и тестовых полей. Удельную площадь поверхности (показатель S_v) вычисляли по формуле: $S_v = 2n/l$, где n – число точек пересечения с тестовой линией; l – длина тестовой линии в микрометрах. Численную плотность структур – количество фибриллярных узлов, пор, профилей коллагеновых волокон на постоянной площади определяли с применением “правила несмещенного подсчета” (Gundersen et al., 1988). Щелочную фосфатазу (ЩФ) выявляли гистохимически реактивом BCIP-NBT (Sigma, США) по отложению диформаза (нерастворимого продукта реакций NBT и BCIP с солями кальция и свободной фосфорной кислотой) в МСК, фиксированных 10%-ным формалином, на стандартном культуральном пластике в условиях ростовой и остеогенной среды (Golub, Boesze-Battaglia, 2007). Морфологические проявления активности ЩФ изучали с помощью световой микроскопии (СМ) с применением инвертированного микроскопа Nikon Eclips TS100, снабженного цифровой фотокамерой. Активность ЩФ оценивали морфометрически с определением относительного объема маркерных отложений (Автандилов, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И КЛАССИФИКАЦИЯ СТРУКТУР

Структура коллагенового каркаса перитеноновой подложки

Перитеноновая подложка, на которой осуществляли культивирование МСК, имеет структуру слоистого (3–5 слоев) каркаса, образованного расправленной сетью коллагеновых фибрилл. О расправленном состоянии каркаса свидетельствует существенное снижение показателя S_v (табл. 1), оно обусловлено уменьшением поверхностного натяжения инкубационной среды в связи с введением в ее состав сыворотки эмбрионов коров, содержащей липиды. В сравнении с гелем коллагеновые фибриллы в подложке утолщены, более шероховаты (что повышает сцепленность), поры крупнее, но их численная плотность значительно меньше (табл. 1, рис. 1а, б). Увеличение толщины коллагеновых волокон в сочетании с увеличением их численной плотности свидетельствует о росте массы фибриллярного материала, что, в свою очередь, обусловлено интенсивными процессами самосборки и синтезом МСК фибриллярных коллагенов *de novo*. Утолщенные волокна деформируют коллагеновую сеть подложки: возникают плот-

Таблица 1. Морфометрические показатели коллагенсодержащих материалов, полученных из соединительнотканых оболочек паравerteбральных сухожилий ($M \pm m$)

Показатель	Перитеноновый гель		Перитеноновая подложка	
	каркас	клубки	каркас	клубки
Диаметр клубковых структур (D), мкм	—	6.5 ± 0.3	—	$9.6 \pm 1.6^*$
Толщина коллагеновых волокон (L), мкм	0.112 ± 0.01	0.211 ± 0.01	$0.234 \pm 0.01^*$	$0.576 \pm 0.01^*$
Удельная площадь поверхности коллагеновых фибрилл (S_v), мкм ² /мкм ³	1.71 ± 0.1	6.15 ± 0.3	$0.16 \pm 0.01^{**}$	$12.5 \pm 0.8^{**}$
Шероховатость коллагеновых волокон (Ra), мкм	0.11 ± 0.01	0.14 ± 0.01	$0.19 \pm 0.02^*$	$0.08 \pm 0.01^*$
Диаметр пор (D), мкм	0.120 ± 0.01	0.131 ± 0.01	$0.896 \pm 0.01^*$	$0.262 \pm 0.01^*$
Численная плотность пор (n), п/мкм ²	8.75 ± 0.5	17.0 ± 1.2	$0.97 \pm 0.1^{**}$	$11.2 \pm 0.6^*$
Диаметр фибриллярных узлов (D), мкм	0.621 ± 0.01	0.231 ± 0.01	$0.361 \pm 0.01^*$	$0.506 \pm 0.01^*$
Связность фибриллярных узлов (r)	3.3 ± 0.1	3.8 ± 0.1	$6.3 \pm 0.1^*$	3.9 ± 0.1
Численная плотность фибриллярных узлов (n), п/мкм ²	3.7 ± 0.1	10.1 ± 0.5	$2.3 \pm 0.1^*$	1.9 ± 0.1

Примечание: * достоверно при $p < 0.05$; ** достоверно при $p < 0.01$ при сравнении структуры в подложке с аналогичной структурой в перитеноновом геле.

ные фиброзные тяжи с расширенным межфибрилярным пространством, что способствует турбулентности гидродинамических потоков в инкубационной среде. Фибриллярные узлы — структуры со сведенными под острыми углами к центру коллагеновыми фибриллами. В протоузлах тонкие фибриллы собраны в параллельные, но не слившиеся нити, которые ориентированы к центрам без надфибрилярных образований (рис. 1в). Разделенное состояние фибрилл повышает связность протоузлов до 8–9. В зрелых фибриллярных узлах коллагеновые фибриллы объединены вплоть до слияния и локальной гомогенизации, что, соответственно, понижает их связность (рис. 1г). В целом диаметр и численная плотность фибриллярных узлов в подложке меньше, чем в геле, но их связность выше (табл. 1). Гипотрофия и гипоплазия фибриллярных узлов неизбежно приводит к частичной потере прочности, которую в очагах завихрений каркаса (вследствие, например, повышенных механических нагрузок) в порядке опережающей компенсации может нивелировать осаждение кальцийфосфатов (рис. 1д). Однако прочность самоорганизующегося каркаса при культивировании в 2D-формате, по-видимому, не формирует морфогенетическую доминанту. Повышение механической чувствительности коллагеновой сети, ее быстрый, широкий и когерентный охват волнами механических ко-

лебаний, одним из источников и акцептором которого служат дифференцирующиеся клетки — морфогенетический мотив, реализация которого в структурирующемся каркасе термодинамически оптимальна. Соотношение пропорций протоузлов к зрелым формам при культивировании в ростовой питательной среде составляет 1 : 5, а при культивировании в остеогенной среде доля зрелых форм возрастает до 3 : 1. При этом узлы выглядят крупнее, нарастают их численная плотность и связность (табл. 1). Остеогенная среда, таким образом, ускоряет созревание фибриллярных узлов, структура которых приобретает большую упорядоченность (рис. 1е). В итоге коллагеновый каркас формирует жесткость и, соответственно, теряет эластичность.

К структурным компонентам подложки в сформированной классификации отнесены пластинчатые образования, клубковые структуры и сфероиды.

Пластинчатые образования

Формирование пластинчатых образований — частный случай надмолекулярного структурирования фибриллярного коллагена, осуществляемого как экстрацеллюлярно, так и внутри клеток. В соответствии с этим пластинчатые образования разделены на каркасные и клеточно-опосредованные. Каркасные пластинчатые обра-

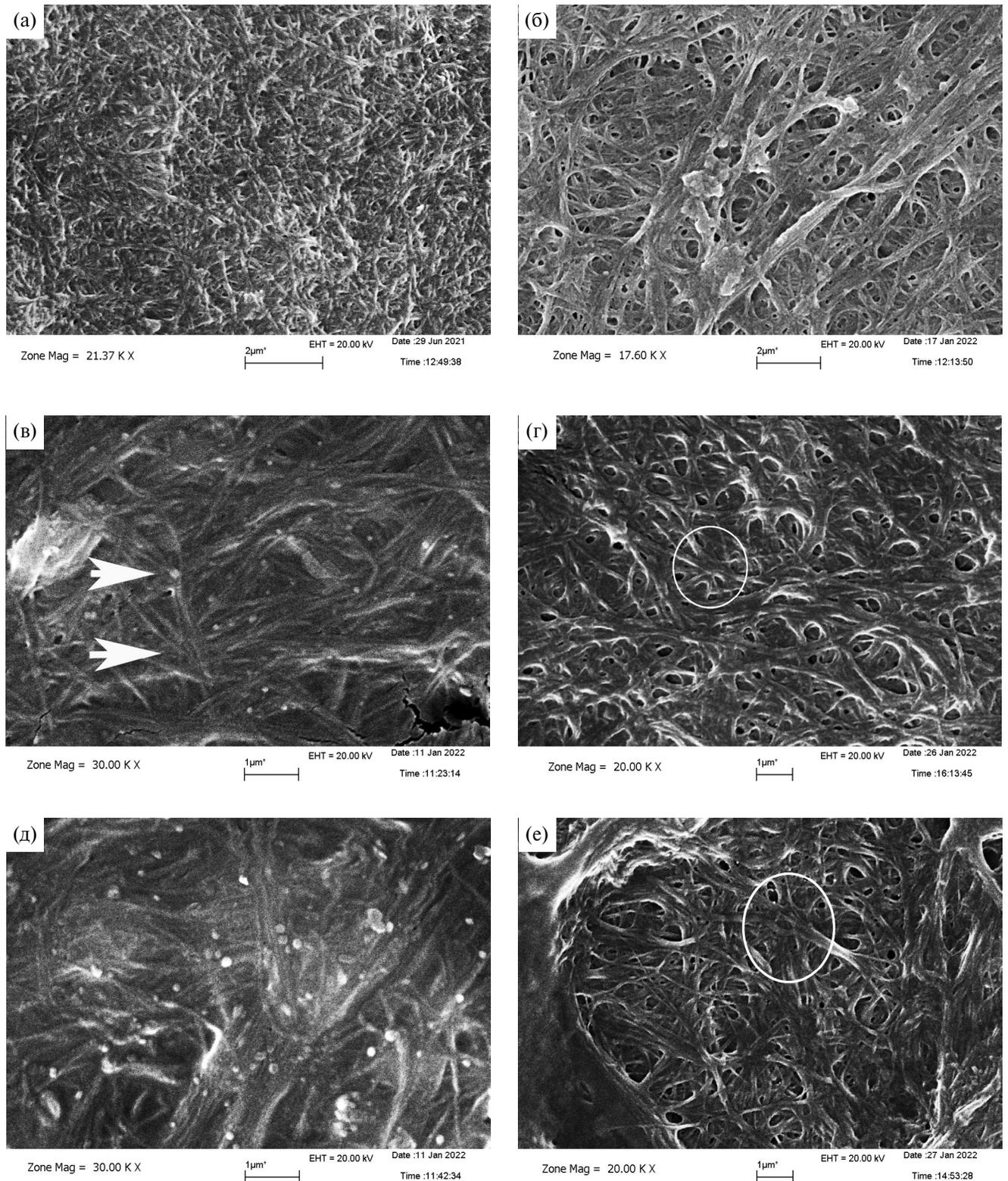


Рис. 1. СЭМ-изображения структуры коллагеновой сети геля и каркаса подложки из перитенонового геля в ростовой и остеогенной средах: (а) структура исходного перитенонового геля; (б) деформация сети утолщенными коллагеновыми волокнами; (в) стрелки – зарождающиеся фибриллярные протоузлы; (г) эллипс – зрелый фибриллярный узел; (д) кальцийфосфаты в области формирующихся фибриллярных узлов; (е) эллипс – зрелый фибриллярный узел в перитеноновой подложке (остеогенная среда).

зования, анатомические компоненты подложки, представляют собой продукт экстрацеллюлярного структурирования фибриллярного коллагена различного происхождения (внутриклеточный синтез и занос в каркас из геля) и не обладают тканевой специфичностью. Клеточно-опосредованные пластинчатые образования анатомически связаны с МСК как исключительно внутриклеточные продукты синтеза и структурирования фибриллярного коллагена, они признаны гистогенетическими предикторами различной направленности.

В коллагеновых подложках выявлено три разновидности каркасных пластинчатых образований: конвергированные пластинки, компакт-пластины и концентрические пластинки.

Конвергированные пластинки — сведенные “бок в бок” параллельно упакованные коллагеновые субфибриллы, встроенные в структуру каркаса (рис. 2а). Укладка волокон близка к параллельной. Это признают морфологическим критерием различия данной разновидности пластинчатых образований от фибриллярных узлов, в которых волокна направлены к центру и пересекают его под разными углами. Выявлены и их отличия от очагов простого сжатия коллагенового каркаса: конвергированные фибриллы выпрямлены и упорядочены, сжатые — извиты и хаотично переплетены. Блоки конвергированных пластинчатых образований не расслаивают подложку, залегают в один, в основном поверхностный слой. Длина блоков достигает 3–5 мкм, ширина варьирует от 0.75 до 2 мкм. В подложках, культивированных в остеогенной среде конвергированные пластинки крупнее за счет утолщенных коллагеновых фибрилл, некоторые из которых минерализованы (рис. 2б). Структура блоков неравномерная: участки сближения сменяют участки слияния. В участках компактного расположения соприкасающиеся волокна максимально сближены, но контуры фибрилл четкие, межволоконный матрикс рыхлый. В участках слияния контуры фибрилл размыты, вещество интерстиция гомогенизировано (рис. 2в). Полиморфизм блоков свидетельствует о метастабильном состоянии, которое термодинамически разрешает разнонаправленные структурные переходы, но в рамках одного типа пластинчатых образований. При этом как бы срединное положение занимает блок с мозаичным распределением участков компактизации и гомогенизации. Движущей силой переходов, по-видимому, служат конформационные преобразования фибриллярного коллагена. При

прогрессивном переходе зоны компактизации расширены, возрастает объем параллельно упакованных, выпрямленных и, соответственно, расцепленных, деспирализованных коллагеновых фибрилл. При консервативном переходе волокна адгезируют, и нарастает коагуляция фибриллярного коллагена.

Компакт-пластинки — плоские, утолщенные пластинчатые образования, имеющие форму неправильных многоугольников (рис. 2г). Вытянутые оконечности придают пластинкам отростчатую форму. Морфологически пластинки представляют собой предельно компактизированные коллагеновые волокна, на основном протяжении слившиеся, местами вплоть до полной гомогенизации. Пластинки чаще расположены на поверхности подложки, а если в более глубоких слоях, то обязательно с вышедшими на поверхность отростчатыми оконечностями. Морфогенез компакт-пластинок не ясен. Они в 2–3 раза меньше конвергированных: длина не более 2.0 мкм, ширина ~ 1.2 мкм. Компакт-пластинки, безусловно, упрочняют коллагеновую подложку, подвергаясь действию перпендикулярных сил гидростатического сжатия. Кроме того, они испытывают деформирующее влияние разнонаправленных центробежных сил и сил растяжения. Последствия неизбежны: сложные упруговязкие переходы и напряжение, которое тем выше, чем меньше площади сечений микроструктур. Отсюда и компенсаторные мотивы трансформации субфибрилл, направленные к их объединению в компакт-пластины. Морфологические свидетельства напряженного состояния пластинок очевидны: в отростках локальные разволокнения и растрескивания, в телах — горизонтальные перемещения и просадки вещества, микроразломы и разъединения. Не менее очевиден и финал этих событий: выстраивание до полного вылушивания из сетей каркаса. Секвестрированные пластинки способны к свободному флотированию, но оно весьма ограничено — пластинки оседают не случайно, а склонны к очаговому накоплению в очагах механического напряжения. Здесь они формируют дебрис, отложения которого местами занимают обширные поля. Подобная картина отложений не обязательно маркирует только коагуляцию фибриллярного коллагена. Это может быть структурным следом локального упрочнения коллагенового каркаса в областях, например, интенсивной механической и/или дифференцировочной активности МСК.

Концентрические пластинчатые образования — компактизированные коллагеновые субфибрил-

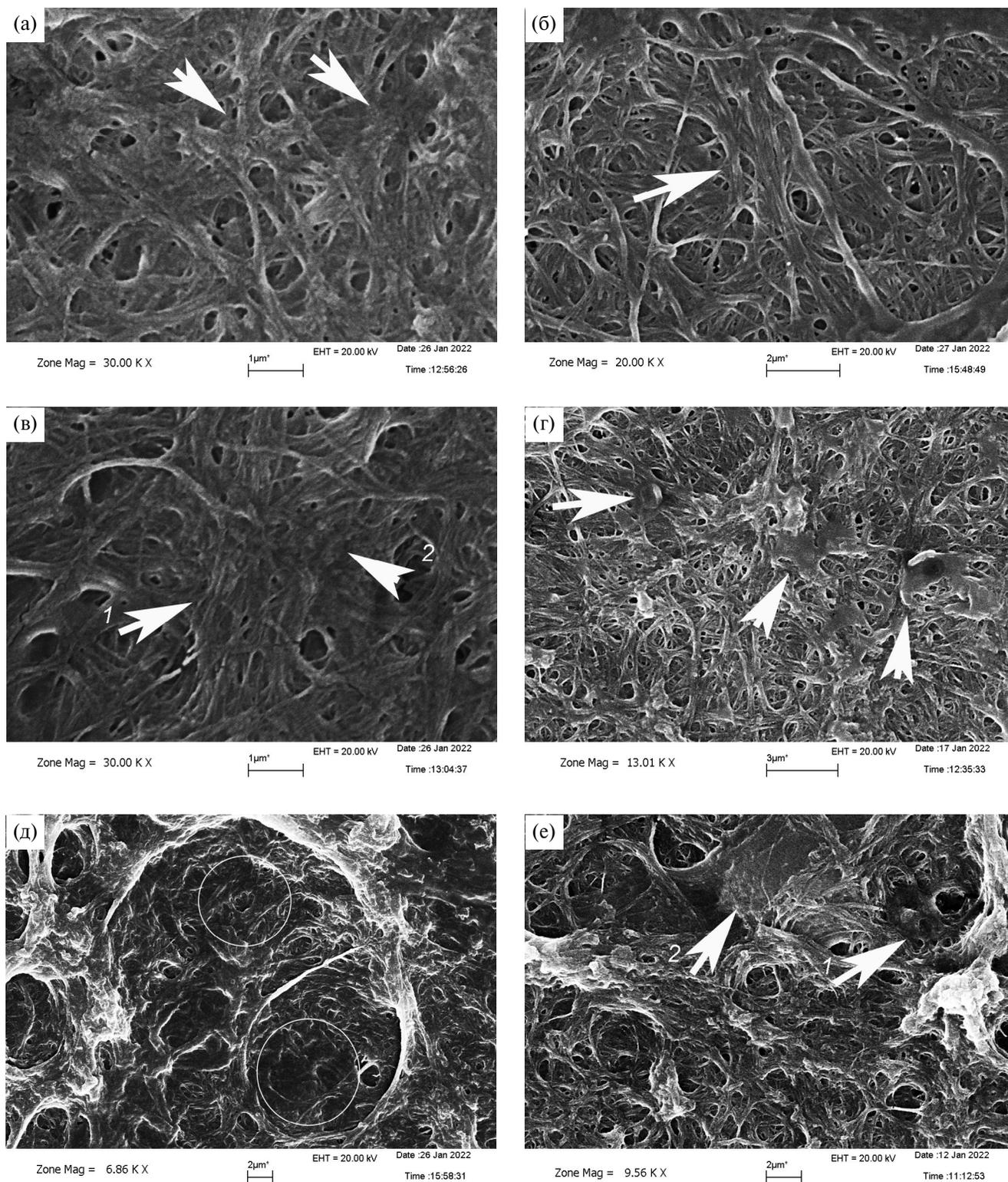


Рис. 2. СЭМ-изображения пластинчатых образований перитенонового коллагенового каркаса: (а) стрелки – конвергированные пластинки (ростовая среда); (б) стрелка – конвергированная пластинка (остеогенная среда); (в) полиморфизм конвергированных пластинок: стрелка 1 – компактизированные волокна с четкими границами, стрелка 2 – слившиеся коллагеновые волокна с размытыми контурами (ростовая среда); (г) стрелки – компакт-пластинки (ростовая среда); (д) эллипсы – концентрические пластинки с ассиметрическими стенками в фенестрированном отверстии МСК (ростовая среда); (е) стрелка 1 – концентрическая пластинка с утолщенной ассиметричной стенкой, стрелка 2 – пластинчатое образование в коллагеновом каркасе (ростовая среда).

лы, плотно упакованные в плоские структуры округлой формы. Структуры в большей своей части гомоцентричны – имеют один геометрический центр, вокруг которого ориентировано довольно широкое отверстие. Размеры концентрических пластинок варьируют в пределах 1–5 мкм, диаметр отверстия – 0.5–1.0 мкм. Поверхность пластинок в основном гладкая. Однако некоторые экземпляры имеют участки либо эрозирования, либо, наоборот, напластования. При этом в очагах эрозирования обнажены, а в напластованиях – контурируют слегка выступающие над поверхностью компактизированные коллагеновые субфибриллы. В обеих ситуациях – волокна собраны в упорядоченные концентрические пакеты. Отверстие пластинок валикообразное, гладкое. Просвет чаще свободный. Пластины жестко встроены в подложку посредством трехмерных связей с волокнами не только одного верхнего слоя, но и подлежащих слоев коллагенового каркаса. По плотности упаковки фибрилл в стенке структуры разделяют на концентрические разрастания и концентрические пластинки. Концентрические разрастания имеют рыхлую стенку, коллагеновые субфибриллы которой заполняют свободное пространство межфибрилярных расщелин и пор. Концентрические пластинки – в доле в отношении этих структур не более 5–7%, расположены чаще вблизи клеток, фибриллярный коллаген в их стенках уплотнен, стенки ассиметрично утолщены и пронизаны микроотверстиями. Подобные формы расположены преимущественно на территориях крупных перфорированных фенестр МСК с обнаженной коллагеновой подложкой, в которую встроены пластины (рис. 2д). Кроме того, ассиметричные пластины отмечены и вблизи широких пластинчатых образований, растущих из глубины коллагенового каркаса (рис. 2е). Топологическая близость концентрических пластинок к дифференцирующимся МСК указывает на то, что доминирующее участие в их морфогенезе принимают коллагеновые волокна, синтезированные *de novo*. Морфогенетическая история и перспективы концентрических пластинок не ясны. Реализуют они, по-видимому, однонаправленный мотив, а именно формирование структур, канализирующих распространение тканевых жидкостей. Диапазон переходных структурных форм олигоморфный: концентрические структуры с рыхлой стенкой и концентрические пластинки с компактизированной стенкой. Ограниченное количество переходных структур с явным

доминированием предельно ранних форм (концентрических структур с рыхлой полустенкой) указывает на то, что становление этих образований относительно кратковременное и в условиях данного эксперимента остановлено на стадии структурных предикторов вследствие невысокой концентрации морфогенетических агентов и/или слабой чувствительности концентрических структур к действию сигналов.

Клубковые структуры

Клубковые структуры – частицы неправильной округлой формы, образованные запутанными коллагеновыми волокнами. В перитеноновой подложке прослеживаются прото клубки в виде нечетко оформленных очагов запутывания субфибрилл коллагенового каркаса. Размеры прото клубков варьируют от 0.212 до 0.450 мкм, численная плотность – 3–4 экземпляра в случайно отобранном поле размером 10 × 7 мкм. Место зарождения прото клубков не ясно. Они присутствуют в перитеноновом геле *ex tempore* (рис. 3а). В перитеноновой подложке клубки нередко сконцентрированы в местах скопления фибриллярных протоузлов, образуя полиморфные очаги завихрений волокон каркаса (рис. 3б). Это свидетельствует об общности морфогенеза и, возможно, об единых механических индукентах. Фибриллярный коллаген в прото клубках предельно компактен, вплоть до полной гомогенизации, сопровождающейся кальцификацией (рис. 3в). Клубки созревают *in situ*, на что указывает отчетливая связь с коллагеновой сетью подложки, что позволяет классифицировать их как резидентные формы (рис. 3г). Зрелые резидентные клубки достигают 5–7 мкм, имеют четко структурированные центры, некоторые принимают эффектный вид, напоминающий “голову Горгоны” с “растрепанными” ветвящимися фибриллами (рис. 3д). Толщина коллагеновых фибрилл в клубках практически в два раза больше, чем во внегломерулярном каркасе (табл. 1). Одной из причин гипертрофии коллагеновых волокон может быть локальное ощелачивание экстрафибрилярного матрикса, что уменьшает суммарный поверхностный заряд коллагеновых волокон и способствует агрегации фибриллярного коллагена, в том числе и с его нефибриллярными формами (Li et al., 2009).

Показатель шероховатости коллагеновых волокон в клубках меньше, чем в волокнах каркаса, т.е. они менее сцеплены. Поры мельче (возможно, за счет сжатия клубков), но их численная

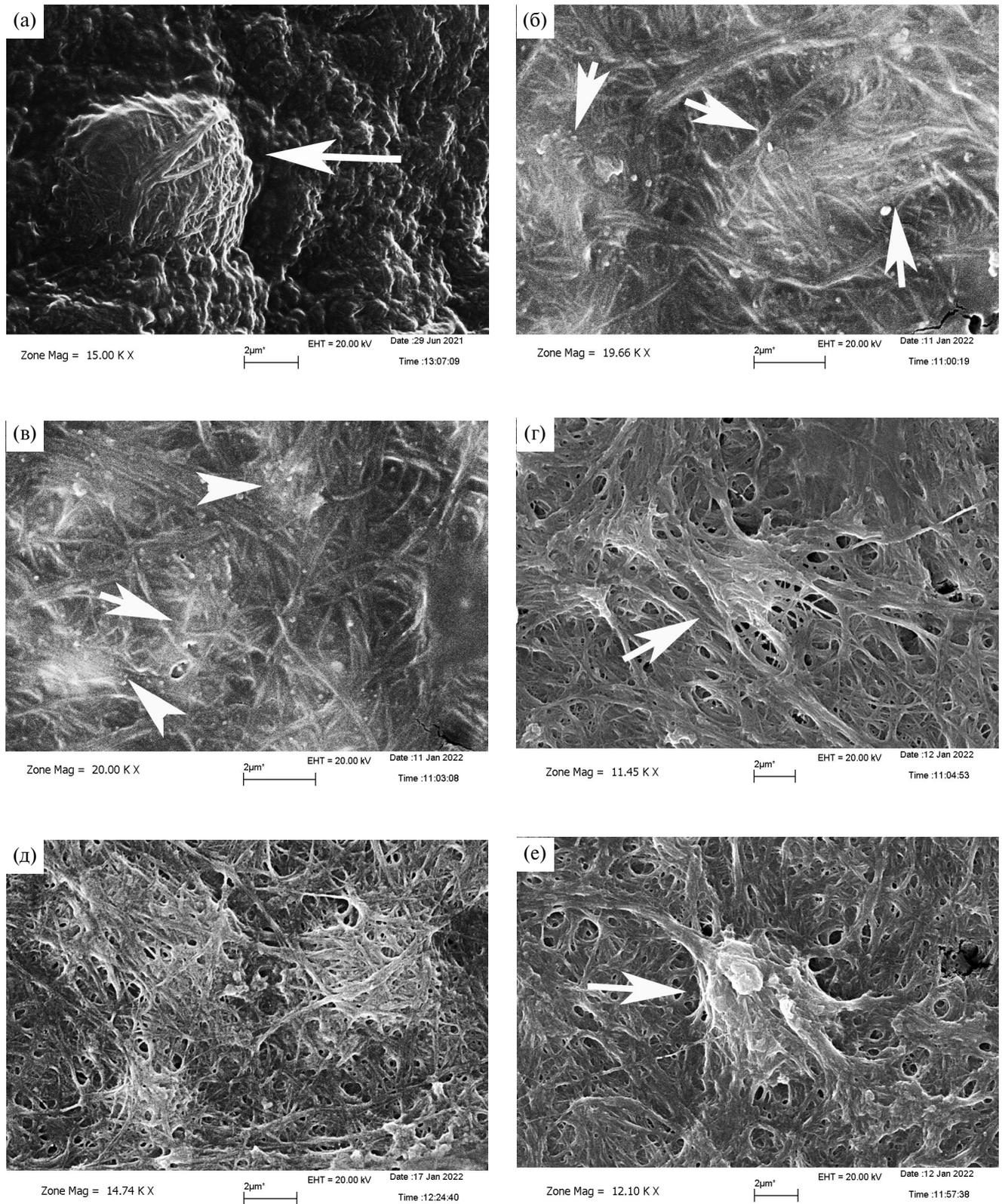


Рис. 3. СЭМ-изображения клубковых образований в перитеноновой подложке (ростовая среда): (а) стрелка – клубок в геле *ex tempore*; (б) стрелки – зачатки клубков в виде запутанных коллагеновых субфибрилл; (в) стрелки – протоклубки с гомогенизированным и кальцифицированными центрами; (г) стрелка – формирующийся резидентный клубок; (д) зрелые резидентные клубки; (е) стрелка – инволютивный резидентный клубок.

плотность в разы больше, чем во внеклубковом каркасе (табл. 1). Повышенная пористость делает резидентные клубки хорошо проницаемыми для тканевых флюидов. Клубки располагают и фибриллярными узлами, но в сравнении с каркасными их меньше, они более крупные и с меньшей связностью (табл. 1). Поверхностная площадь коллагеновых фибрилл обратно зависит от диаметра клубков — по мере увеличения диаметра показатель S_v прогрессивно регрессирует (табл. 2). При этом в размерном диапазоне диаметров начиная примерно с 1.5–2.5 мкм поверхностная площадь клубков резко падает (табл. 2). Соотношения диаметров и показателей S_v свидетельствуют о том, что в ходе гломерулогенеза структура резидентных клубков регрессирует, они теряют свободную энергию, но приобретают термодинамически выгодную стабильность. Большая часть резидентных клубков, структурированных в каркас, — это в основном мелкие формы диаметром 2–3 мкм.

Функциональное предназначение резидентных клубков в достаточной мере предсказуемо, и оно тесно связано с их структурной динамикой. В морфологическом отношении резидентные клубки представляют собой крупные конгломераты огрубевших фибриллярных узлов, что увеличивает способность акцептировать механическую энергию и составляет прямое следствие длительных механических напряжений. Морфологически напряженное состояние верифицируют по появлению деформационных структур, что делает, в частности, СЭМ-анализ полезным диагностическим инструментом. В малоразмерных формах центры резидентных клубков достаточно мономорфны и состоят из фракции переплетенных хорошо структурированных коллагеновых фибрилл и поровых пространств. Появление крупных форм клубков (диаметром больше 10 мкм), возможно, происходит по механизму прогрессирующего слияния

протоклубков в малые кластеры и далее в большие их группы, в которых отдельные крупные формы клубков в конечном итоге утрачивают свою целостность (Tosh et al., 2003). В дальнейшем по мере увеличения размеров клубков объем деформационных структур в клубках возрастает: тело во всем объеме коллабирует и формирует сплошной бесструктурный коллагеновый массив, количество фибриллярных ответвлений снижено, волокна укорочены, утолщены и огрубевают. На окончательной стадии инволюции клубки уменьшены в размерах, гомогенизированы и уплотнены в центре, но в периферических отделах, наоборот, разрыхлены и разволокнены. Клубки приподняты над каркасом. Секвестрирующие клубки импрегнированы кальцийфосфатами не апатитовой природы (рис. 3e). С учетом вышеописанного, один из функционалов резидентных клубков, по-видимому, опосредует изоляцию структурных последствий упругих и вязких напряжений с последующим удалением деформированного коллагенового материала из каркаса. Подчеркнем, что процессы инволюции не распространены на весь объем коллагенового каркаса подложки, а отмечены только в клубках. Это свидетельствует о неоднородности структуры и физико-химических свойств фибриллярного коллагена: в клубках протеин более чувствителен, а в коллагеновой сети, наоборот, более устойчив к действию факторов инкубационной среды. Механизмы инволюции до настоящего времени не ясны. Один из них, и в частности флокуляция, инициирован с момента зарождения клубковых зачатков, когда вследствие запутывания функциональные группы фибриллярного коллагена и вмещающей фазы взаимно проникают, что, собственно, и провоцирует флокуляцию. Этому также способствует и замедление диффузионных потоков дисперсионной среды, обусловленное усложнением структуры поверхности коллагеновой фракции клубков.

Таблица 2. Значения размеров и удельных площадей поверхностей резидентных клубков при культивировании 14 сут на перитеноновой подложке в ростовой среде

Показатель	Ранжированные значения морфометрических параметров клубков						
	1	2	3	4	5	6	7
Номера размерных рангов							
Диапазон рангов, шаг 0.5 мкм	До 0.5	0.6–1.0	1.1–1.5	1.6–2.0	2.1–2.6	2.6–3.5	4.2–6.6
Диаметр клубков (D), мкм	0.451	0.721	1.120	1.710	2.620	3.600	6.410
Удельная площадь поверхности клубков (S_v), мкм ² /мкм ³	11.80	11.12	1.11	9.60	7.90	3.40	2.80

В такой ситуации рост локальной вязкости неизбежен, что, в свою очередь, ускорит образование гелевых зародышей, их захват и инкапсуляцию структурирующимися клубками (Wilson et al., 2014). В результате во внегломерулярном каркасе может возникнуть относительный дефицит центров гелеобразования и, соответственно, центров ренатурации, основной которой считают самосборку фибриллярного коллагена (te Nijenhuis, 1981; Djabourov et al., 1993; Ronsin et al., 2017). Так, по-видимому, реализован еще один функционал клубков – поддержание равновесия в системе отношений “гломерулогенез–структурирование каркаса”. При сдвиге в сторону первого ослабнет структурирование второго.

*Глобулы перитенонового геля
и сфероиды подложки*

Эксклюзивным структурным компонентом перитенонов *in vivo* признаны сесамовидные глобулы – округлые частицы с плотной, гладкой оболочкой (рис. 4а). Размеры глобул варьируют, и они способны к полному или частичному разделению. Основная часть глобул расположена в сесамовидных островках – переходных структурах в гистогенетическом ряду хрящевая–костная ткань. Основная часть глобул слита с матриксом островков, что свидетельствует о химическом сродстве этих структур, склеивающую основу которых составляют протеогликаны. Цитогенетическим источником глобул выступают матриксные везикулы, синтезируемые в теноцитах. По выходе из последних матриксные везикулы

мигрируют во внеклеточном матриксе, стремясь к расселению вблизи островков. Фундаментальным структурно-функциональным атрибутом перитенонов считают склонность фибриллярного коллагена к компактизации с образованием тонких пластинок (рис. 4б).

В геле *ex tempore* явно вследствие кислотного и щелочного воздействия глобулы деформированы: уменьшены в размерах, сжаты, их оболочка приобретает складчатость и фестончатость по краям, глобулы покрыты набухшими коллагеновыми волокнами, закрывающими от осмотра собственную мембрану (рис. 5а). Проникнув в подложку из геля, сесамовидные глобулы приобретают форму сфероидов: происходит восстановление формы и размеров, выравнивание поверхности оболочек, исчезает фестончатость краев. В итоге в большей своей части сфероиды подложки приобретают вид морфологически близкий к исходному состоянию сесамовидных глобул в перитенонах *in vivo*, но для некоторых форм агрессивное химическое воздействие имеет последствие: в подложке обнаружены деформированные сфероиды (рис. 5б). В зависимости от взаимоотношения с коллагеновым каркасом сфероиды подложки классифицированы на застывшие и растущие формы. Застывшие сфероиды морфологически идентичны сесамовидным глобулам перитенонового геля *ex tempore*, но они более крупные – диаметр достигает 45–60 мкм. В сфероидах подложки фибриллярный коллаген отсутствует, но снаружи они покрыты оплеткой из утолщенных коллагеновых волокон (рис. 5в) и/или ветвящимися цитоплазматическими от-

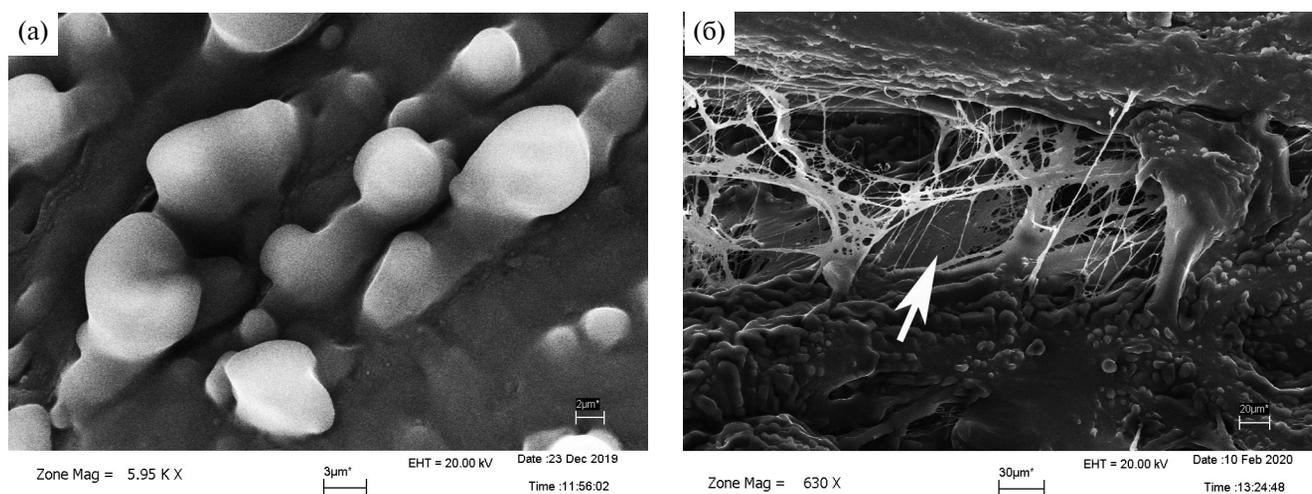


Рис. 4. СЭМ-изображения сесамовидных глобул в перитеноне *in vivo*: (а) стрелки – сесамовидные глобулы; (б) стрелка – пластинчатая компактизация коллагеновых фибрилл.

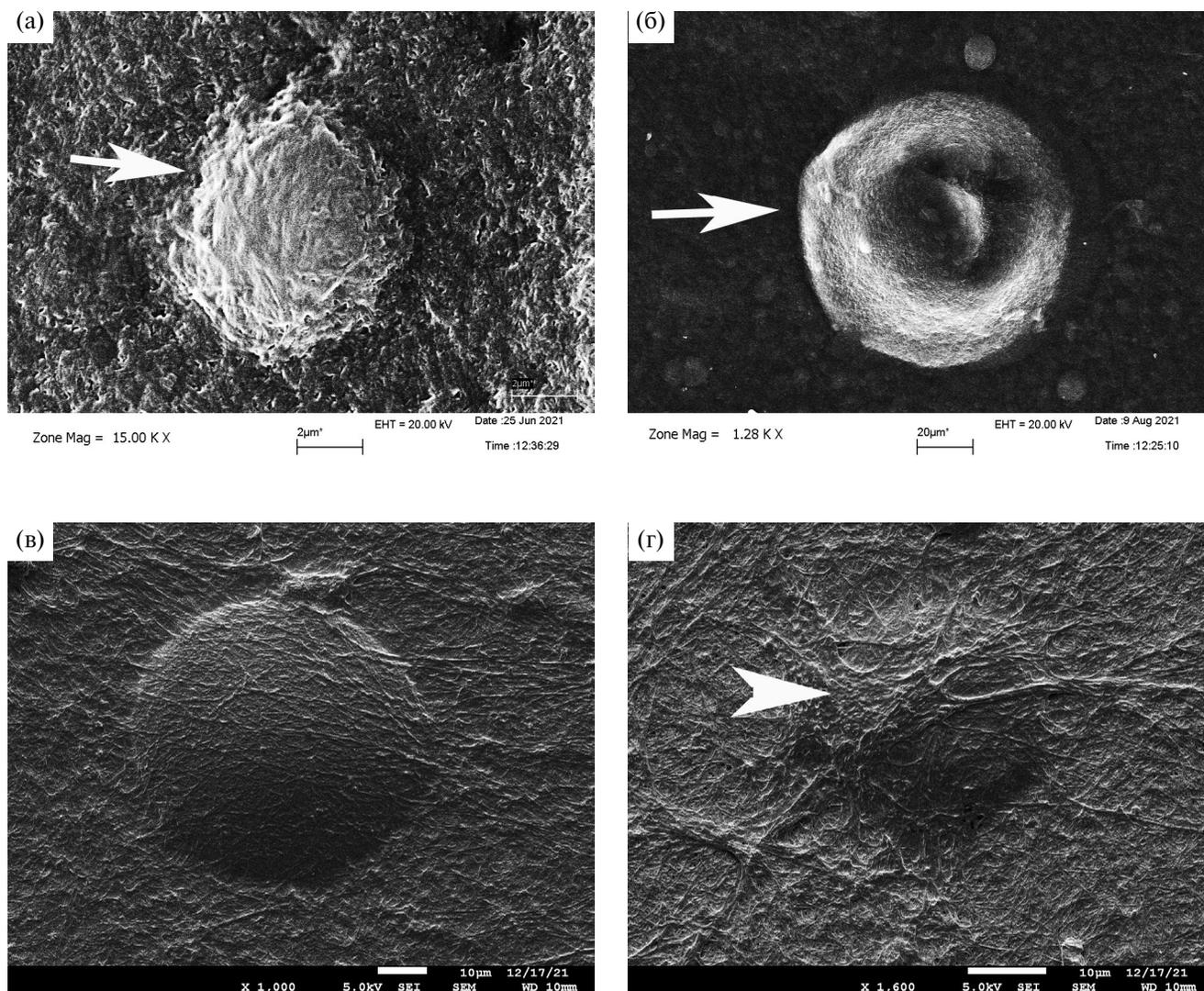


Рис. 5. СЭМ-изображения застывших сфероидов в геле *ex tempore* и подложке (ростовая среда): (а) стрелка — сесамовидная глобула в геле; (б) стрелка — деформированный сфероид; (в) застывший сфероид в глубине коллагенового каркаса; (г) стрелка — застывший сфероид, покрытый коллагеновыми волокнами и цитоплазматическими отростками.

ростками прилежащих клеток (рис. 5г). Механизм утолщения коллагеновых волокон неоднозначен. Отметим, что в большей части волокон прослежены морфологические признаки характерной поперечной исчерченности, обусловленной D-периодичностью фибриллярного коллагена I типа. Кроме того, волокна имеют четкие контуры границ раздела. Это указывает на то, что волокна не набухшие, а их утолщение, возможно, обусловлено интенсивными процессами самосборки микроволокон с признаками внутрифибриллярной адгезии. В коллагеновой оплетке присутствуют поровые структуры в виде широких межфибриллярных расщелин. По-

верхность на обнаженных участках сфероидов гладкая, что предопределяет слабость адгезионных взаимодействий. В периферических отделах сфероиды уплотнены, границы по периметру четкие, ровные, отстоят отдельно и не деформируют сетчатую структуру коллагенового каркаса подложки. Метаморфозы застывших сфероидов не известны, инкапсуляция, несомненно, снижает их функциональную активность. Вместе с тем морфологические особенности инкапсуляции больше похожи на обратимое состояние: оплетка не препятствует разделению составных форм сфероидов, подготовленных к структурной и, соответственно, метаболической раскон-

сервации. Вероятность перехода в активное состояние, возможно, возрастает, если сфероиды попадают в другую экологическую среду, например, в зону действия морфогенов МСК. Во всяком случае при приближении к МСК сфероиды переходят в верхние слои каркаса, стремясь к высвобождению от коллаген-цитоплазматической оплетки, их оболочка разрыхлена, что свидетельствует об усилении метаболической активности, чему способствует в том числе и широкое раскрытие окологлобулярных пор каркаса.

Второй вид сфероидов – это растущие формы, свободно расположенные на поверхности подложки (рис. 6а). В растущих сфероидедах покрытие коллагеновыми волокнами и цитоплазматическими мембранами не структурировано в подложку, что делает их подвижными. В условиях *in vitro* растущие сфероиды, по-видимому, приоритетно воспринимают стимулирующее воздействие химических агентов питательной среды. Это ускоряет их рост – диаметр достигает 70–90 мкм, но это не приводит к активации каких-либо тканеспецифичных дифференцировочных процессов. Основная часть растущих сфероидов пребывает в разрозненном состоянии. Но немало и составных форм, образованных двумя и более частицами (рис. 6б). Морфогенез растущих сфероидов сложен. Некоторые из них адгезируют при простом сближении с полным или частичным слиянием, другие пребывают в метастабильном состоянии разделения/слияния. При максимальном сближении растущие сфероиды непосредственно контактируют, сохраняя непрерывной границу раздела. При слиянии – граница в области контакта частично или полностью прорастает коллагеновыми субфибриллами. Разделение чаще незавершенное и асимметричное. Растущие сфероиды демонстрируют повышенную функциональную активность: поверхность приобретает шероховатость, поры открыты (рис. 6в). Наружную поверхность сфероидов покрывает цитоплазматическая мембрана, пронизанная сквозными, достаточно крупными фенестрами (рис. 6г).

Роль сфероидов в морфогенетических процессах при совместном культивировании с МСК в ростовой питательной среде ограничена слабой активностью процессов структурирования кальцийфосфатов. Морфологически это выражено в виде одиночных игольчатых минеральных разрастаний под цитоплазматической мембраной или на наружной поверхности растущих сфероидов, иногда осаждающихся на поверхно-

сти коллагеновых субфибрилл (рис. 6д). Форма отложений кальцийфосфатов схожа с таковой при минерализации коллагеновых волокон и часто заметна в оссифицирующейся фиброзной ткани. Игольчатая форма разрастаний характерна для роста гидроксиапатитов в свободный объем и структурирования кальцийфосфатов по механизму гомогенной нуклеации. Это точечный, но довольно специфичный признак структурирования минеральной фазы в среде коллагеновой ткани по остеогенному направлению. При культивировании в остеогенной питательной среде структурирование кальцийфосфатов многократно интенсифицировано: в каркасе возникают сверхкрупные глобулы (диаметром до 100–120 мкм), покрытые непрерывной цитоплазматической мембраной, под которой контурируют четко ограненные (4–6 граней) микрокристаллы кальцийфосфатов (рис. 6е). Механизм стимуляции апатитогенеза в сфероидедах не известен, но поскольку столь масштабные проявления наблюдали только в присутствии клеток, возможно, сфероиды абсорбировали остеоген-индуцирующие агенты, синтезируемые дифференцирующимися МСК. Сохраняет актуальность вопрос о том, насколько этот процесс адаптивен по отношению к структурирующемуся каркасу и насколько он эффективен как остеостимулирующий фактор. Ведь гидроксиапатит расположен внутри сфероидов, окружен цитоплазматической и коллагеновой мембранами, что может сдерживать участие данного кальцийфосфата в морфогенезе остеонидных структур. Кроме того, состав, структура и биологическая активность новообразованного гидроксиапатита не известны.

Клеточно-опосредованные структуры

При культивировании на коллагеновой матрице из перитенонового геля крепление дифференцирующихся МСК к подложке происходит посредством плоских цитоплазматических отростков, выпускающих множественные коллагеновые волокна, сплетающиеся с волокнами каркаса (рис. 7а). Прикрепления клеток к коллагеновым подложкам рассматривают как адгезивные взаимодействия с вынужденной асимметрией, свойственной двумерным культурам (Beningo et al., 2004). При этом клетки, прикрепляющиеся к перитеноновой подложке при культивировании как в ростовой, так и остеогенной питательных средах, демонстрируют филоподиальную систему в виде узких длинных

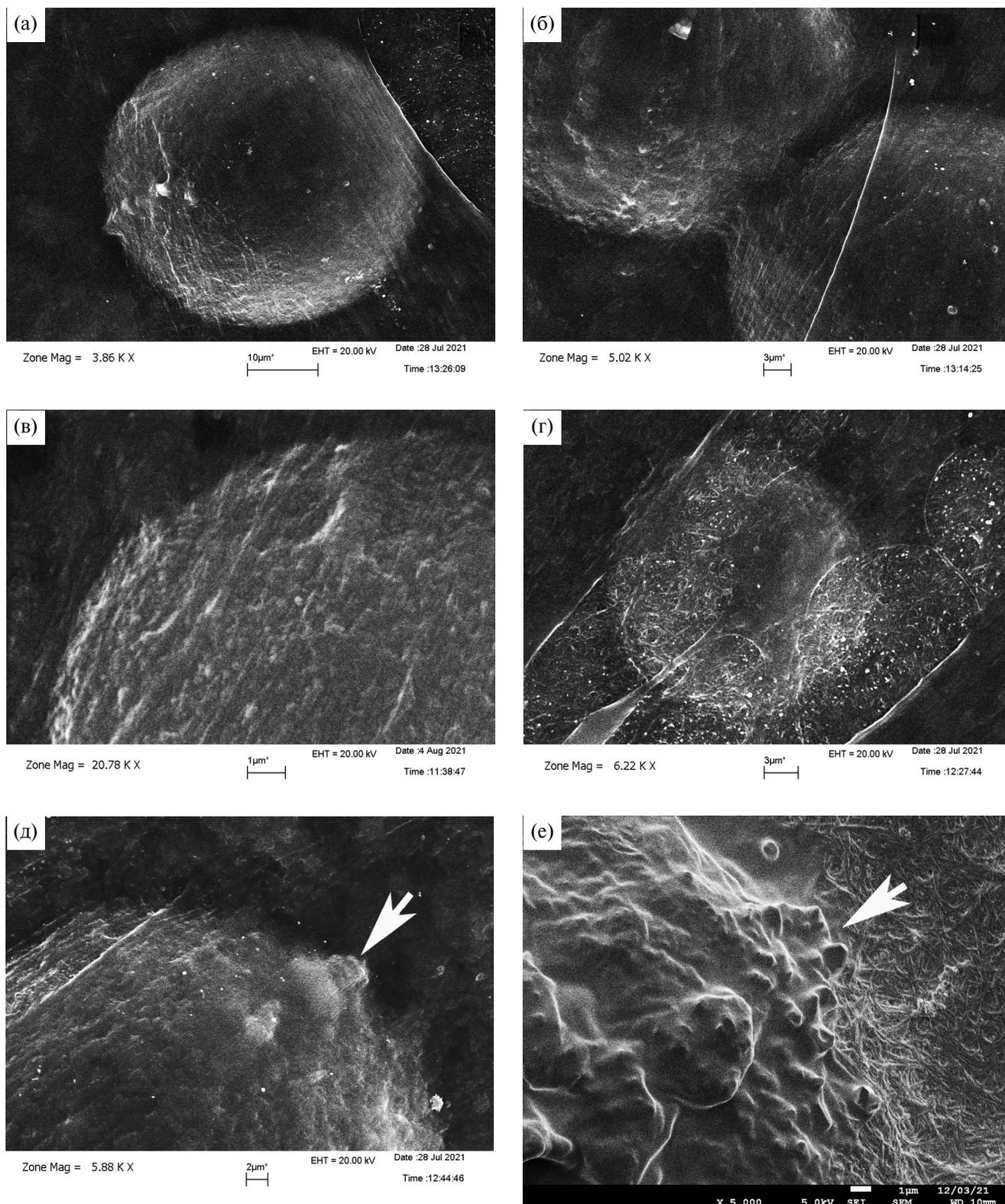


Рис. 6. СЭМ-изображения растущих сфероидов в перитеноновой подложке (ростовая и остеогенная среды: (а) сфероид на подложке (ростовая среда); (б) составной растущий сфероид; (в) растущий сфероид с шероховатой поверхностью и открытыми порами (ростовая среда); (г) растущий сфероид, покрытый фенестрированной цитоплазматической мембраной (ростовая среда); (д) стрелка – очаговые разрастания на поверхности растущего сфероида (ростовая среда); (е) стрелка – растущий сфероид с микрокристаллитами кальцийфосфатов (остеогенная среда).

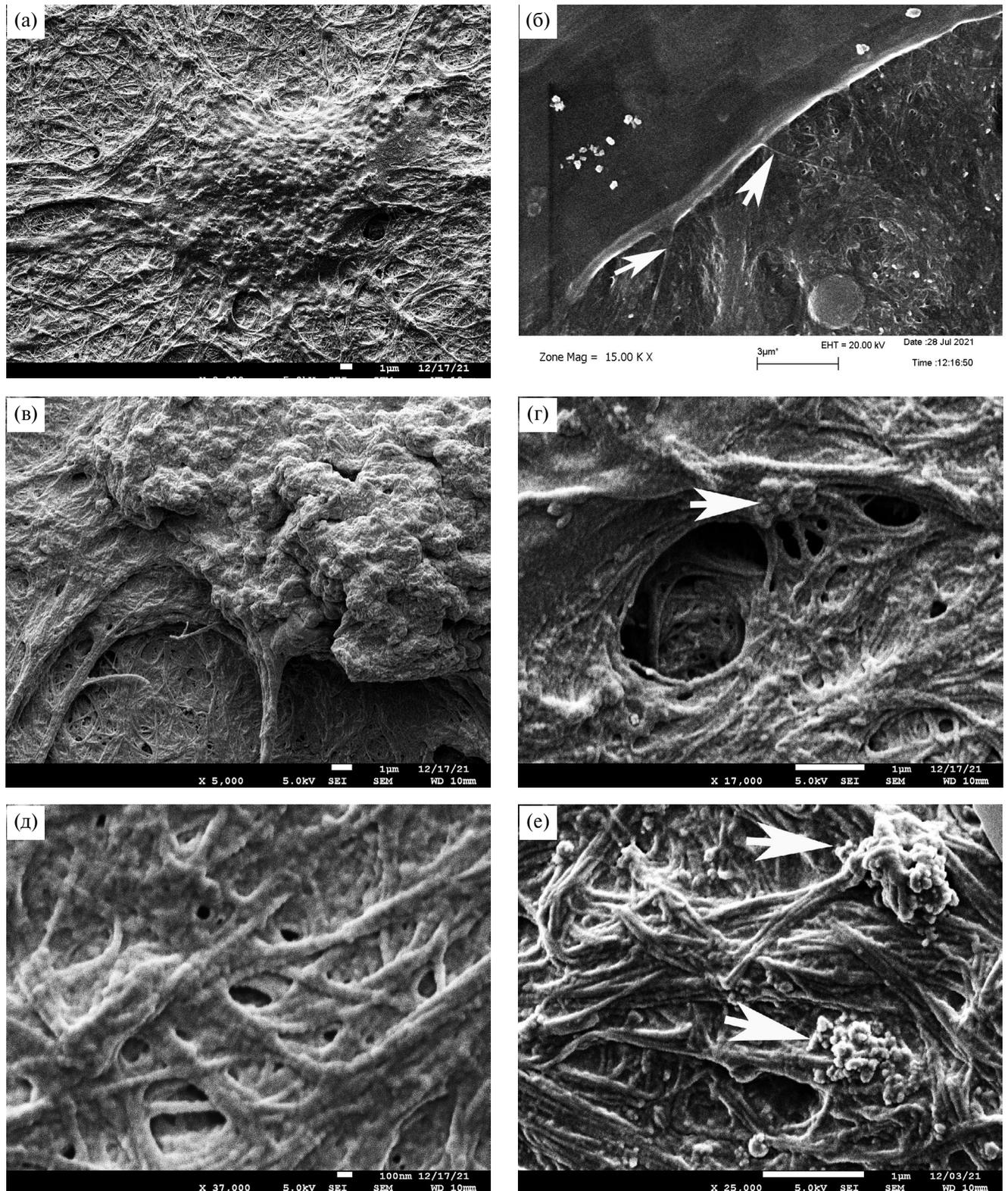


Рис. 7. СЭМ-изображения МСК и матричных везикул: (а) прикрепление посредством цитоплазматических отростков, выпускающих многослойную сеть коллагеновых волокон (ростовая среда); (б) стрелки – прикрепление посредством филоподий в виде актиновых “усов” (ростовая среда); (в) матричные везикулы, контурирующие под мембраной МСК (ростовая среда); (г) стрелка – матричные везикулы в месте экстррузии коллагенового материала (ростовая среда); (д) стрелки – гроздевидные скопления матричных пузырьков и гранул кальцийфосфатов на поверхностях коллагеновых волокон (остеогенная среда).

усоподобных цитоплазматических отростков, пронизанных нитями актина (рис. 7б). Это прямое следствие повышенной жесткости и более высокого натяжения фибриллярного коллагена (Grinnell et al., 2003). Прикрепление клеток к каркасу из перитенонового геля сходно с таковым в трехмерных культурах *in vitro*, а также в тканях *in vivo* (Hongmei, Grinnell, 2005; Langevin et al., 2005). Описанные способы прикрепления клеток опосредованы достаточно ранним действием тканеформирующих механических сигналов (жесткость и натяжение), исходящих из перитеновой подложки.

МСК активно синтезируют матриксные везикулы, что заметно в виде множества контурирующих под мембранами частиц (рис. 7в). При культивировании в ростовой питательной среде концентрирование матриксных везикул происходит вблизи МСК, они оседают на экстралируемом коллагеновом материале (рис. 7г). На остальном протяжении подложки численная плотность везикул значительно меньше – распространению везикул, возможно, препятствует высокая плотность упаковки коллагеновых фибрилл (Genin et al., 2009). При культивировании в остеогенной среде везикулы широко распространены в подложке, в которой они формируют минерализующиеся матриксные пузырьки, оседающие на поверхностях коллагеновых волокон (рис. 7д). Если в гранулах гидроксиапатит и присутствует, то скорее дефицитный по кальцию, так как минерализованные частицы склонны к дезагрегации на мелкие бесформенные гранулы, что характерно для ранних стадий первичной минерализации коллагеновых волокон (Amizuka et al., 2014). Риски гиперминерализации каркаса очевидны: падение эластичности, избыточная жесткость и хрупкость.

Теноцитойдные клетки и сухожилеподобные структуры. Теноцитойдные клетки – узкие, вытянутые, ядра их слабо контурируют под цитоплазматической мембраной, расположены эксцентрично. Диаметр клеток варьирует в пределах 7–10 мкм в широкой части. Поверхность клеток шероховата за счет множественных мелких складок, вытянутых вдоль длинной оси. Местами складки имеют вид остроконечных шиповатых цитоплазматических выступов. Отходящие из базальных поверхностей выступы выпускают тонкие коллагеновые фибриллы, которые крепят клетки к каркасу. Отметим, что веретенообразные клетки присутствуют при культивировании как в ростовой, так и в остеогенной питательных средах (рис. 8а, б). При реализации

в теногенном направлении дифференцировки по мере созревания зрелые теноциты приобретают веретенообразную форму. Элонгированная форма клеток, эксцентриситет ядер, вытянутые, изгибающиеся формы клеток положительно коррелируют с экспрессией генов и синтезом соответствующих теномаркеров (Franchi et al., 2007; Hadate et al., 2020; Eren et al., 2021). Сухожилеподобные структуры – синтезированные внутри клеток нити протоколлагена, секретированные во внеклеточный матрикс и собранные в микропучки. На начальных этапах на боковых поверхностях отростчатых клеток возникает пакет компактизированных субфибрилл, выступающий во внеклеточное пространство в области сквозных фенестр (рис. 8в). Далее коллагеновые субфибриллы, собранные в тяж толщиной 1.5–2.5 мкм, растут вдоль длинной оси, формируя шнур из плотно упакованных фибрилл, расщепляющийся на дистальном конце (рис. 8г), длина которого достигает 110–140 мкм. Приведенные особенности роста, форма и размеры микропучков подобны эмбриональным зачаткам сухожилий, появляющимся также и в регенерирующих сухожилиях (Ingraham et al., 2003; Bayer et al., 2010).

Лигаментоподобные структуры – группы волокон, расположенных параллельно друг другу в виде прочно склеенных лент – коллагеновых полос (Heubeli et al., 2016). Основная часть лент расположена на поверхности подложки, но чаще над крупнозернистыми частицами кальцийфосфатов, погруженных в коллагеновый каркас (рис. 8д). Отметим, что лигаментоподобные структуры встречены при культивировании в остеогенной среде, где они реализуют главное филогенетическое предназначение: *in vivo* – ограничение избыточной подвижности связываемых компонентов (суставов), *in vitro* – сдерживание распада конгломератов кальцийфосфатов и изоляция их отложений. Морфогенез лигаментоподобных структур при культивировании *in vitro* во многом не ясен. Но точно известно, что они представляют собой производные фибробластов, трансформирующихся в конечном итоге в лигаментоциты, с редуцированными формами которых коллагеновые полосы образуют скрученные вдоль длинной оси структуры (Benjamin, Ralphs, 2000; Tresoldi et al., 2013). Аналогичные структуры обнаружены и в каркасе в виде неправильной формы клубков с закрученными и слившимися вплоть до полной гомогенизации волокнами, составляющими неразделимую часть прилежащих коллагеновых полос, прояв-

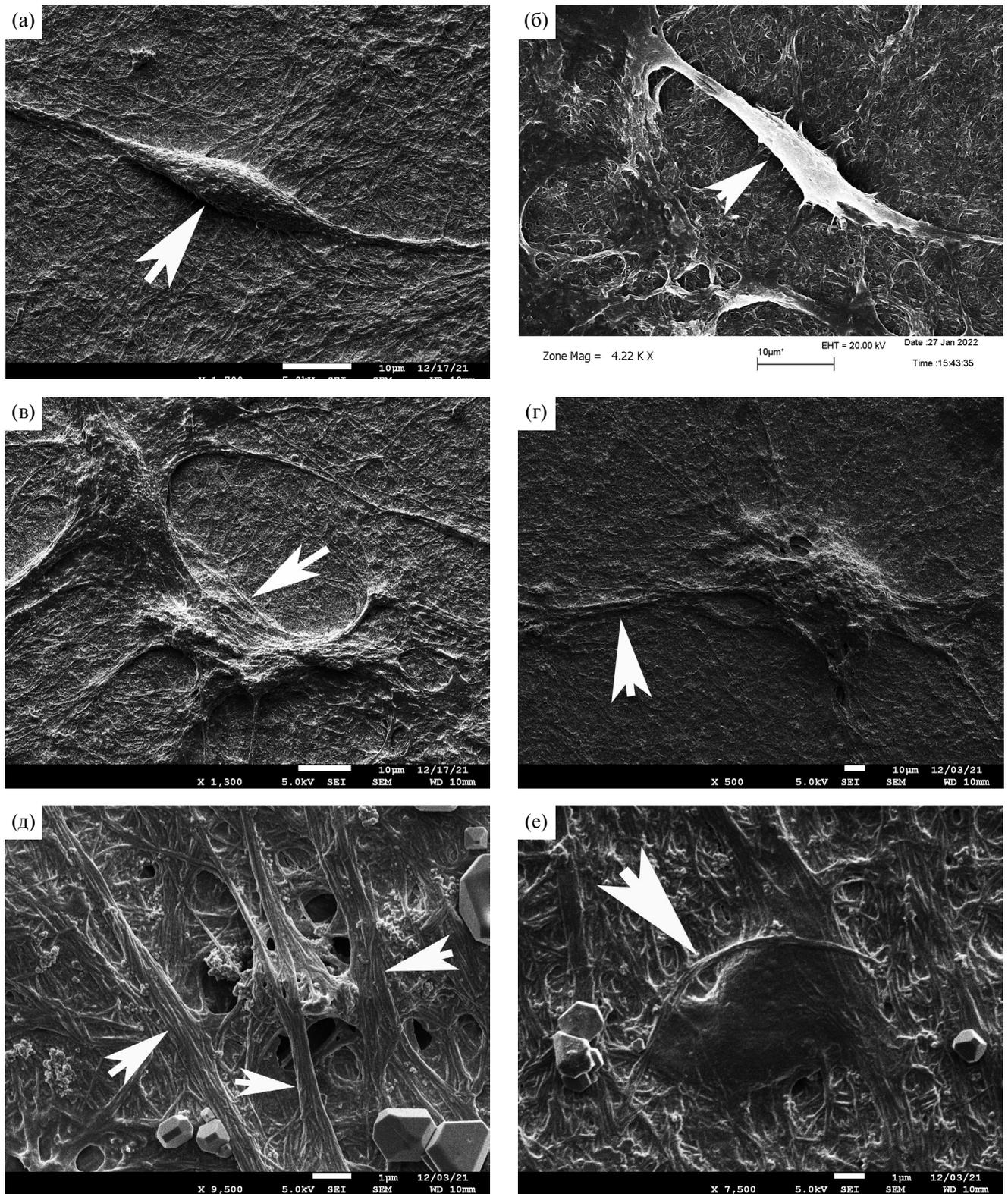


Рис. 8. СЭМ-изображения тено- и лигаментоподобных структур в коллагеновом каркасе: (а) стрелка – веретенообразная клетка (ростовая среда); (б) стрелка – веретенообразная клетка (остеогенная среда); (в) стрелка – коллагеновые субфибриллы, собранные на боковой поверхности отростчатой клетки (ростовая среда); (г) стрелка – отростчатая клетка с расщепленным минерализованным отростком (ростовая среда); (д) стрелки – лигаментоподобные структуры, “переброшенные” через конгломерат кальцийфосфатов (остеогенная среда); (е) стрелка – лигаментоподобная полоска ассоциации с клубком и эластическим волокном (остеогенная среда).

ляющих также и повышенный аффинитет к эластическим волокнам (рис. 8е).

Остеоидные образования – полиморфные структуры в виде ламелл, трабекул и костных узелков, гистогенетически связанные с остеоцитоподобными клетками, продуцирующими фибриллярный коллаген. Ламеллы – пластинчатые структуры, выталкиваемые в экстрацеллюлярное пространство из боковых отделов клеток (рис. 9а). Размеры ламелл варьируют в пределах 5–15 мкм. Форма зрелых ламелл полигональная, краевые отделы уплотнены и частично минерализованы, дистальные отделы структурированы в коллагеновый каркас. Основными отличиями от компактных пластинок можно считать гистогенетическую связь с клетками, наличие отверстий гаверсоподобных каналов, отростчатую форму и минерализацию (рис. 9б). Трабекулы – это вытянутые в виде костных балок фиброзные тяжи, образованные плотно упакованными коллагеновыми фибриллами (рис. 9в). Длина трабекул – 30–70 мкм, ширина в срединных участках – 3–11 мкм. Анатомически трабекулы составляют часть компактизированных коллагеновых пучков, исходящих из МСК, дифференцирующихся в остеоцитарном направлении. На это указывает ветвящаяся форма клеток с множественными цитоплазматическими отростками, продолжением апикальных отделов которых служат минерализованные коллагеновые пучки. Костные узелки – это локальное скопление вытянутых клеток с хорошо развитыми цитоплазматическими отростками. В условиях *in vivo* подобные структуры возникают в эмбрионах и регенерирующей костной ткани (Wang et al., 2021). Особенность узелков состоит в наличии межклеточных мостиков, образованных цитоплазматическими отростками, переплетающихся с коллагеновыми волокнами и формирующих плотно упакованные смешанные структуры. Структура сети межклеточных цитоплазматических отростков слоистая. В глубинных слоях отростки широкие, короткие, выпускающие тонкие коллагеновые волокна, вплетающиеся в коллагеновый каркас подложки. Поверхностные слои остеоподобных узелков при культивировании в остеогенной среде образованы минерализованными остеоцитоподобными клетками, выпускающими узкие (шириной 150–250 нм), короткие (2–6 мкм) цитоплазматические отростки, имеющие вид спикул эмбриональных остеоцитов (рис. 9г). Дистальные оконечности спикул либо вплетены в коллагеновый каркас (рис. 9д), либо посредством дигитаций

прикреплены к прилежащим трабекулоподобным структурам (рис. 9е). Оссифицирующиеся узелковые структуры заметны при культивировании как в ростовой, так и в остеогенной среде, но исключительно на перитеноновой подложке. В ростовой среде цитоплазматические отростки образуют рыхлую сеть, в остеогенной – сплошную (рис. 10а, б). В ростовой среде активность щелочной фосфатазы средняя (рис. 10в) и высокая – в остеогенной (рис. 10г). Внеклеточный матрикс вокруг цитоплазматических отростков уплотнен, насыщен кальцийфосфатами, что позволяет предположить формирование аморфизированных фракций гидроксиапатита, обнаруживаемых и на более поздних стадиях созревания костных узелков (Ghita et al., 2014). В трабекулоподобных образованиях, в цитоплазматических отростках остеоидных узелков сдвиг границ минерализации прослежен в проксимально-дистальном направлении, что отражает не только соответствующий градиент жесткости минерализующихся волокон, но и механизм формирования непрерывной минеральной связности, перемещающейся от одного конца волокна к другому (Genin et al., 2009). Интенсивность минерализации, ее направленность, а также преимущественно внутриклеточная локализация свидетельствуют о том, что эти процессы происходят по механизму внутримембранозной минерализации и оссификации на ранних стадиях. Все пластинчатые и трабекулоподобные остеоидные структуры перфорированы сквозными отверстиями с гладкими краями. Гаверсификация и минерализация, несомненно, упрочняют остеоидные структуры и составляют важный механизм твердотельной организации оссифицирующихся образований.

Энтезоподобные структуры – это структуры, которые обеспечивают скрепление в межфазной зоне механически разнородной переходной ткани (Rossetti et al., 2017). В условиях *in vitro* энтезоподобные структуры возникают при культивировании на перитеноновой подложке преимущественно в остеогенной среде в виде четко оформленных по характеру минерализации переходных зон в области скрепления остеоидных образований с коллагеновым каркасом. Ламеллы фиксированы по механизму инфильтрации компактизированных отростков вглубь коллагенового каркаса (рис. 11а). В области прикрепления трабекулоподобных образований к каркасу прослежены гребневидные структуры: дистальные оконечности трабекул расширены и веерообразно расплетены на 3–5 отростков, обра-

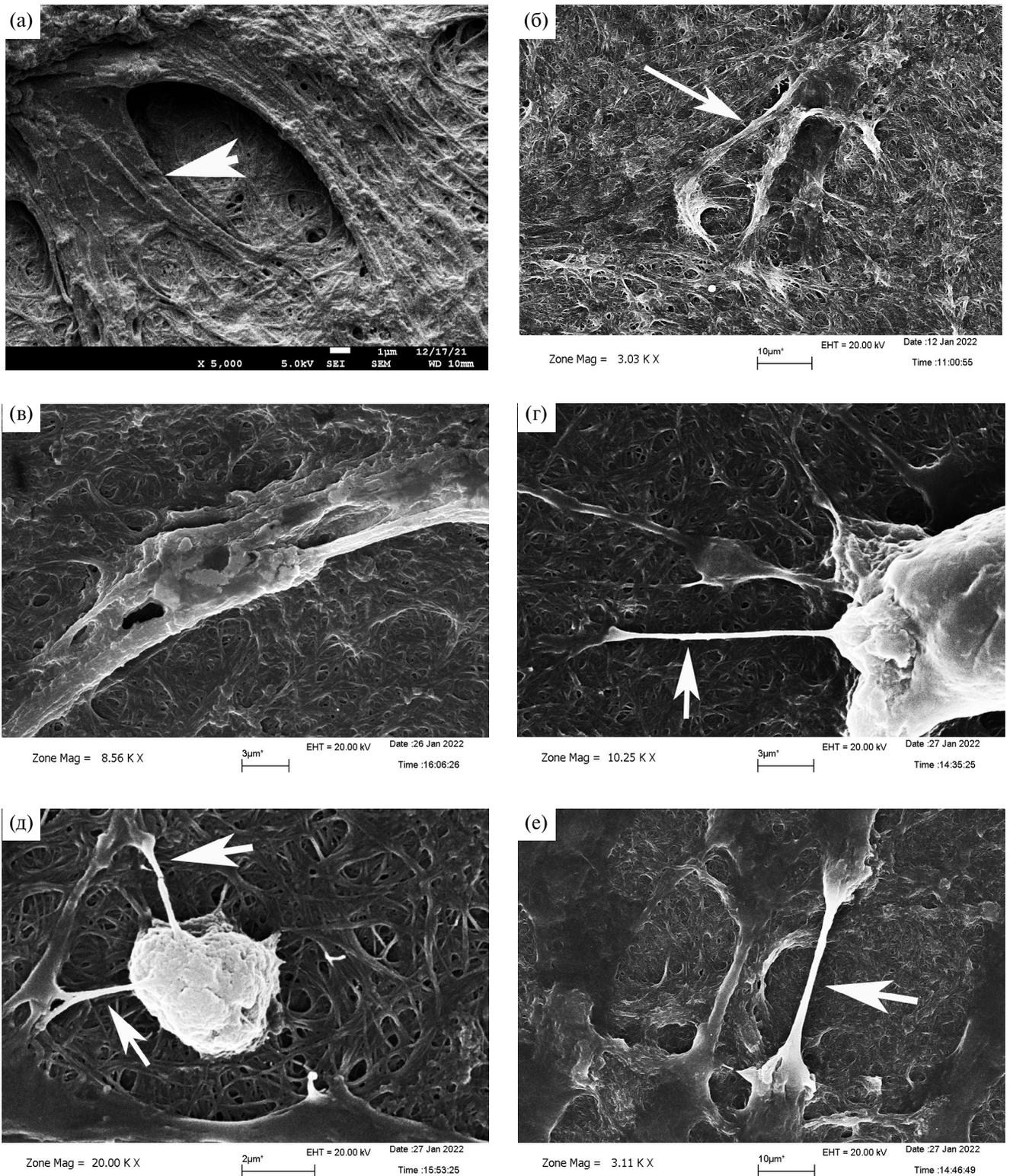


Рис. 9. СЭМ-изображения остеоидных структур: (а) стрелка – пластинчатая структура, выталкиваемая из МСК (ростовая среда); (б) стрелка – ламелла с минерализованными краевыми отделами (ростовая среда); (в) минерализованная костная трабекула с гаверсоподобными отверстиями (ростовая среда); (г) стрелка – спикула, встроенная в коллагеновый каркас (остеогенная среда); (д) стрелки – спикулы, соединяющие минерализованную остеоцитоподобную клетку с трабекулой (остеогенная среда); (е) стрелка – спикула, соединенная дигитацией с клеткой (остеогенная среда).

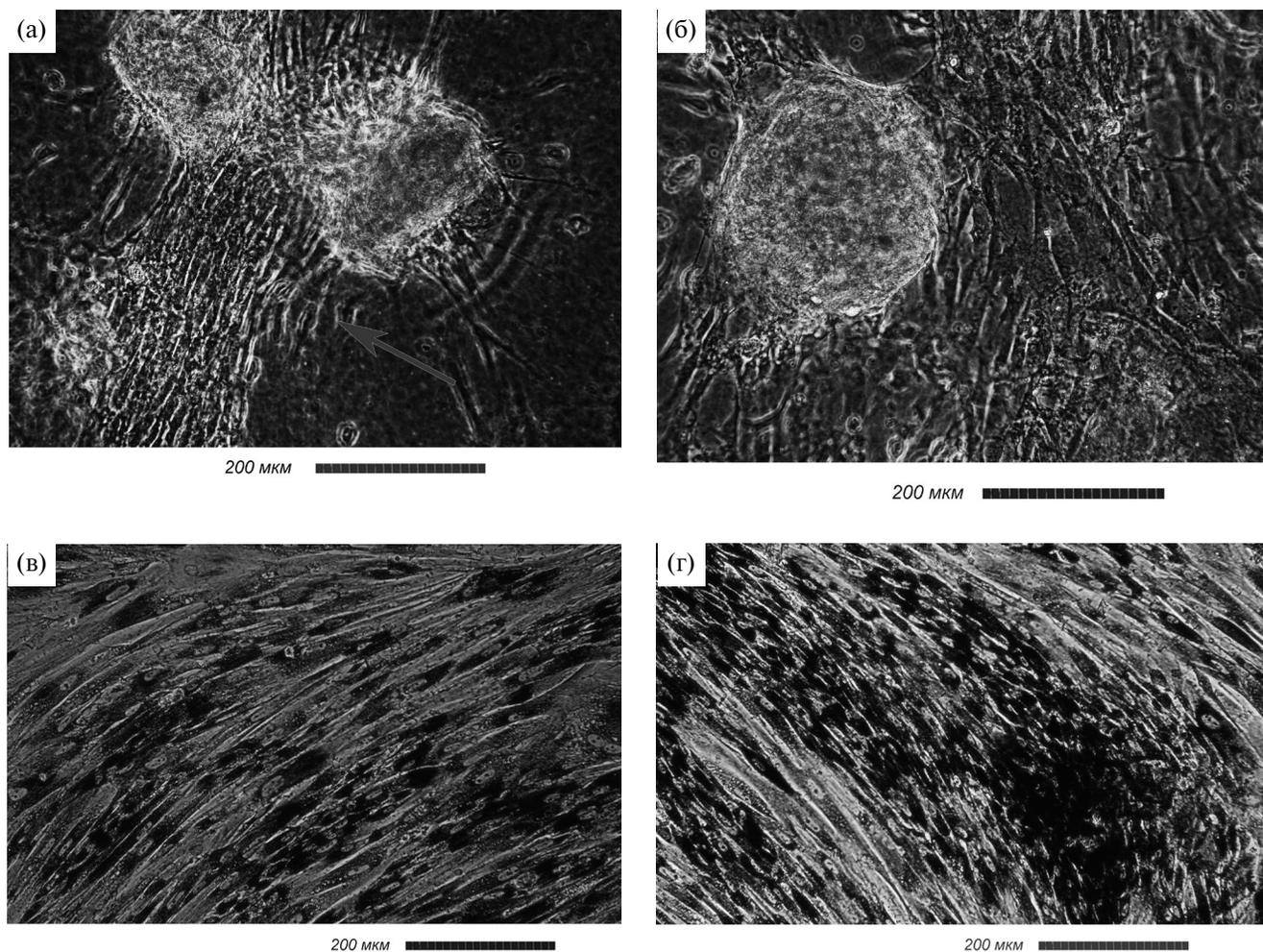


Рис. 10. Светомикроскопические изображения структуры остеоподобных узелков и отложений диформаза: (а) рыхлая сеть цитоплазматических отростков в узелке (ростовая среда); (б) плотная сеть цитоплазматических отростков в узелке (остеогенная среда); (в) средняя активность щелочной фосфатазы в клетках узелков (ростовая среда); (г) высокая активность щелочной фосфатазы в клетках узелков (остеогенная среда).

зованных коллагеновыми фибриллами плотно упакованных в пучки 1–2 уровней организации сухожильных нитей. В области стыка пучки имеют тонкие ответвления, которые вплетены в фибриллярный каркас (рис. 11б). Структурно-механическое значение данных конструкций очевидно. Инфильтрация – это достаточно примитивный (архаичный) механизм прикрепления. Гребневидная, веерообразно сплетенная конструкция позволяет равномерно распределить энергию натяжения на большую площадь зачатка энтезиса и, это явно более зрелый способ прикрепления. Взаимоотношение волокон в крепежных конструкциях не случайно, так как оно схоже с анатомической динамикой волокон Шарпье в фиброзных сухожильно-костных соединениях (Aarón et al., 2012). Формирова-

ние структур, скрепляющих разнородную ткань с перфорацией волокон в ранние сроки культивирования, свидетельствует о том, что энтезисы надкостничного типа можно отнести к одной из наиболее архаичных форм сухожильно-костных соединений. В формировании энтезоподобных структур имеют значение особенности минерализации, в частности, минеральный градиент, который возникает из-за внутренней шероховатости поверхности коллагеновых фибрилл, способствует осаждению, нуклеации и замедляет движение кальцийфосфатов, перемещаясь, по данным СЭМ, по направлению к границам раздела фаз. Описанные структуры схожи с “эмбриональными единицами” межфазных прикреплений, но, учитывая предельную незрелость, структуры можно отнести не более чем к предик-

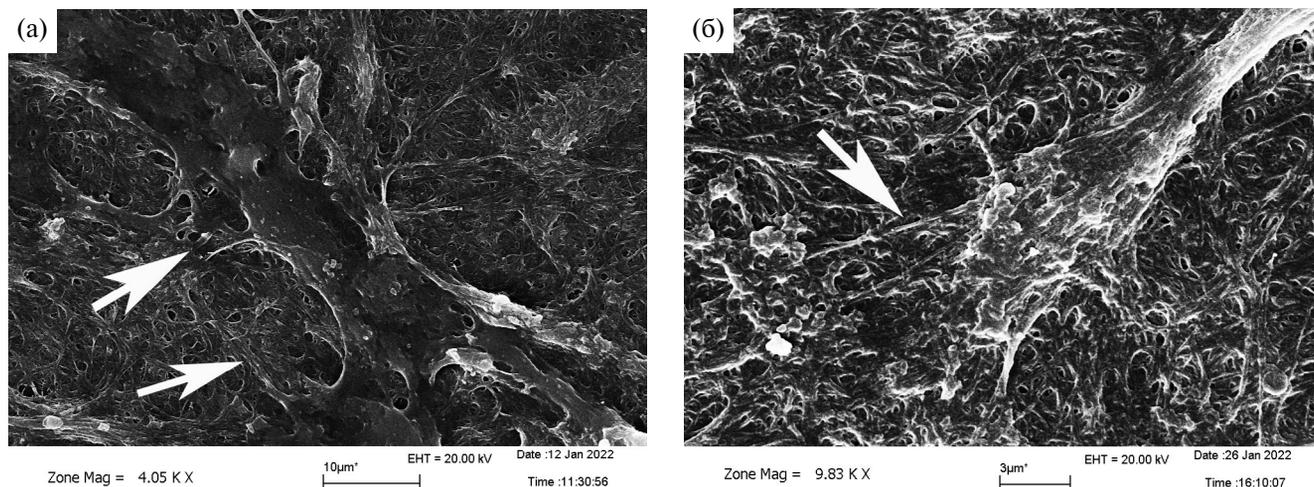


Рис. 11. СЭМ-изображения энтезоподобных структур (остеогенная среда): (а) стрелки – ламелла, прикрепленная к коллагеновому каркасу посредством инфильтрации компактизированных отростков вглубь перитеноновой подложки; (б) стрелка – гребневидная структура в области стыка трабекулы с коллагеновым каркасом.

торам костно-сухожильных энтез (Zelzer et al., 2014). Принципиально важно, что в сегрегации, направленном росте, крепежных конструкциях и минерализации участвуют коллагеновые волокна, синтезированные *de novo*. Это значит, что морфогенетические истории протоэнтез в условиях *in vitro* определены: коллагеновый материал зарождающихся межфазных скреплений метаболически и топологически сенсibilизирован к восприятию механических импульсов и их градиентов. Среди метаболических факторов главные – это склераксис и Sox9 – хорошо известные индукторы энтез (Murchison et al., 2007; Blitz et al., 2009). Применительно к топологической сенсibilизации, речь идет об автономном и/или взаимообусловленном структурировании, увеличивающем жесткость подложки, – одного из ключевых факторов, запускающего трансформирующие процессы твердотельной направленности в клетках и экстрацеллюлярном матриксе.

ОБСУЖДЕНИЕ

Вышеприведенные результаты свидетельствуют о том, что при культивировании *in vitro* совместно с МСК коллагеновый каркас перитеноновой подложки, будучи неоднородным по происхождению фибриллярного коллагена, тем не менее, реализует единый механизм структурно-молекулярных преобразований. Нет сомнений, что таковой определен самосборкой фибриллярного коллагена, осуществля-

емой: 1) в порядке ренатурации перитенонового геля, продолжающейся в подложке (для коллагена, привнесенного в подложку с гелем); 2) ассамблирования фибриллярного коллагена, синтезированного *de novo* МСК. Различное происхождение фибриллярного коллагена определяет вариации таких свойств, как чувствительность к действию морфогенетических сигналов, темпы формообразования, способность к удержанию в дифференцированном состоянии и главное – направленность структурообразующих трендов. Динамика формообразования, по крайней мере резидентных клубков, близка к обратной сигмоиде Гомперца, поскольку удельная площадь поверхности (S_v) структур прямо пропорциональна энтропии, но обратна их упорядоченности. На рис. 12 приведена обратная сигмоида с отчетливо выраженными фазами задержки структурирования: стагнация показателя S_v в области малых размеров (размерные ранги 1, 2, 3, табл. 2, рис. 12) и ускоренного структурирования: снижение показателя S_v по мере роста размеров клубков (4-й, 5-й размерные ранги, табл. 2). Это коррелирует с динамикой фибриллогенеза коллагена и обосновывает единый механизм структурирования коллагеновых материалов (Zhu et al., 2018). Сигмоидальная динамика (S_v), в свою очередь, свидетельствует о том, что отдельные формы в коллагеновых каркасах построены по механизму структурного насыщения и скачкообразного формообразования. Морфометрически упорядочивающимся областям свойственно локальное падение показателя S_v .

В относительно простых структурах (размером до 1 мкм) численные значения S_v не превышают 7% относительно соответствующих значений рядом расположенных участков каркаса (табл. 1, 2). Но на этом этапе важно не то, насколько форм много или мало, а то, что они разнотипны. Вовлечение в процессы структурирования нескольких типов зарождающихся форм свидетельствует о системности, а небольшой статистический размах колебаний S_v — о невысокой энергетичности. Это позволяет признать показатель S_v чувствительным маркером малых, но морфогенетически значимых структурных сдвигов, энергии которых может быть достаточно для пороговой морфологической индивидуации — фибриллярные протоузлы, конвергированные и компактные пластинки в пределах разрабатываемой классификации переходят в таксономически видимые.

Присутствие дифференцирующихся МСК — это фундаментальная предпосылка для микроэволюционных преобразований коллагенового каркаса. В целом, не известно, вероятны ли в условиях культур *in vitro* микроэволюционные процессы и насколько они релевантны с макроэволюцией. Нет понимания специфики микроэволюционной изменчивости и ее динамики: непрерывная и/или “урывками” (Hendry, Kinnison, 2001). Совместное с МСК культивирование коллагеновых каркасов призвано повысить

вероятность микроэволюционных событий, при изучении которых целесообразно учитывать некоторые предпосылки и методологические допущения. Основная предпосылка — малый масштаб (в пространстве и времени), приближающий разноразмерные уровни к рассмотрению сразу, а объект и окружающую среду наблюдать не раздельно, а вместе. Не менее важно и то, что культивирование осуществляют в средах с детерминированными колебаниями состава и свойств, которые претерпевают истощение и пополнение. В макросредах такого рода срабатывают механизмы эволюционного спасения, снижающие риски эволюционного “самоубийства” (Marrec, Bank, 2023). В микросредах и, в частности в структурирующемся каркасе, эволюционное спасение сублимировано в спасение морфогенетическое, сдерживающее распад и повышающее значимость структур. В итоге структуры фиксированы в дифференцированном состоянии, чему способствуют и скаффолды — “строительные леса”. В коллагеновых каркасах, культивируемых *in vitro*, эту опцию выполняют коллаген-цитоплазматические оплетки, иммобилизующие сфероиды и костные узелки, которые по мере созревания сбрасывают скаффолды. Понимание эволюции как развития, генерирующего и модулирующего структурные вариации (Willmore, 2012), в большей мере отражает процессы усложнения, протекающие в коллагеновом каркасе. С учетом этого коллагеновый каркас, возможно, представляет собой поле структурообразующих треков, сходящихся в аттракторах. По направлениям структурирования аттракторы плюрипотентны, морфологически не оформлены, эмерджентны — возникают внезапно и в разное время. Ключевой функционал — рецепция скачков сложности. В макроэволюции аттракторы мониторят жизнеспособные потенциалы, осуществляя их захват (Ferriere, Legendre, 2013). В тканевых культурах *in vitro* аттракторы мониторят центры структурирования, осуществляя захват того, что Вольперт (Wolpert, 2016) называет “позиционной информацией”. Точки роста сформированы упорядочивающимися областями, которые по выражению Шредингера экспортируют (минимизируют) структурную энтропию (Kauffman, 2020). В формате микро-макроэволюционных соотношений допустимо, что в ходе преобразований структуры экзантируют, коллажируют и фуркатируют — инструментарий, углубляющий интерпретации эволюционного усложнения. Экзантирующие структуры возникают путем

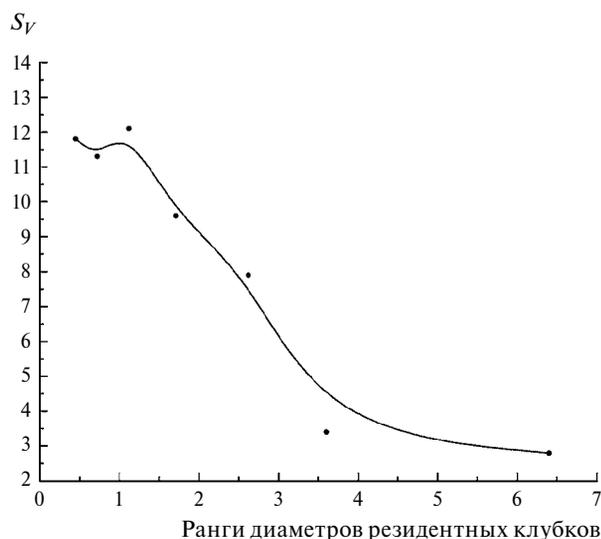


Рис. 12. Графическое изображение обратной сигмоиды Гомперца, отражающей взаимосвязь удельной площади поверхности (S_v) и диаметров (приведенных в рангах) резидентных клубков при культивировании перитеноновой подложки совместно с МСК в течение 14 сут в ростовой среде.

прибавления к исходной функции дополнительных опций – “экзаптации сложения” (Arnold et al., 1994). По критерию морфологического сходства к таким структурам отнесены фибриллярные узлы и резидентные клубки. Исходная функция узлов – рецепция механических импульсов. Дополнительные опции (скорее вложение одной функции в другую) – изоляция структурных последствий механического напряжения и удаление отработанного материала. Экзаптируют и сфероиды: в ростовой среде они бесполезны как спандрелы (Gould, Lewontin, 1979; Durston, 2020). В остеогенной среде, насыщенной морфогенами, сфероиды активируют дополнительные опции, например, синтез гидроксиапатита. Коллаж – сборка надмолекулярных структур из присутствующего коллагена. Коллаж не предполагает молекулярную однородность собираемого материала, но допускает разделение (Gregory, 2008). В отдаленных окрестностях морфогенетических градиентов или, если материал слабо чувствительный к тканеспецифическим сигналам, повышена вероятность формирования разнородных сегрегатов. Так возникают конвергированные пластинки с минимальным набором переходных структур. В ближайших окрестностях морфогенетических градиентов детерминация усилена, а плюрипотентность аттракторов ограничена. Здесь для фибриллярного коллагена, прежде всего, синтезированного *de novo*, реализованы условия к объединению в тканеподобные образования. Таковы концентрические пластинки, у которых число переходных структур еще меньше, но таксономически они более оформлены. Таким образом, при коллажировании происходит построение форм, склонных к фуркатированию, морфогенетическая судьба которых зависит от особенностей позиционного информирования, захватывающего паттерны субпорогового уровня морфологической индивидуации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Коллагеновый каркас, полученный из перитенонового геля, подвержен структурированию с формированием гистонеспецифических пластинчатых и клубковых образований. Этот процесс организует коллагеновый материал, синтезированный в дифференцированных клетках при совместном культивировании и встраивающийся в подложку. Формирование типовых структур коллагенового каркаса в пространстве происходит в очагах механического напряже-

ния, а в динамике культивирования – в соответствии с механобиологическими трендами эволюции соединительной ткани. Организация коллагенового каркаса протекает по следующим направлениям: а) повышение механосенситивности – рост связности фибриллярных узлов, формирование конвергированных пластинчатых образований; б) увеличение прочности – формирование компакт-пластинок; в) оптимизация охвата коллагеновой сети – формирование резидентных клубковых образований; г) канализация гидродинамических потоков – формирование концентрических пластинчатых образований. Проникшие из перитенонового геля в культуральную коллагеновую подложку сесамовидные сфероиды стимулируют структурирование кальцийфосфатов по механизмам гомо- и гетерогенной нуклеации, что эксклюзивно отражает остеогенез на стадиях организации его надмолекулярных структур.

МСК костного мозга при культивировании на подложке, полученной из перитенонового геля, проявляют тканеспецифическую активность по морфогенетическим векторам фибро-, тендо-, лигаменто- и остеогенной дифференцировки. Фиброгенный вектор направлен на обеспечение коллагеновым материалом эволюционно выработанных механических свойств опорной ткани. Фиброгенный вектор реализован путем синтеза фибриллярного коллагена и стимулирования процессов его структурирования в составе подложки. Теногенный вектор направлен на формирование сухожилий эмбрионального типа. Специфическим механизмом теногенной дифференцировки считают латеральную самосборку коллагеновых субфибрилл на наружных боковых поверхностях клеток и их автономизация в виде зачатков сухожильных нитей. Типовой структурой лигаментоподобных зачатков стали коллагеновые полосы, запутанные в клубки, ассоциированные с эластическими волокнами. Остеогенный вектор направлен на формирование ламеллярных, трабекулоподобных и узелковых остеоидных структур. Остеогенный вектор опосредован механизмом внутримембранозной оссификации, сопровождающейся внутри- и внеклеточной самосборкой коллагеновых массивов, экструзии, гаверсификации и фронтальной минерализации. Морфологический стартап энтезоподобных образований – это формирование веерообразных волокнистых комиссур между разнофазными компонентами: минерализованными спиколоподобными цитоплазматическими отростками между остеоци-

топодобными клетками, минерализованными остеонидными ламеллами, трабекулами и коллагеновыми волокнами каркаса. Основным механизмом прикрепления зарождающихся энтезис с каркасом служат дигитации в составе гребешковых структур.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.б.н. Ю.А. Нащекиной за организацию и проведение работ по получению коллагенового геля, а также старшему научному сотруднику Физико-технического института им. А.Ф. Иоффе РАН, к.ф.-м.н. А.В. Нащекину за содействие в проведении электронной микроскопии на микроскопе JSM-7001F (Jeol, Япония). Особая благодарность доктору философских наук О.Н. Гайдаш за глубокое и полезное обсуждение проблем эволюционной биологии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований “Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорхимия” по заданию 2.1.04.7 на 2021–2025 гг. (ИОНХ НАН Б, НИИ ФХП БГУ, Институт физиологии НАН Б), Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FMFU-2021-0008 (ИНЦ РАН).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интереса.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование выполнено с использованием биологического материала, полученного от лабораторных крыс Вистар, выращенных в питомнике “Рапполово” (Санкт-Петербург, Россия), где животных содержали, подвергали эвтаназии и утилизировали в соответствии с требованиями “Положения о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании” от 24.07.2000 № 554 (постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 27.10.2020 № 32 “Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил и норм СанПиН 2.3/2.4.3590-20”). Протоколы экспериментов утверждены этическим комитетом Института физиологии НАН Беларуси и соответствуют нормативным документам Республики Беларусь (Нац. реестр правовых актов Республики Беларусь. 2012. № 8/25189).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина, 1990. 384 с.

Гайдаш А.А., Крутько В.К., Блинова М.И. и др. Структура и физико-химические свойства паравертбральных сухожилий // Цитология. 2022. Т. 64 (3). С. 249–261.

Кухарева Л.В., Парамонова Б.А., Шамолина И.И., Семенова Е.Г. Способ получения коллагена для лечения патологий тканей организма. Патент РФ № 2214827, 15.03.2002; опубл. 27.10.2003 г., бюл. № 30.

Aaron J.E. Periosteal Sharpey’s fibers: a novel bone matrix regulatory system? // Front. Endocrinol. 2012. V. 3. P. 98 (1–10).

Amizuka N., Hasegawa T., Yamamoto T., Oda K. Microscopic aspects on biomineralization in bone // Clin. Calcium. 2014. V. 24 (2). P. 203–214.

Arnold E.N. Investigating the origins of performance advantage: adaptation, exaptation and lineage effects // Phylogenetics and ecology. London: Academic Press, 1994. P. 123–168.

Bayer M.L., Yeung Ch.C., Kadler K.E. et al. The initiation of embryonic-like collagen fibrillogenesis by adult human tendon fibroblasts when cultured under tension // Biomaterials. 2010. V. 31. P. 4889–4897.

Beningo K.A., Dembo M., Wang Y.L. Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors // PNAS USA. 2004. V. 101 (52). P. 18024–18029.

Benjamin M., Ralphs J.R. The cell and biology of tendons and ligaments // Int. Rev. Cytol. 2000. V. 196. P. 85–130.

Benjamin M., Ralphs J.R. Enteses – the bony attachments of tendons and ligaments // Ital. J. Anat. Embryol. 2001. V. 106. P. 151–157.

Benjamin M., Kumai T., Milz S., Boszczyk B.M. The skeletal attachment of tendons – tendon enteses // Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. 2002. V. 133 (4). P. 931–945.

Blitz E., Viukov S., Sharir A. et al. Bone ridge patterning during musculoskeletal assembly is mediated through SCX regulation of Bmp4 at the tendon-skeleton junction // Dev. Cell. 2009. V. 17 (6). P. 861–873.

Chandrakasan G., Torchia D.A., Piez K.A. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution // J. Biol. Chem. 1976. V. 251 (19). P. 6062–6067.

Djabourov M., Lechaire J.P., Gaill F. Structure and rheology of gelatin and collagen gels // Biorheology. 1993. V. 30 (3–4). P. 191–205.

Durston A.J. A Tribute to Lewis Wolpert and his ideas on the 50th anniversary of the publication of his paper ‘Positional information and the spatial pattern of differentiation’. Evidence for a timing mechanism for setting up the vertebrate anterior-posterior (A-P) axis // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21 (7). P. 2552.

- Eren A.D., Vasilevich A., Eren E.D. et al.* Tendon-derived biomimetic surface topographies induce phenotypic maintenance of tenocytes *in vitro* // *Tiss. Eng. Part A*. 2021. V. 27 (15–16). P. 1023–1036.
- Ferriere R., Legendre S.* Eco-evolutionary feedbacks, adaptive dynamics and evolutionary rescue theory // *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2013. V. 368 (1610). P. 20120081.
- Franchi M., Trirè A., Quaranta M. et al.* Collagen structure of tendon relates to function // *Sci. World J.* 2007. V. 7. P. 404–420.
- Genin G.M., Kent A., Birman V. et al.* Functional grading of mineral and collagen in the attachment of tendon to bone // *Biophys. J.* 2009. V. 97 (4). P. 976–985.
- Ghita A., Pascut F.C., Sottileb V., Notingher I.* Monitoring the mineralisation of bone nodules *in vitro* by space- and time-resolved Raman micro-spectroscopy // *Analyst*. 2014. V. 139 (1). P. 55–58.
- Golub E.E., Boesze-Battaglia K.* The role of alkaline phosphatase in mineralization // *Curr. Opin. Orthop.* 2007. V. 18 (5). P. 444–448.
- Gould S.J., Lewontin R.C.* The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme // *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1979. V. 205. P. 581–598.
- Gregory T.R.* Evolutionary trends // *Evo. Edu. Outreach*. 2008. V. 1. P. 259–273.
- Grinnell F., Ho C.H., Tamariz E. et al.* Dendritic fibroblasts in three-dimensional collagen matrices // *Mol. Biol. Cell*. 2003. V. 14. P. 384–395.
- Gundersen H.J., Bendtsen T.F., Korbo L. et al.* Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis // *APMIS*. 1988. V. 96 (5). P. 379–394.
- Hadate S., Takahashi N., Kametani K. et al.* Ultrastructural study of the three-dimensional tenocyte network in newly hatched chick Achilles tendons using serial block face-scanning electron microscopy // *J. Vet. Med. Sci.* 2020. V. 82 (7). P. 948–954.
- Hendry A.P., Kinnison M.T.* An introduction to microevolution: rate, pattern, process // *Genetica*. 2001. V. 112–113. P. 1–8.
- Heybeli N., Kömür B., Yılmaz B., Olcay G.* Tendons and ligaments // *Musculoskeletal Research and Basic Sci.* 2016. P. 465–482.
- Hongmei J., Grinnell F.* Cell-matrix entanglement and mechanical anchorage of fibroblasts in three-dimensional collagen matrices // *Mol. Biol. Cell*. 2005. V. 16 (11). P. 5070–5076.
- Ingraham J.M., Hauck R.M., Ehrlich H.P.* Is the tendon embryogenesis process resurrected during tendon healing? // *Plast. Reconstr. Surgery*. 2003. V. 112. (3). P. 844–854.
- Iwayama T., Bhongsatiern P., Takedachi M., Murakami S.* Matrix vesicle-mediated mineralization and potential applications // *J. Dental Res*. 2022. V. 101 (13). P. 1554–1562.
- Kaufman S.* Answering Schrödinger's question What is life? // *J. Entropy*. 2020. V. 22 (8). P. 815.
- Langevin H.M., Bouffard N.A., Badger G.J. et al.* Dynamic fibroblast cytoskeletal response to subcutaneous tissue stretch *ex vivo* and *in vivo* // *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2005. V. 288. P. 747–756.
- Li Y., Asadi A., Monroe M.R., Douglas E.P.* pH effects on collagen fibrillogenesis *in vitro*: electrostatic interactions and phosphate binding // *Mater. Sci. Engin. C*. 2009. V. 29 (5). P. 1643–1649.
- Marrec L., Bank C.* Evolutionary rescue in a fluctuating environment: periodic *versus* quasi-periodic environmental changes // *Proc. Biol. Sci.* 2023. V. 290 (1999). P. 20230770.
- Mienaltowski M.J., Adams S.M., Birk D.E.* Tendon proper and peritenon-derived progenitor cells have unique tenogenic properties // *Stem. Cell. Res. Ther.* 2014. V. 5 (4). P. 86 (1–15).
- Murchison N.D., Price B.A., Conner D.A. et al.* Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons // *Development*. 2007. V. 134 (14). P. 2697–2708.
- Peritenon // Merriam-Webster.com Medical Dictionary, Merriam-Webster, <https://www.merriam-webster.com/medical/peritenon>. Accessed 27 Jan. 2024.
- Ronsin O., Caroli C., Baumberger T.* Preferential hydration fully controls the renaturation dynamics of collagen in water-glycerol solvents // *Eur. Phys. J.* 2017. V. 40. P. 55 (1–5).
- Rossetti L., Kuntz L.A., Kunold E. et al.* The microstructure and micromechanics of the tendon-bone insertion // *Nat. Mater.* 2017. V. 16 (6). P. 664–670.
- Schweitzer R., Chyung J.H., Murtaugh L.C. et al.* Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments // *Development*. 2001. V. 128 (19). P. 3855–3866.
- Summers A.P., Koob T.J.* The evolution of tendon – morphology and material properties // *Comp. Biochem. Physiol. Part A*. 2002. V. 133 (4). P. 1159–1170.
- te Nijenhuis K.* Investigation into the ageing process in gels of gelatin/water systems by the measurement of their dynamic moduli // *Coll. Polymer Sci.* 1981. V. 259. P. 522–535.
- Tosh S.M., Marangoni A.G., Hallett F.R., Britt I.J.* Aging dynamics in gelatin gel microstructure // *Food Hydrocoll.* 2003. V. 17 (4). P. 503–513.
- Tresoldi I., Oliva F., Benvenuto M. et al.* Tendon's ultrastructure // *Muscl. Ligamen. Tendons J.* 2013. V. 3 (1). P. 2–6.

- Wang K., Ren Y., Lin S. et al. Osteocytes but not osteoblasts directly build mineralized bone structures // *Int. J. Biol. Sci.* 2021. V. 17 (10). P. 2430–2448.
- Willmore K.E. An introduction to evolutionary developmental biology // *Evo. Edu. Outreach.* 2012. V. 5. P. 181–183.
- Wilson S.L., Guilbert M., Sulé-Suso J. et al. A microscopic and macroscopic study of aging collagen on its molecular structure, mechanical properties, and cellular response // *FASEB J.* 2014. V. 28. P. 14–25.
- Wolpert L. Positional information and pattern formation // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2016. V. 117. P. 597–608.
- Zelzer E., Blitz E., Killian M.L., Thomopoulos S. Tendon-to-bone attachment: from development to maturity // *Birth. Defect. Res. (Part C).* 2014. V. 102 (1). P. 101–112.
- Zhu S., Yuan Q., Yin T. et al. Self-assembly of collagen-based biomaterials: preparation, characterizations and biomedical applications // *J. Mater. Chem. B.* 2018. V. 6. P. 2650–2676.

Structure and Morphogenetic Properties of Collagen Matrixes Obtained from Connective Tissue Sheaths of Paravertebral Tendons

A. A. Gaidash^a, *, A. I. Kulak^a, V. K. Krut'ko^a, M. I. Blinova^b,
O. N. Musskaya^a, S. A. Aleksandrova^b, K. V. Skrotskaya^b, V. A. Kulchitsky^c

^a*Institute of General and Inorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

^b*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^c*Research Institute for Physical Chemical Problems, Belarusian State University, Minsk, Belarus*

^d*Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

*e-mail: algaidashspb@gmail.com

The morphogenetic properties of a collagen gel prepared by acetic acid extraction from the tendon sheaths (peritenons) of the paravertebral tendons of Wistar rats were studied. The gel was used as a substrate during *in vitro* cultivation together with mesenchymal stromal cells for 14 days in the growth and osteogenic incubation media. It has been established that the collagen framework of the peritenon substrate is strengthened by increasing the connectivity of fibrillar nodes and is structured with the formation of lamellar and tangle formations. Sesamoid globules, penetrating into the substrate from the initial peritenon gel, during cultivation remain inert in the growth medium, but exhibit an increased ability to structure calcium phosphates in the osteogenic medium. The formation of cell-mediated structures occurs by directions of fibro-, tendo-, ligament- and osteogenic differentiation. The fibrogenic direction provides a structuring framework; the tenogenic direction – the formation of embryonic tendons according to the mechanism of lateral assembly of collagen subfibrils on cell surfaces and their autonomization in the form of tendon filament primordia; the ligamentogenic direction – structuring of collagen ribbons associated with tangles and elastic fibers; the osteogenic direction – the formation of lamellar, trabecular and nodular osteoid structures through intramembranous ossification, accompanied by activation of alkaline phosphatase and mineralization. The formation of enthesis predictors is the organization of commissures between mechanically different-phase components of osteoid structures and frame. A classification of taxonomic forms has been developed and a hypothesis has been proposed about the role of evolutionary tools in the structuring of the collagen framework in tissue cultures *in vitro*. The classification of taxonomic forms has been developed and a hypothesis has been proposed about the role of evolutionary tools in the structuring of the collagen framework in tissue cultures *in vitro*.

Keywords: peritenon, scanning electron microscopy, fibrillar collagen, collagen gel, structuring of the collagen framework, histogenesis, calcium phosphates, classification, microevolution

УДК 614.2

ЗДОРОВЬЕ, ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ КОМФОРТ И БЛАГОПОЛУЧИЕ ЧЕЛОВЕКА. ЧАСТЬ 1. ИНЖЕНЕРНО-ДИЗАЙНЕРСКИЕ РЕСУРСЫ БИОИНДУСТРИИ НА ПУТИ К БЕЗОПАСНОЙ КОНКУРЕНЦИИ С РЕСУРСАМИ ПРИРОДНЫХ БИОЦЕНОЗОВ И СИСТЕМ ЗДОРОВЬЕСБЕРЕЖЕНИЯ

© 2024 г. С. В. Сучков^{1, 2, 7, 16}, Х. Абэ³, Ш. Мёрфи^{4, 5}, Д. Смит⁶, В. С. Полякова^{16, *},
Д. Шерман^{8–10}, А. П. Глинушкин¹¹, П. Барах¹², А. О. Терентьев¹¹, М. Тан¹⁵, А. Н. Суворов^{13, 14}

¹Российская академия естественных наук, Москва, Россия

²Российский университет медицины, кафедра клинической аллергологии и иммунологии,
Москва, Россия

³Онкологическая клиника Абэ, Токио, Япония

⁴Массачусетская больница общего профиля, Бостон, США

⁵Медицинская школа Гарварда, Бостон, Массачусетс, США

⁶Клиника Мэйо, Рочестер, Миннесота, США

⁷Нью-Йоркская академия наук, Нью-Йорк, США

⁸Европейская академия наук, Льеж, Бельгия

⁹Национальный центр научных исследований, Париж, Франция

¹⁰Университет Декарта, отделение химической фармакологии и генетики визуализации,
Париж, Франция

¹¹Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

¹²Медицинская школа Университета штата Уэйн, Детройт, Мичиган, США

¹³Институт экспериментальной медицины РАН, Санкт-Петербург, Россия

¹⁴Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра микробиологии СПбГУ,
Санкт-Петербург, Россия

¹⁵Гериатрические учреждения здравоохранения и социального обеспечения Накада,
Накада Томе Мияги, Япония

¹⁶Университет мировой политики и права, Москва, Россия

*e-mail: med_nika2000@mail.ru

Поступила в редакцию 09.02.2024 г.

После доработки 13.02.2024 г.

Принята к публикации 13.02.2024 г.

Каждый человек имеет право на наивысший достижимый уровень здоровья, а современные превентивно-профилактические и реабилитационные манипуляции способствуют укреплению здоровья и благополучия. Благодаря ряду фундаментальных проектов по изучению здоровья человека на различных уровнях (геномном, протеомном и метаболомном) и молекулярных механизмов развития патологических состояний произошел большой скачок в области прикладных секторов промышленной биотехнологии, включая сегменты фармацевтической и пищевой индустрии, существенно пополнив ресурсы здоровьесбережения и повысив качество жизни населения. В данном обзоре будут рассмотрены передовые достижения фундаментально-прикладных исследований, а также перспективные направления биоиндустрии.

Ключевые слова: персонализированная и прецизионная медицина, трансляционные разработки, нутрициология, биодизайн, биоинформатика, биотехнология, генетика

DOI: 10.31857/S0042132424030033, **EDN:** PSBEEY

ВВЕДЕНИЕ

Как свидетельствует мировой опыт, эффективность национальных экономик определяется степенью развития фундаментальных исследований, дизайнерских разработок и инновационных процессов в целом (рис. 1), для которых в равной мере важными компонентами являются получение новых знаний, практик и опыта с передачей последних в производственные и социальные сферы, вооружаемые днем завтрашним, и, соответственно, рациональные инвестиционные программы, формируемые в рамках государственного частного партнерства.

При этом уже давно не секрет, что на фоне особенностей динамики биоиндустриального рынка и большинства его трендов тенденции развития систем здоровьесбережения и охраны здоровья плотно концентрируются вокруг активно разрабатываемого в структуре экономики и социума в целом направления, получившего название персонализированной и прецизионной медицины (ППМ) (рис. 2) (Основы ..., 2020, 2022a, б; Vodrova et al., 2012; Suchkov, 2019, 2024a, б; Studneva et al., 2021, 2022a, б), включенного Национальными институтами здоровья (США) в пятерку самых приоритетных областей медицины в ее глобальном понимании в XXI в. и активно поддерживаемого сотнями крупнейших биотехнологических, биофармацевтических и бионутрицевтических компаний. ППМ призвана ре-



Рис. 1. Биоиндустрия и ее отрасли.

шать глобальные проблемы человечества сквозь призму индивидуального, популяционного и национального здоровья, стабилизируя национальные генофонды биоиндустрии, обретая имидж биореволюции, объединяя в одно **большое, целое и рациональное** ключевые сектора промышленной биотехнологии (рис. 3) и набор магистральных драйверов, включающих:

1. **Биодизайн** – симбиоз традиционной промышленности и биотехнологий, способный изменить привычные способы взаимодействия человека с окружающей средой. Одна из ключевых целей биодизайна – создание экологически устойчивых продуктов и материалов, которые будут максимально эффективно использовать ресурсы и минимально нагружать экосреду (рис. 4).

В последние десятилетия научный прогресс и технологические достижения в области биологии и инженерии дали толчок к развитию нового направления исследований и инноваций – биодизайну. Это захватывающее поле объединяет биологию, инженерию, дизайн и материаловедение для создания новых продуктов и материалов, “вдохновленных” природными биологическими процессами и структурами. Технологии биодизайна и другие технологические инструменты, позволяющие воспроизводить клеточные процессы, применяемые в синтетической биологии, обеспечивают повышение производительности, сокращение затрат ресурсов за счет возможности программирования микроорганизмов под конкретную отраслевую задачу.

2. **Биомануфактуринг** (биопроизводство) – использование биологических процессов для синтеза и производства химических веществ и материалов. Включает системы доставки наночастиц, биоматериалы, тканевую инженерию, имплантаты и протезы.

А уникальному триумвирату “**Биодизайн–ТриИР–Биорынок**” как инновационному оператору в сфере промышленной биотехнологии уже принадлежит и будет принадлежать ведущая роль в развитии высокотехнологичных секторов биоиндустрии и биоэкономики в целом на протяжении ближайших десятилетий (Mitsubishi et al., 2013; Suchkov et al., 2019; Ma, Yang, 2023; Chappell et al., 2023). При этом вышеуказанные инициативы требуют не старомодной “шлифовки” потоковых биопродуктов, обремененных “гниющим” опытом далекого прошлого, а креативного (дизайнерского) проектирования, формирующего в рыночном пространстве уникальные потребительские ниши принципиально новой генерации



Рис. 2. Современная схема функциональной архитектуры персонализированной и прецизионной медицины.



Рис. 3. Ключевые сектора биоиндустрии.

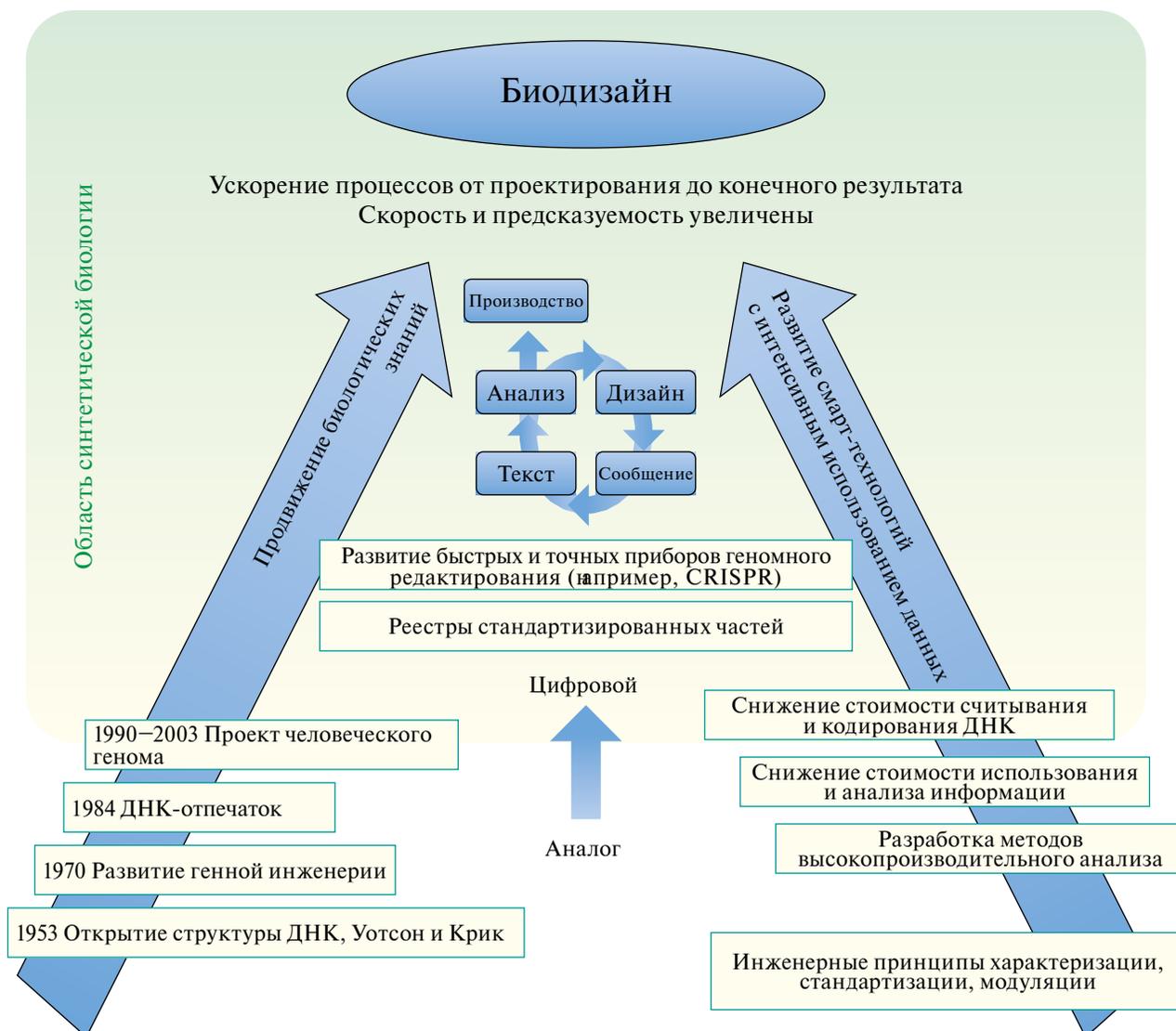


Рис. 4. Биодизайн и его базовая инфраструктура.

для биоматериалов, биоинструментов и биопродуктов дня завтрашнего, итогом развития и процветания которых становятся три стратегических сектора промышленной биотехнологии (рис. 5).

ППМ, ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТРУМЕНТАРИЙ И СФЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ

ППМ как принципиально новая модель охраны здоровья получила развитие благодаря рациональному использованию современных платформ дизайнерских биотехнологий, интегрируемых с помощью ИТ-алгоритмов в границы протоколов трансляционных исследований и разработок (ТрИиР) (Gu et al., 2020). В свою

очередь, современная ресурсная база систем здоровьесбережения ближайшего будущего, и ППМ в первую очередь, основаны на достижениях системной биологии и произведенных ею уникальных по своей природе ОМИКС-технологий (рис. 6).

Геномика, генная инженерия и их место в реализации задач ТрИиР, ТраМед и прецизионной биофармацевтики

В рамках движения к пониманию значимости ППМ мы все ближе и ближе соприкасаемся с геномикой, стратегическими задачами которой является умение достоверно определять индивидуальную генетическую предрасположенность

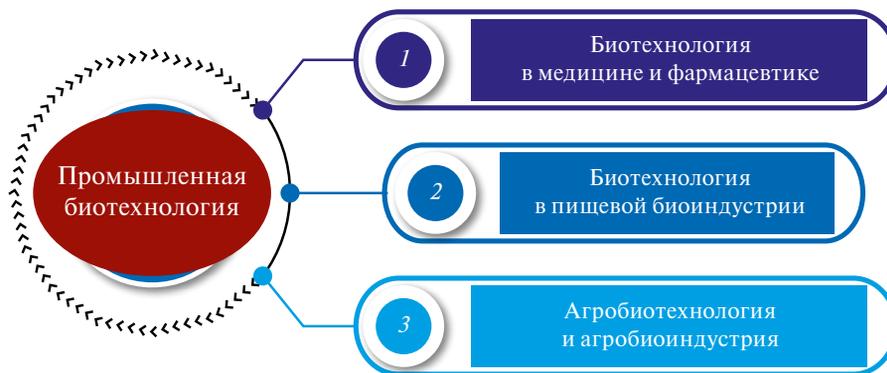


Рис. 5. Секторальная архитектура современной промышленной биотехнологии.

Промышленная биотехнология объединяет в себе химию, молекулярную и микробиологию с прикладными науками для использования микроорганизмов, клеток, тканей и генов в целях проведения технологических процессов различной направленности. Эта область исследований является одной из наиболее перспективных сегодня и позволяет не только изменять и улучшать характеристики веществ, но и создавать новые микроорганизмы с уникальными функциями.

к возникновению той или иной патологии и использовать такую возможность для внесения корректив в существующие схемы персонализированной терапии. А, соответственно, стабильное состояние генома каждого индивидуума является основой геномного здоровья, которое, в свою очередь, базируется на уникальных принципах организации и функционирования наследственного материала организма. И как итог сказанного – изучение возможностей целенаправленного

влияния на экспрессию генов (в том числе в составе сложных сетевых инфраструктур) и конструирование на основе аккумулируемых и анализируемых данных является стратегическим объектом интересов дизайнерских ТрИиР (Mendell et al., 2017; Zhang et al., 2018; Hulke et al., 2020; Kantor et al., 2020; Dang, Park, 2022).

Расшифровка генома вносит неоценимый вклад в конструирование протоколов доклинической, предиктивно-прогностической и мо-



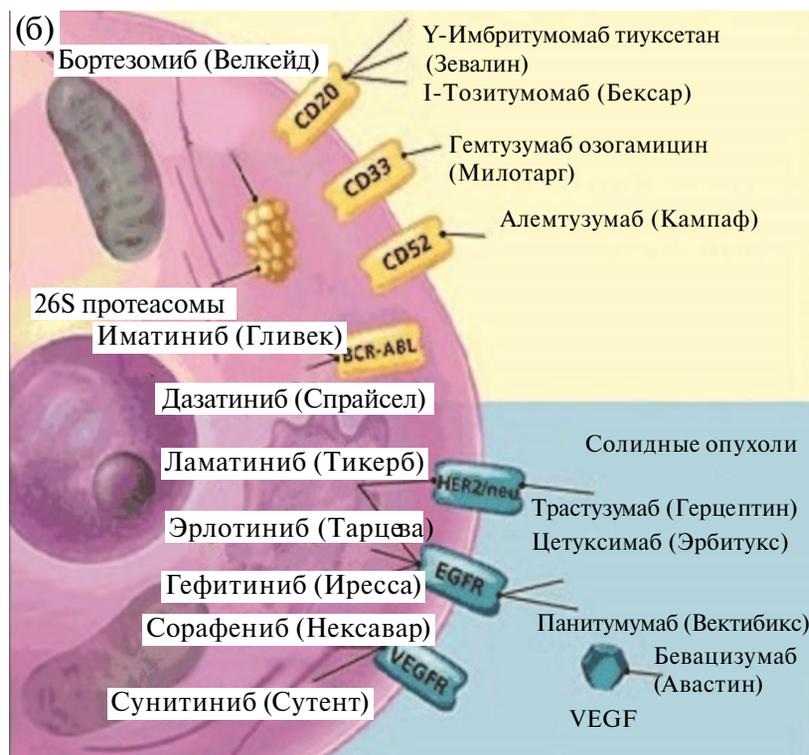
Рис. 6. ОМИКС-технологии и их ресурсы.

ниторинговой генодиагностики и дает феноменальный импульс развитию основанной на скрининге биомаркеров и мишеней таргетной терапии (рис. 7а, б).

Таргетные препараты действуют на определенные мутации, подавляя бесконтрольное деление клеток опухоли. Но поскольку каждое из таких лекарств воздействует только на те клетки,



Рис. 7. Категории биомаркеров (а); принципы таргетной терапии сквозь призму рецепторов, биомаркеров и таргетных препаратов (б).



в которых присутствует конкретная молекулярная мишень, их назначают только тем пациентам, у которых выявлена специфическая мутация по результатам геномного профилирования (Dietrich, Antoniadis, 2012; Shuel, 2022).

Большой интерес в сфере генодиагностики вызвали “кухонные” (домашние) инструменты геномного тестирования и профилирования, а именно: **Direct-to-Consumer (DTC) genetic testing**, позволяющие проводить скрининг индивидуальных генофондов по личной инициативе (без консультаций с лечащим врачом) (Oh, 2019; Jiang. et al., 2023).

Методологическая основа генетики и геномики как фундаментальных драйверов биотехнологического прогресса и геномной инженерии как набора стратегических инструментов для дизайнерских разработок расширяются с каждым годом. А сама же перестройка генотипов происходит путем внесения изменений в ДНК и РНК с помощью генно-инженерных технологий, а точнее, прямыми манипуляциями с генами организма (Hulke et al., 2020).

Генетическая инженерия не является наукой в широком смысле, но является дизайнерским инструментом биотехнологий, используя для практической реализации методы системной и синтетической биологии.

Касательно инженерных манипуляций с сегментами генома — специфичность экспрессии генов в заданной клетке достигается конструированием векторов, несущих терапевтические гены под контролем промоторов, работающих только в данном типе клеток. К настоящему моменту выявлен ряд тканеспецифичных промоторов, обеспечивающих селективную экспрессию терапевтических трансгенов в клетках определенных органов.

При этом одновременно решается и проблема адресной доставки требуемого гена в нужные клетки при минимизации его контакта с биологическими средами организма и при обеспечении эффективной и безопасной работы в клетке-мишени самого гена либо в виде “голой” ДНК (“naked DNA”)/плазмиды (упакованных в наночастицы или липосомы), либо с использованием векторов, защищающих ДНК от разрушения (рис. 8) (Dang, Park, 2022).

Так, например, внутривенная генотерапия с помощью вектора AAV9 может остановить спинальную мышечную атрофию 1-го типа (SMA1) — прогрессирующее моногенное заболевание двигательных нейронов, которое, буду-



Рис. 8. Системы адресной доставки генетического материала в клетку-мишень.

К настоящему моменту сформировались два типа генотерапевтического воздействия: индивидуализированный подход *ex vivo* — трансфекция стволовых гемопоэтических клеток, полученных из периферической крови и трансплантированных затем больному, и *in vivo* — трансфекция клеток внутри организма, куда генетический материал в составе вектора доставляется в результате инъекций.

чи летальным, возникает в младенчестве (Bailey et al., 2020).

Крупным прорывом в области генотерапии стало сохранение жизни девочке, родившейся с фатальным наследственным нейромышечным заболеванием SMA1, путем введения в ее спинальные нейроны отсутствующего гена, способного воспроизводить критически недостающий белок (Mendell et al., 2017).

Между тем представления о патогенезе злокачественных новообразований, в основе которого, в том числе, лежат активация онкогенов и инактивация генов-супрессоров опухолевого роста, позволяют искать пути подавления или восстановления функции этих генов. В этой связи особое место в потоке дизайнерского проектирования заняли ресурсы **геномного редактирования, геномной инженерии и генотерапии**, оказав огромное влияние на развитие технологического арсенала геномной инженерии с одной стороны и позволив существенно продвинуться к познанию геномных ландшафтов с другой, вытолкнув на поверхность биодизайнерских и биоинженерных манипуляций технологию **CRISPR, ZFN** и **TALEN** — стратегические пакеты инструментов редактирования генома, но не доведенные

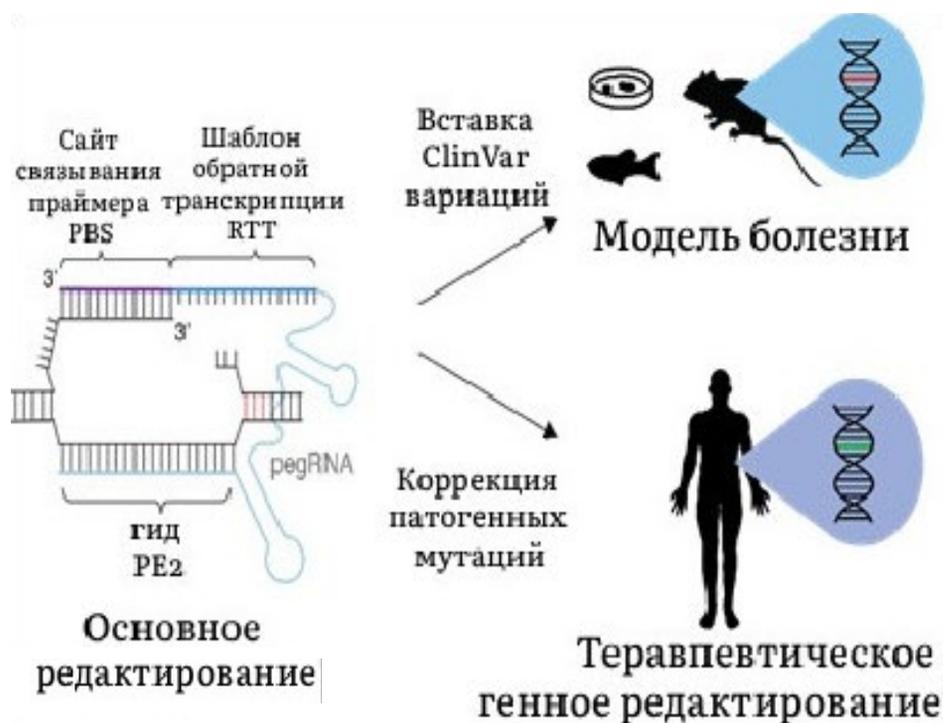


Рис. 9. Принципы применения инженерно-дизайнерского инструментального пакета Prime Editing Design Tool для геномного редактирования.

Новый подход к геномному редактированию позволяет делать любые однонуклеотидные замены и более крупные вставки и делеции, но отличается от классического CRISPR/Cas9-редактирования большей аккуратностью. Это стало возможным благодаря тому, что новый редактор обходится без двухцепочечных разрезов ДНК и самостоятельно достраивает редактируемую цепь. В результате количество ошибок у него ниже, а эффективность – выше.

пока до совершенства (Zhang et al., 2018). При этом усилия исследователей и биодизайнеров по улучшению системы редактирования генома привели к созданию нового варианта этой системы, названной **prime editing** (рис. 9) и позволяющей вырезать и вставлять в геном требуемые ДНК-последовательности или отдельные нуклеотиды (т.е. исправлять точечные мутации) (Kantor et al., 2020).

В отличие от традиционного CRISPR/Cas новый метод не делегирует починку ДНК прецизионно слабой системе репарации клетки, а разрезает всего одну цепь ДНК и сам же ее достраивает. Клетка же самостоятельно чинит разрыв только на последней стадии редактирования, но это гораздо безопаснее, чем починка двухцепочечного разрыва: тут задействована другая, гораздо более аккуратная система репарации, которая следует указанию белкового комплекса, четко указывающего ей на неправильную цепь.

В кратком историческом аспекте, определив структуру ДНК, Уотсон, Крик, Уилкинс и Франклин показали, что книга жизни написана

в двойной спирали ДНК, которую после завершения проекта генома человека пришлось переписывать. Теперь же, благодаря появлению точных инструментов редактирования генов, например CRISPR, мы ощутили воздействие трансформации геномных знаний и практик прежде всего в области здравоохранения. Этот сдвиг в здравоохранении гарантирует, что миллионы, а затем и миллиарды людей будут секвенировать свои геномы, закладывая этим основу для профилактических и лечебных манипуляций. Таким образом, генотерапия – это новейший метод лечения и профилактики, который позволяет изменять гены человека, т.е. использует редактирование генома для замены нужных участков ДНК. Применение этой технологии может не только вылечить уже существующую болезнь, но и предотвратить ее возникновение в будущем, объединяя сложнейшие наборы превентивно-профилактических и лечебно-реабилитационных протоколов.

Касательно терапевтических процедур, к настоящему моменту уже зарегистрировано четыре препарата для генной терапии, включая **ген-**

дицин и **онкорин** для лечения плоскоклеточного рака головы и шеи, а также **глибер** — для лечения дефицита липопротеиназы, вызванного мутацией в гене, кодирующей выработку этого фермента, и **неоваскулген**, кодирующий эндотелиальный фактор роста сосудов под контролем промотора цитомегаловируса, — для лечения пациентов с ишемией нижних конечностей атеросклеротического генеза (Wang et al., 2022).

Существенно дополняет вышеуказанные достижения мониторинг транскриптома (клеточные РНК) и нкРНКома (некодирующие РНК), лежащих в основе формирования протеома (см. ниже). При этом мишенями для нкРНК является внушительное число генов, переводя семейство таких РНК в объект особого интереса по причине полезной для ТрИиР и реальной практики предиктивно-диагностического, прогностического, превентивно-профилактического и лечебно-реабилитационного толка (Zhang et al., 2019).

Разработаны и специальные методы ТраМед для оценки состояния адресного транскриптома, цифровизация которого обеспечивает возможность анализировать экспрессию генных массивов в зависимости от предрасположенности индивидуума к той или иной патологии.

По механизму патогенеза пока, в основном, раскрыты те заболевания, которые затрагивают только белок-кодирующую часть гена (экзом), о продуктах которой (белках) и их функциях знаний пока недостаточно.

Еще меньше информации о роли и месте в жизнедеятельности клетки и живых систем некодирующих участков генов, что также относится к сфере интересов и компетенций ТрИиР. В этой части создание экспертами-биодизайнерами ряда программных инструментов, в основе которых лежат искусственные генные сети, существенно облегчают возможность предикции и прогнозирования случайных событий в истории клетки, органа или ткани, или же организма в целом.

Конечной целью геномного редактирования и генно-инженерных манипуляций является создание набора основанных на геночипах нанобиосенсоров, с помощью которых можно обнаруживать сетевые аномалии, эволюция и динамика которых становятся крайне значимым биоиндикатором состояния клеточной активности — (а) в рамках физиологических колебаний, (б) на фоне патологического процесса или (в) в границах пограничных состояний. За данной технологией **большое будущее**, позволяя клетке

принимать извне любое количество ДНК, сохраняя при этом существующий геном интактным и здоровым.

Сегодня мы как никогда приблизились к новой эре геномной терапии, ведь многие препараты этого класса (для использования по различным показаниям) уже находятся на разных стадиях клинических исследований. Недалек и тот день, когда мы сможем определять для оценки мультифакториального заболевания и его контроля весь комплекс генов предрасположенности и их продуктов для каждого индивидуума, формируя по итогам обследования **генетический паспорт**.

*Протеомика и белковая инженерия
в реализации задач ТрИиР, ТраМед
и прецизионной биофармацевтики*

Белок — это та рабочая молекулярная машина, которая выполняет практически все функции в организме, а ключ к диагностике и лечению болезней человека — в идентификации белковых факторов, определяющих нарушения в работе организма, и в установлении соответствия этих белков определенным генам. В живом организме большинство биологических процессов управляется посредством специфических белок-белковых или белково-нуклеиновых взаимодействий. И понимание молекулярных механизмов взаимодействия белковых лигандов с рецепторами имеет большое фундаментальное и прикладное значение, в частности, для разработки новых лекарственных препаратов белковой природы (Santos et al., 2022).

Соответственно, **протеомика** — это ОМИКС-дисциплина и одновременно отрасль системной биологии, использующая методы белковой аналитики. Ее целью является получение более общего и комплексного понимания биологических процессов путем изучения всей совокупности белков клетки или ткани вместо анализа каждого отдельного белка. Используемые методы исследования включают изучение белкового взаимодействия, модификаций, функций и локализации белка (Neely et al., 2023).

А протеомный анализ направлен на экспертно-аналитическую оценку как индивидуальных белков, так и сложных белковых взаимодействий (**белковых интерактомов**), и поэтому используемые экспертно-диагностические пакеты включают в себя иммунохимические тесты, методы микросеквенирования, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

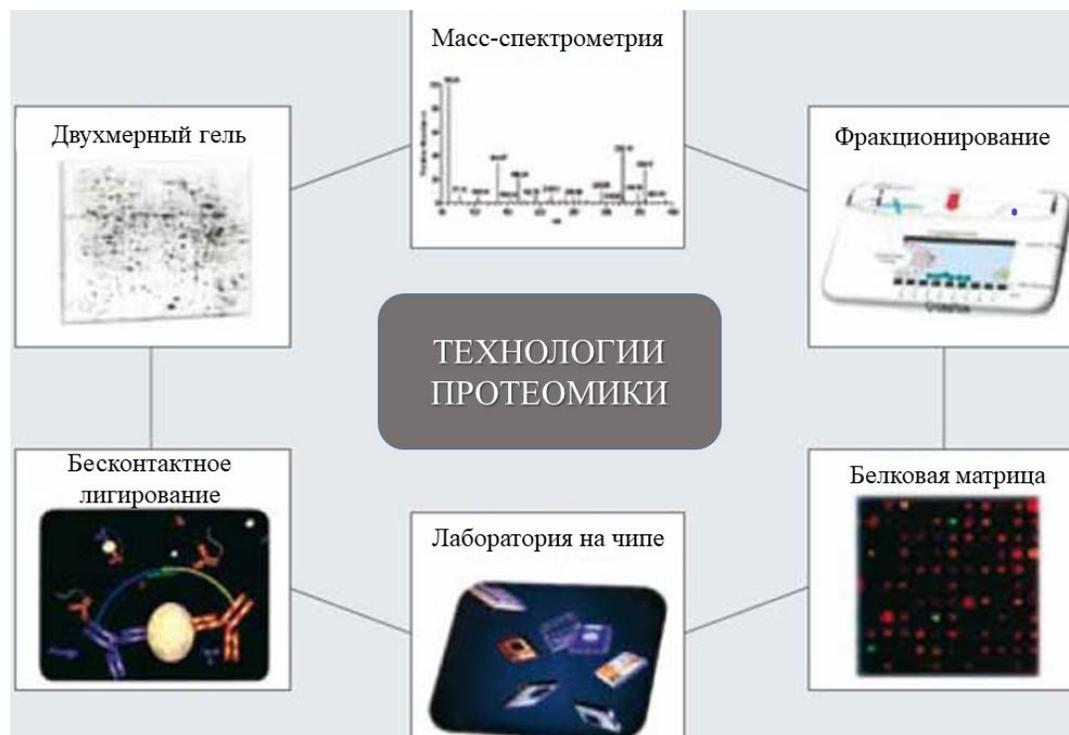


Рис. 10. Базовый инструментарий протеомики.

и масс-спектрометрии, а также белковые микро-чипы с различными типами детекции (Carrillo-Rodriguez et al., 2023). И для протеомики как второй ключевой группы ОМИКС-технологий основополагающую роль играют методы идентификации индивидуальных белков и находящихся в их составе отдельных сегментов и антигенных детерминант (рис. 10).

Современные технологии **протеомного скрининга (профилирования)**, играющие существенную роль в тандеме с геномным тестированием, не только в разы повышают эффективность ранней диагностики, но и резко увеличивают пропускную способность ЛДЦ (лечебно-диагностический центр) и КДЦ (консультативно-диагностический центр) при массовых (в первую очередь, профилактических) обследованиях.

Согласно секторальному принципу классификации, в сферу протеомики входят:

1. Структурная протеомика.
2. Функциональная протеомика.
3. Фармакопротеомика.
4. Клиническая протеомика.
5. Протеомика патологических состояний.

Исходя из вышесказанного, не сложно заметить, что основные базы данных протеомных исследований постоянно и интенсивно пополняются, включая **YRC PDR** (аннотации белковых функций и взаимодействий); **PRIDE** (архивная база данных спектров, полученных методом масс-спектрометрии); **PeptideAtlas** (база аннотированных белков в экспериментальных данных, в том числе с указанием тканеспецифичной экспрессии); **UniProt** (база, собирающая всю информацию о белках из курируемой базы **Swiss-Prot** с более чем 500 тыс. белков и автоматически аннотированной базы **TrEMBL** с более чем 230 млн белков); **PDB** (база данных структур белков и других биополимеров (Mann et al., 2021).

Соответственно протеомные данные используются для быстрой разработки новых фармацевтических и нутрицевтических средств и новейших методов лечения болезней как в медицине, так и в ветеринарии. Протеомика же со своим системным подходом может помочь идентифицировать и оценить важность появления новых белков гораздо эффективнее, что, в свою очередь, ускорит разработку новых диагностических и терапевтических инструментов.

Рациональный дизайн

1. Системы автоматизированного проектирования



2. Сайт-направленный мутагенез



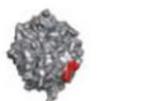
Одиночный мутировавший ген

3. Трансформация

4. Экспрессия белка

5. Очистка белка

6. Не применяется



Сконструированный мутантный фермент

Улучшенный фермент

7. Биохимическое тестирование

Направленная эволюция

1. Не применяется

2. Случайный мутагенез



Набор мутированных генов (> 10 000 клонов)

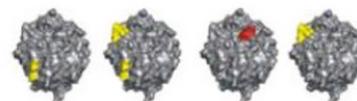
3. Трансформация

4. Экспрессия белка

5. Не применяется

6. Скрининг и селекция:

- стабильность;
- избирательность;
- сходство;
- активность



Селектированные мутантные ферменты

Рис. 11. Белковая инженерия: современные методы и подходы.

Цель **белковой инженерии** состоит в конструировании *in vitro* новых белков с заданными свойствами (рис. 11).

В белковой инженерии можно выделить два направления: **рациональный дизайн** и **направленная молекулярная эволюция белков** (Lutz, Iamurri, 2018).

Первое подразумевает использование информации о структурно-функциональных отношениях в белках, чтобы определить, какие именно изменения в первичной структуре должны привести к желаемому результату. Такой подход наиболее часто используется в случае конструирования искусственных белков (белков *de novo*) с заданными свойствами.

При направленной молекулярной эволюции белков с помощью генно-инженерных методов получают большой набор мутантных генов

целевого белка, которые затем экспрессируют, в частности на поверхности фагов (“фаговый дисплей”) или в бактериальных клетках, чтобы сделать возможным отбор мутантов с лучшими характеристиками. По сути такой подход имитирует природную эволюцию белков, но только существенно более быстрыми темпами (Saw, Song, 2019).

Оба названных направления имеют одну цель и дополняют друг друга. И в будущем возможно создание белков, обладающих функциями, неизвестными в живой природе.

В настоящее время протеомика вместе с геномикой и биоинформатикой ориентирована на создание принципиально новых диагностических и лекарственных препаратов, в которых молекулярными мишенями будут служить те или иные белки. И белки нашли широкое применение в различных отраслях промышленности, ме-

дицине, пищевой биоиндустрии и сельском хозяйстве, а также в научных исследованиях.

Отдельная сфера протеомики, изучающая механизмы взаимодействия с мишенями белковой природы фармакоцевтических (ЛП) и нутрицевтических (БАДы) биоконструкций, активно взаимодействующих с белковыми “ансамблями”, выделена в самостоятельное стратегическое направление – **фармаконутрипротеомику**, ориентированную на разработку таргетных биопродуктов, относящихся к категориям фармацевтических и нутрицевтических биопрепаратов и биоконструкций. В этом сегменте следует особо подчеркнуть значимость конструирования биологически активных пептидов, обладающих фармакологической активностью и выступающих наряду с белками-каркасами целого ряда биопрепаратов и биоконструкций (Xu et al., 2023).

Таким образом, белковая инженерия – раздел биотехнологии, который занимается поиском и созданием белков с улучшенными или совершенно новыми функциями, используя для решения вышеуказанных задач трансдисциплинарный подход, включающий нанотехнологии, позволяющие создавать дизайнерские биомолекулы с программируемыми реакциями и механизмами воздействия, математическое моделирование процессов и алгоритмы биоинформатики (Yang et al., 2019).

Стратегия получения нового белка согласно ключевому подходу (рациональному биодизайну) базируется на теоретических представлениях о будущей пространственной структуре белка, на основе чего, используя принципы биоинформатики и методы компьютерного моделирования, строят трехмерную модель протеина, которая представляет собой первичную структуру полипептидной цепи желаемого белка. Между тем генная инженерия открыла новый путь белковой инженерии в самой радикальной форме путем замены в нем требуемых или планируемых аминокислотных остатков с использованием ДНК-векторов.

В свете вышеизложенного технологический арсенал белковой инженерии и методы протеомной аналитики уже широко и активно применяются:

1) для производства человеческого инсулина и ряда других гормонов, включая эритропоэтин;

2) разработки и применения в клинической практике моноклональных антител (включая иммуотаргетные препараты), биокатализато-

ров с новыми свойствами и дизайнерских ферментов, не имеющих в природе аналогов, а также антител-протеаз (в настоящее время актуальной областью применения белковой инженерии является изменение каталитических свойств ферментов для разработки “экологически дружелюбных” промышленных процессов, ибо с точки зрения охраны окружающей среды ферменты являются наиболее приемлемыми из всех катализаторов, используемых в биоиндустрии);

3) создания гибридных интерферонов и цитокинов, обладающих свойствами интерферирующих между собой изотипов и реализующих на практике мощный (интегрированный) противоопухолевый потенциал;

4) получения обогащенных белком специализированных пищевых продуктов и ингредиентов.

При этом в последнее время разрабатываются принципиально новые подходы поиска лекарственных средств: в качестве мишеней рассматриваются не одиночные белки как мономишени, а их межбелковые (интерактомные) комплексы, белок-белковые взаимодействия и фолдинг белковых молекул. А получаемые на выходе новые, не существующие в природе протеины, применяются для создания биопрепаратов, а также для биоинструментов, используемых при обработке продуктов в пищевой и агробиоиндустрии (Karoo et al., 2017).

Еще одной областью применения протеомики и белковой инженерии является создание белков, способных нейтрализовать вещества и микроорганизмы, которые могут быть использованы для химических и биологических атак. Например, ферменты гидролазы способны обезвреживать как нервно-паралитические газы, так и используемые в сельском хозяйстве пестициды.

Рынок белковой инженерии сегментирован по типу продукта (инсулин, моноклональные антитела, ферменты и другие типы биопродуктов), технологии (белковый дизайн), конечному пользователю (фармацевтические и биотехнологические компании, контрактные исследовательские организации (CRO)) и др. Ожидается, что рынок белковой инженерии зарегистрирует среднегодовой темп роста почти 15.6% в течение прогнозируемого периода (2024–2028). А движущими факторами роста мирового рынка белковой инженерии являются растущая распространенность заболеваний с дефицитом белка, растущее внедрение белковых препаратов и спрос на альтернативы химическим процес-

сам, а также растущее финансирование белковой инженерии (Singh et al., 2018).

Метаболомика, метаболомная инженерия в реализации задач ТрИиР, ТраМед и прецизионной биофармацевтики

Метаболомика иллюстрирует функциональное состояние клетки в реальном времени на уровне ее метаболизма, отражая совокупность всех метаболических путей в клетке на данный момент времени, что делает метаболомику в единстве с биодизайнерским арсеналом ТраМед высокоэффективным средством ранней диагностики заболеваний, мониторинга результатов лечения и оценки токсических воздействий на организм (Castelli et al., 2022).

Метаболиты представляют собой разнообразную группу низкомолекулярных структур (липиды, аминокислоты, пептиды, нуклеиновые кислоты, органические кислоты, витамины, тиолы и углеводы), что делает единовременный глобальный анализ сложной задачей. И только комбинированное использование современных инструментальных аналитических подходов позволяет увеличить и оптимизировать спектр изучаемых метаболитов.

Метаболомика основана на применении методов физической химии (ВЭЖХ, газовой хроматографии и др.) в сочетании с компьютерным

анализом распознавания образов (паттернов). Прогресс в этой сфере привел к созданию таких методов как **метаболический фингерпринтинг** (на основе характеристик метаболитов) и **метаболическое профилирование** (анализ метаболитов, относящихся к одному химическому классу или определенному биохимическому пути) (рис. 12) (Yang et al., 2023).

Соответственно **метаболическое фенотипирование** как способ оценки метаболических фенотипов объектов представляет собой количественное измерение динамического мультипараметрического метаболического ответа живых систем на патофизиологические стимулы или генетическую модификацию. А само фенотипирование (**метаболическое профилирование**) метаболитов особенно актуально для изучения патофизиологии хронических форм патологии и их осложнений (Beckonert et al., 2007; Clarke, Haselden, 2008; Ellis et al., 2012; Shah et al., 2012; Basler et al., 2018).

Как видно, метаболомика – междисциплинарная ОМИКС-отрасль, раскрывающая секреты внутри- и внеклеточного обмена веществ (метаболизма) и дающая биодизайнеру и IT-эксперту-биоинформатику возможность смоделировать архитектуру метаболических процессов, оценить совместимость функционирования структурных элементов биосистемы и как следствие ускорить процесс создания

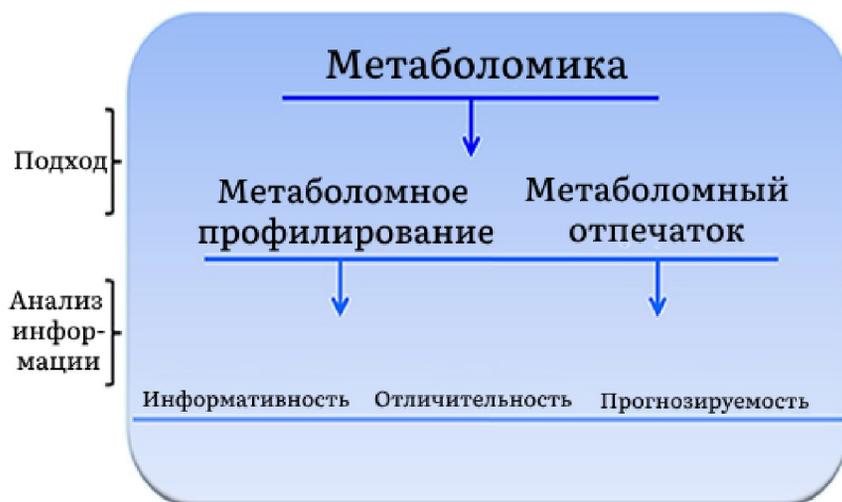


Рис. 12. Стратегические технологические платформы и методы в метаболомных исследованиях и экспертизе.

Как инструмент обнаружения биомаркеров, интегрированный холистический подход метаболомики может привести к новым диагностическим или терапевтическим методам. Обнаружение метаболитов с помощью высокопроизводительных систем, поддерживаемых передовой биоинформатикой и сетевым анализом, позволило идентифицировать потенциальные биомаркеры и терапевтические мишени.

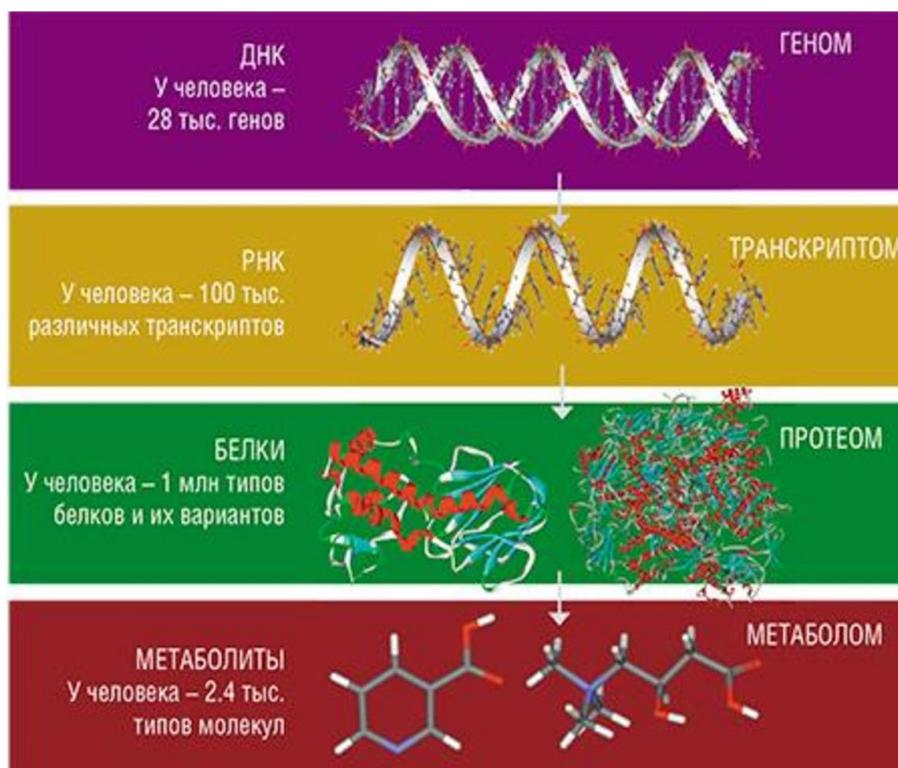


Рис. 13. Метаболом как конечный продукт многостадийного процесса реализации в клетке генетической информации.

Реализация наследственной информации в живом организме осуществляется от ДНК к РНК, от РНК – к белку, и от белка – к метаболическим каскадам и метаболитам. Соответственно существует иерархия дисциплин, начиная от геномики, следуя к транскриптомики и протеомике и заканчивая метаболомикой – набором всех метаболитов, образующихся в результате биохимических реакций.

фармацевтических и/или нутрицевтических биопрепаратов.

Согласно Базе данных метаболома человека HMDB (The Human Metabolome Database, <https://hmdb.ca>) по крайней мере 114190 метаболитов существуют у людей, и эти метаболиты играют различные важные роли в биосистемах в дополнение к белкам и генам. Совокупность всех метаболитов в клетке, ткани, органе или целом организме является по итогам многостадийного процесса реализации генетической информации конечным продуктом и представляет собой **метаболом** (рис. 13).

Соответственно анализ метаболома является ключевым моментом для понимания динамических процессов, происходящих в организме. При нормальных условиях концентрация тех или иных соединений в ткани или жидкости определяется их ролью в метаболических процессах и, как правило, меняется в небольших пределах. Однако при патологии или в рамках

пограничных состояний метаболомный профиль пораженной ткани может резко измениться, определяя динамику тех или иных семейств метаболомных биомаркеров. При этом динамика метаболических изменений в пораженных тканях отражается в метаболоме сыворотки крови (Balashova et al., 2023).

Метаболомные инженерные инструменты имеют широкий потенциал на этапах доклинической и клинической разработки фармакологических и нутрицевтических средств (рис. 14), совершив толчок к рождению и развитию **метаболической (метаболомной) инженерии** – новому направлению биотехнологии, возникшему на стыках системной и синтетической биологии, метабономики и биоинформатики, к которому можно отнести процессы системной реконфигурации путей метаболизма и совершенствования клеточных систем посредством манипуляций с ферментными, транспортными и регуляторными функциями клетки.

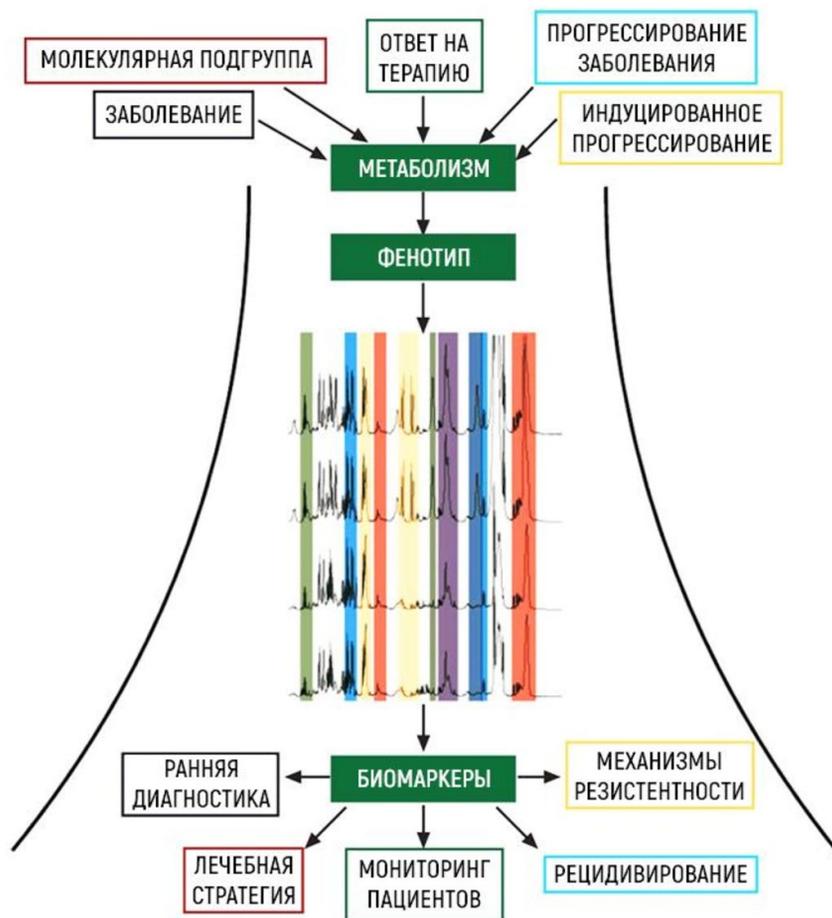


Рис. 14. Схема влияния различных процессов на обмен веществ и возможности использования метаболитов как биомаркеров в рамках ППМ.

Метаболомные подходы позволяют выявить принципы формирования лекарственной устойчивости и факторы рецидивирования опухолей, определить новые перспективные мишени терапии.

Метаболическая инженерия – это, по сути, конструирование новых организмов и биосистем с направленно измененными метаболическими превращениями субстратов в целевые продукты и модификации сигнальных каскадов (или введения новых) с использованием технологии рекомбинантной ДНК и алгоритмов биоинформатики, а также с внедрением результатов в различные сферы биоиндустрии, медицины и экологии (Ellis et al., 2012; Dromms, Styczynski, 2012; Khanijou et al., 2022).

Концептуально метаболическая инженерия учитывает идентификацию основных блоков или контрольных точек в метаболическом пути на молекулярном уровне с последующим устранением этих ограничений с помощью вмешательств различных инструментов биоинженерии. При этом понимание метаболических

путей требует соответствующей постановки эксперимента, методов молекулярной биологии и биохимии, вычислительного моделирования, анализа данных и интерпретации, чтобы биодизайнеры-инженеры могли манипулировать ими в соответствии со своими потребностями (Volk et al., 2023).

Среди основных направлений развития метаболической инженерии:

1) повышение эффективности биоконверсии традиционных субстратов в естественные метаболиты, имеющие практическое значение (аминокислоты, нуклеотиды, витамины, анти- и пробиотики и др.);

2) биосинтез новых для данного организма веществ: рекомбинантные белки, биополимеры и др.;

3) утилизация отходов;

4) использование возобновляемых источников сырья для традиционных производств.

Резюмируя вышесказанное, следует заметить, что метаболомика уже показала высокую эффективность при обнаружении врожденных и наследственных нарушений метаболизма и нарушений, вызванных эндогенными и экзогенными факторами; при изучении токсичности ЛП и оценке реакций организма на ЛП и различные пищевые продукты и БАДы.

Среди наиболее актуальных и востребованных на рынке аппликационных секторов метаболомного дизайна, инженерии и трансляционной метаболомики:

- 1) создание новых антибиотиков, ЛП и нутрицевтиков;
- 2) оценка токсичности и биобезопасности ЛП и БАДов;
- 3) диагностика нарушений в структуре обмена веществ;
- 4) оценка жизнеспособности эмбрионов, предназначенных для искусственного оплодотворения и др.

Вышеуказанные преимущества делают метаболомику высокоэффективным средством ранней диагностики заболеваний, мониторинга результатов лечения и токсических воздействий на организм. По сути, метаболомика сегодня – это перспективный и многообещающий путь для выявления метаболических изменений, характерных для точки инициации заболевания и его динамики; оценки закономерностей ответа метаболизма на терапию; создания библиотек малых молекул в целях проектирования фармакоконструкций принципиально новых поколений и решения широкого спектра задач из сферы биодизайна, фармакодизайна и биоинженерии в целом.

*Клеточная инженерия и терапия
в реализации задач ТриИР, ТраМед
и прецизионной биофармацевтики*

Что касается клеточной терапии, она в большинстве случаев представляет собой лечение и профилактику с использованием специализированных популяций стволовых клеток, которые способны развиваться в клетки любого типа, любого органа, если правильно управлять их ростом.

Реально **клеточная инженерия** и **клеточная терапия** – это два инновационных направления

в дизайнерских секторах биотехнологий и медицине, основанные на применении регенеративного потенциала стволовых клеток в целях лечения ряда тяжелых заболеваний, реабилитации пациентов после травматических повреждений и борьбы с преждевременными признаками старения (Fodor, 2003; Liang, Du, 2021; Irvine et al., 2022; Bashor et al., 2022).

Преимущество клеточной терапии состоит в том, что она помогает лечить болезни без использования лекарств, ибо стволовые клетки обладают уникальной способностью трансформироваться в клетки крови, печени, миокарда, костной, хрящевой или нервной ткани, оказывая по сути уникальный терапевтический эффект и восстанавливая поврежденные органы и их функции.

Так, при сравнении метаболомного состава внутриглазной жидкости и хрусталика выяснилось, что большинство защитных соединений хрусталика не приходит извне, а синтезируется в эпителиальных клетках, и причиной развития катаракты является снижение функции этих клеток. Оптимальным подходом к терапевтическому лечению и профилактике катаракты может стать не “накачка” хрусталика антиоксидантами, а восстановление нормальной работы эпителиальных клеток, т.е. с помощью клеточной инженерии (Zhao et al., 2023).

При этом развитие рынка стволовых клеток тормозится тем, что лекарства на основе аутологичных клеток делать невыгодно, так как такое производство нельзя масштабировать. А на разработку дизайнерских препаратов на основе аллогенных стволовых клеток потребуется много времени: необходимо сделать их “ускользающими” от собственных ресурсов иммунитета, минимизируя риски отторжения. Таким образом, продуктивным путем может стать интеграция технологических ресурсов геной и клеточной терапии с двумя перекрывающимися доминантами – **программированием** и **репрограммированием** геномов в тандеме с достижениями протеомики, иммуномики и цитомики.

В феврале 2023 г. крупнейшее на сегодня исследование клеточной терапии хронической сердечной недостаточности продемонстрировало эффективность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) путем уменьшения площади воспаления со снижением нестабильности атеросклеротических бляшек (Perin et al., 2023).

МСК способны превращаться в разные ткани (рис. 15), и это свойство связано с наличием

ем в ядре каждой клетки полной генетической информации, которая необходима для восстановления поврежденных тканей и поддержания жизненно важных функций организма пациента.

Так, в частности, при заболеваниях нервной системы МСК мигрируют к очагам воспаления и способствуют ремиелинизации, восстанавливая структуру нейронов и оказывая противовоспалительное действие путем торможения интенсивности аутоиммунного воспаления.

В случае болезни Паркинсона применение биопрепарата STEM-PD (продуцирующего дофамин и полученного из МСК) привело к подавлению клинической активности процесса и минимизации масштабов инвалидизации пациентов. А аутологичная трансплантация кровяных стволовых клеток (КСК) при активном вторично-прогрессирующем рассеянном склерозе (РС) замедляет интенсивность инвалидизации и тормозит прогрессирование патологического процесса (Lizak et al., 2020).

Высокий регенераторный потенциал МСК дает возможность использовать их в антивозрастной терапии, увеличивая за счет дифференцировки мультипотентных стволовых клеток продолжительность жизни.

А комбинаторный протокол, включающий CAR-T-клеточную терапию 2-го поколения, состоящий из генетически модифицированных Т-клеток, был разработан биодизайнерами для нацеливания антигена созревания В-клеток (B-cell maturation antigen, BCMA) и репрограммирования Т-клеток для распознавания и борьбы со злокачественной миеломой (Stern R.C., Stern R.M., 2021).

Таким образом, клеточная терапия CAR-T — это инновационная и персонализированная иммунотерапия, основанная на использовании собственных клеток (Т-лимфоцитов) пациента для разрушения опухолевых клеток. Проще говоря, терапия, использующая собственную иммунную систему организма для уничтожения опухолевых клеток (рис. 16).

Таким образом, этот вид лечения объединяет в себе сразу три современных метода терапии онкобольных:

1) клеточную (пациент получает не химическое вещество, а “живой” препарат в виде “улучшенных” клеток своего же организма);

2) иммунную (действующее вещество вводимого препарата — модифицированные Т-лимфоциты, которые выполняют функцию иммунной защиты — распознают чужеродные вещества

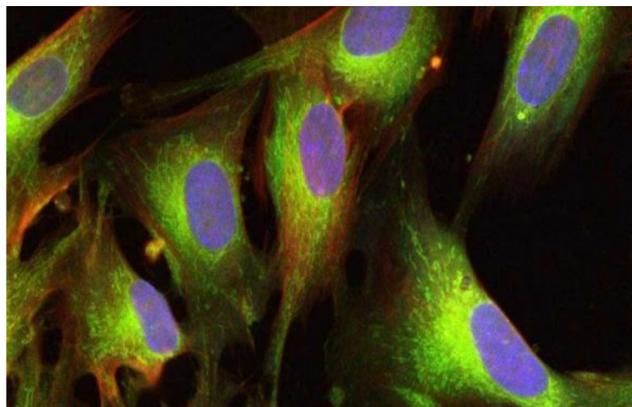


Рис. 15. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК).

МСК представляют собой негематопозитические, мультипотентные, самообновляющиеся клетки, способные к трехлинейной дифференцировке (мезодерма, эктодерма и энтодерма). Плурипотентность и иммуномодулирующие свойства МСК позволяют считать их эффективным инструментом в клеточной терапии и восстановлении тканей.

(в данном случае — клетки множественной миеломы, лейкоза или других видов рака) и обезвреживают их);

3) генную (используются лимфоциты не в натуральном виде, а измененные определенным образом — прошедшие генетическую модификацию, “обученные” распознавать опухоль и воздействовать на нее).

Следуя вышесказанному, одним из новейших трендов фармакобиодизайна в сочетании с клеточной и генной инженерией становится процедура перепрограммирования клеток путем внедрения в них целевой генетической информации, необходимой для получения клеточных популяций с заданной функциональностью. Особое место среди таких технологий занял протокол внедрения дизайнерской РНК-сети в популяцию эмбриональных стволовых клеток, что в итоге привело к созданию в границах островков Лангерганса популяции инсулинсекретирующих бета-клеток, которые способны полностью заместить у больных сахарным диабетом 1-го типа (СД1) утраченную в результате аутоиммунного воспаления (СД1) ткань с погибшими бета-клетками (рис. 17).

Вторым примером прорывных и попросту уникальных технологий в сфере цитоники, клеточной биологии и инженерии стало обнаружение в ткани сердечной мышцы популяций резидентных миокардиальных стволовых клеток, наделенных свойством к мультилинейной дифференцировке и длительной пролиферации, что

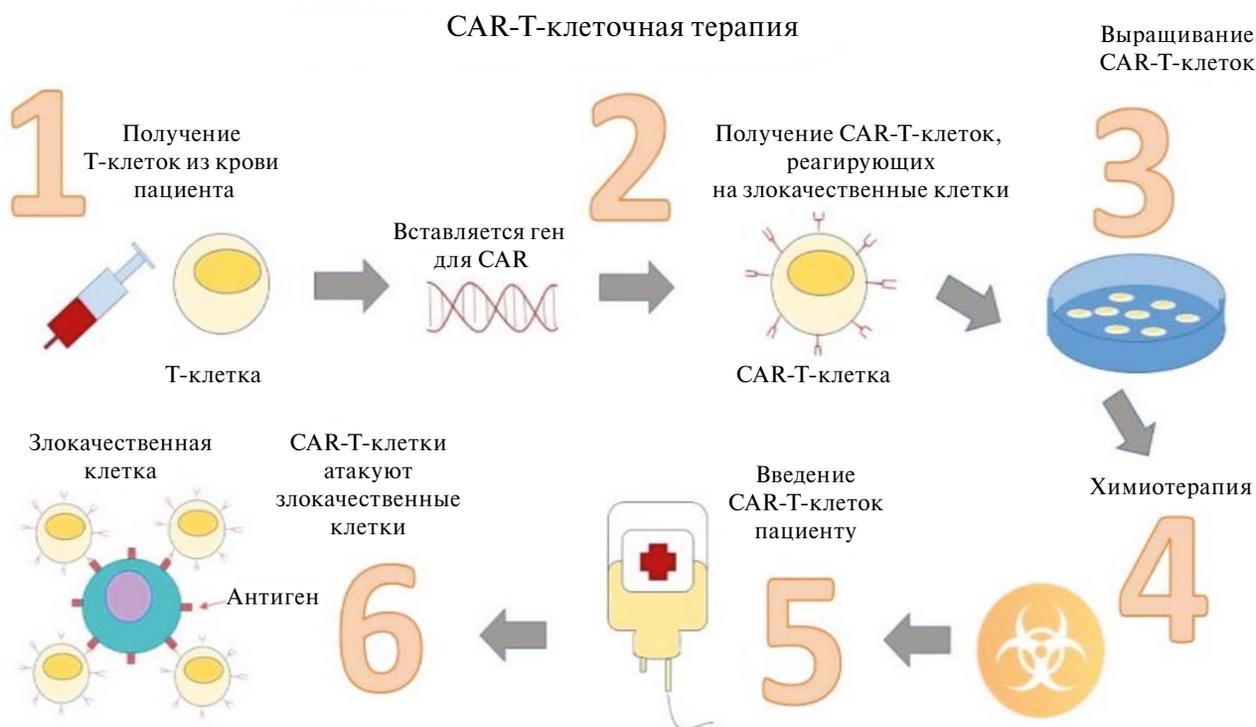


Рис. 16. CAR-T-клеточная терапия с использованием инструментов клеточной и генной инженерии.

При CAR-T-клеточной терапии Т-клетки берутся у пациентов для генетической модификации и оснащаются химерными антигенными рецепторами (CAR). Каждый CAR состоит из нескольких строительных блоков, которые могут распознавать и связываться с соответствующей целевой молекулой на поверхности опухолевых клеток. После активации CAR-T-клетки начинают уничтожение раковой клетки посредством цитотоксического (повреждающего клетки) эффекта. В то же время CAR-T-клетки размножаются, поэтому они остаются в организме и могут активно действовать при рецидиве заболевания.

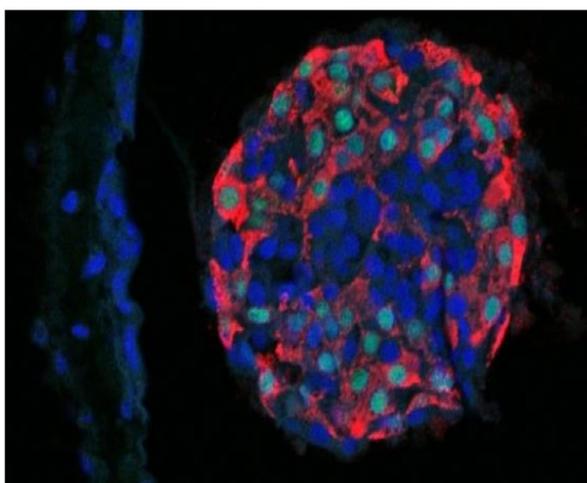


Рис. 17. Стимулируемые глюкозой бета-клетки, продуцирующие инсулин и защищенные внутри капсул, чтобы быть невидимыми для иммунной системы хозяина.

Нет сомнений в том, что способность генерировать чувствительные к глюкозе бета-клетки человека посредством контролируемой дифференцировки стволовых клеток ускорит разработку новых терапевтических средств.

позволило пересмотреть устоявшиеся каноны, став предвестником нового направления в регенеративной кардиологии (Bollini et al., 2011). Среди базовых направлений утвердились два, причем оба опровергающих парадигму о том, что сердце, являясь постмитотическим органом, не способно к регенерации, и кардиомиоциты, погибшие при повреждении или заболевании, замещаются фиброзной тканью, что неизбежно приводит к развитию сердечной недостаточности.

Первое направление связано с дизайнерским конструированием клеток, восстанавливающих поврежденную область за счет дифференцировки во взрослые кардиомиоциты после предварительной экспансии, модификации и, затем, инъекции в организм (ЭСК, iPSCs, аутологичные КСК/кардиосферы) (Smith et al., 2007).

Второе направление основывается на идее опосредованного (дистантного) влияния на свойства миокардиальных стволовых клеток, которые способны дифференцироваться в кардиомиоциты,

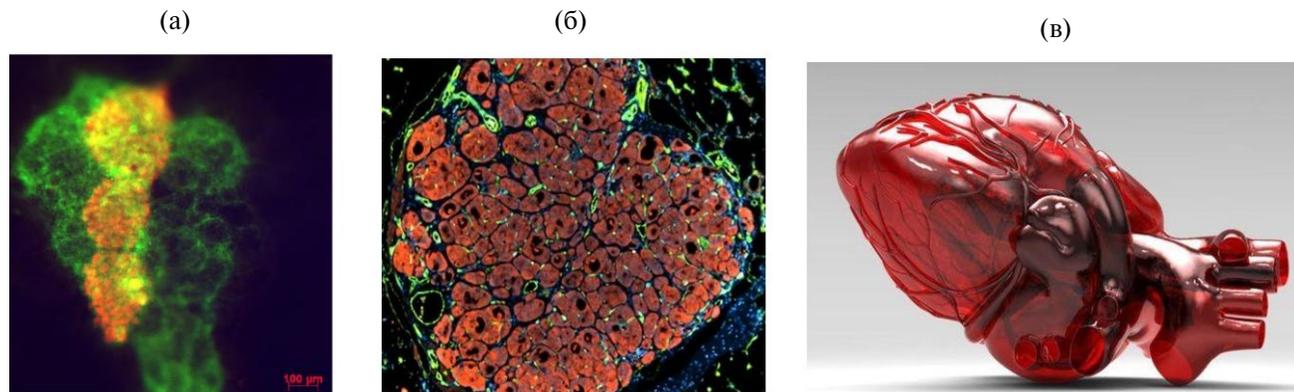


Рис. 18. Успехи клеточной биоинженерии и биопринтинга: (а) – напечатанная щитовидная железа; (б) – напечатанная печень; (в) – напечатанное сердце.

вероятно, играя важную роль в стабильности микроокружения (Ellison et al., 2013).

Клинически наиболее перспективным направлением восстановления сократительной функции миокарда после повреждения являются способы клеточной терапии, основанные на итогах расшифровки механизмов активации резидентных МСК и на совершенствовании методов целевой доставки лекарственных соединений/сигнальных факторов в область локализации МСК (King, Newmark, 2012).

Этот процесс имитирует регенерационный кардиомиогенез от резидентной клетки-предшественницы до образования колоний зрелых сокращающихся кардиомиоцитов и представляет собой полноценную модель для фундаментальных исследований, тестирования лекарственных препаратов и выявления регенерационного потенциала СК и ПК в целях возможного применения резидентных самообновляющихся клеток в тандеме с популяцией особых клеток поддержки в терапии поврежденного миокарда.

Особым инструментом для адресной доставки активных биомолекул могут стать **экзосомы** (Simons, Raposo, 2009), которые могут восполнять дефицит энергетических ресурсов (АТФ), повышая выживаемость клеток постинфарктного сердца (Arslan et al., 2013).

Комбинируя подходы, можно достигать беспрецедентного интегрального эффекта, осуществляя эффективное таргетирование, пользуясь топологическими особенностями мишеней, а именно – квазиустойчивыми микродоменами клеточных мембран, а не отдельными биомаркерами (c-kit, Sca-1), которые, как известно, экспонируются на поверхности целого ряда других

клеток, в том числе гематопоэтических. Следовательно, в рациональной версии комбинация пред- и постсекреторных вариантов способствует существенному росту селективности доставки и падению вероятности побочных реакций со стороны костного мозга и других органов.

Резюмируя вышеизложенное, следует подчеркнуть, что стволовые клетки, делясь, производят не только себе подобные элементы, но и формируют производные для клеток других типов в зависимости от особенностей межклеточного окружения и контактов. Для выращивания новых тканей и органов главная отправная точка – способность стволовых клеток к самоорганизации под влиянием микроокружения, причем эта способность к самоорганизации не единственное их преимущество. Они обладают свойством самокопирования в больших количествах без потери генетической информации, как это происходит у обычных клеток при делении – и эти замечания указывают на то, что в будущем на матрицах, содержащих стволовые клетки, станет возможно “печатать” функционально полноценные органы.

И естественно, что в перечне клеточных и органных технологий отдельную строку занимает **3D-биопринтинг (биопечать)**, ориентированный на создание объемных моделей на биосовместимой основе, рождая в итоге полнофункциональные живые ткани для регенеративной медицины, ветеринарии и трансплантации (рис. 18а–в) (Cui et al., 2018).

Таким образом, клеточная и генная терапия представляют собой две пересекающиеся области трансляционных исследований и дизайнерских разработок, которые направлены на ДНК

или РНК внутри или вне организма. Оба подхода направлены на изменение генетического материала для улучшения его физиологизма или борьбы с заболеванием. Генная терапия использует генетический материал или ДНК для репрограммирования клеток пациента и лечения наследственного или приобретенного заболевания, тогда как клеточная терапия представляет собой трансплантацию целых клеток пациенту или лицу из группы риска с очень схожими задачами (Секачева и др., 2018).

Рост рынка стволовых клеток и методов клеточной терапии ожидается в результате появления препаратов особой группы – для целей регенеративной (восстановительной) медицины и многостадийного процесса постоперационной реабилитации – многие дизайнерские разработки заняли значимые ниши на рынках США, Сингапура, Германии и Японии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уже из первых итогов становится ясно, что принципиально новое направление, именуемое “биодизайн”, способно создать структурированный рыночный биопродукт – предиктивно-диагностический тест (ПДТ), прогностический инструмент, терапевтическую фармакоконструкцию, профилактический БАД (пре- или пробиотик), превентивно-профилактический или лечебно-реабилитационный протокол. А ТраМед как инновационному оператору отрасли в целом будет принадлежать ведущая роль в развитии высокотехнологичных секторов практического здравоохранения, фарма- и нутрицевтики, и биоиндустрии в целом на протяжении ближайших десятилетий.

Таким образом, мы находимся на грани глобальных перемен! А реализация целей и задач ППМ обеспечит со временем переход от системы, ориентированной на лечение заболевания, к системе управления здоровьем собственным, которое следует отнести к составляющей безопасности национальной и Большой Евразии в целом, незамедлительно обеспечивая государственными и межгосударственными гарантиями.

Главной задачей аудитории становится координация национальной и международной деятельности, ориентируемой на проведение глобальной реформы высшего образования, целью которой является продуманное и поэтапное внедрение в практику адаптированной к национальным стандартам ресурсной базы ТраМед

как новой модели реализации биодизайнерских проектов, перевооружение которой кадровым потенциалом и технологическими платформами принципиально новой генерации гарантируется едиными усилиями трансдисциплинарной меж-ВУЗовской микросреды.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования с участием человека или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Основы персонализированной и прецизионной медицины / Ред. С.В. Сучков. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 624 с.
- Секачева Е.Г., Большакова О.В., Бондаренко В.В. Применение методов клеточной и генной инженерии в биологии и медицине // Синергия Наук. 2018. № 23. С. 980–992.
- Arslan F.I., Lai R.C., Smeets M.B. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury // Stem Cell Res. 2013. V. 10 (3). P. 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.01.002>
- Bailey R.M., Rozenberg A., Gray S.J. Comparison of high-dose intracisterna magna and lumbar puncture intrathecal delivery of AAV9 in mice to treat neuropathies // Brain Res. 2020. V. 1739. P. 146832. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146832>
- Balashova E.E., Trifonova O.P., Maslov D.L. et al. Metabolomnoe profilirovanie v izuchenii protsessov starenii [Metabolome profiling in the study of aging processes] // Biomed. Khim. 2022. V. 68 (5). P. 321–338. <https://doi.org/10.18097/PBMC20226805321>
- Bashor C.J., Hilton I.B., Bandukwala H. et al. Engineering the next generation of cell-based therapeutics // Nat. Rev. Drug Discov. 2022. V. 21. P. 655–675.
- Basler G., Fernie A.R., Nikoloski Z. Advances in metabolic flux analysis toward genome-scale profiling of higher organisms // Biosci. Rep. 2018. V. 38 (6). P. BSR20170224. <https://doi.org/10.1042/BSR20170224>

- Beckonert O., Keun H., Ebbels T. et al.* Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. P. 2692–2703.
- Bodrova T.A., Kostyushev D.S., Antonova E.N. et al.* Introduction into PPPM as a new paradigm of public health service: an integrative view // *EPMA J.* 2012. V. 3 (1). P. 16.
- Bollini S., Smart N., Riley P.R.* Resident cardiac progenitor cells: at the heart of regeneration // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2011. V. 50 (2). P. 296–303.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.07.006>
- Chappell C.R., Perez R., Takara C.O.* Growing biodesign ecosystems: community exchange spaces advance biotechnology innovation // *Res. Direct. Biotechnol. Design.* 2023. V. 1. P. e13.
<https://doi.org/10.1017/btd.2023.8>
- Carrillo-Rodriguez P., Selheim F., Hernandez-Valladares M.* Mass spectrometry-based proteomics workflows in cancer research: the relevance of choosing the right steps // *Cancers (Basel).* 2023. V. 15 (2). P. 555.
<https://doi.org/10.3390/cancers15020555>
- Castelli F.A., Rosati G., Moguet C. et al.* Metabolomics for personalized medicine: the input of analytical chemistry from biomarker discovery to point-of-care tests // *Anal. Bioanal. Chem.* 2022. V. 414 (2). P. 759–789.
<https://doi.org/10.1007/s00216-021-03586-z>
- Clarke C.J., Haselden J.N.* Metabolic profiling as a tool for understanding mechanisms of toxicity // *Toxicol. Pathol.* 2008. V. 36 (1). P. 140–147.
- Cui H., Miao S., Esworthy T. et al.* 3D bioprinting for cardiovascular regeneration and pharmacology // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2018. V. 132. P. 252–269.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.014>
- Dang D.K., Park B.H.* Circulating tumor DNA: current challenges for clinical utility // *J. Clin. Invest.* 2022. V. 132 (12). P. e154941.
<https://doi.org/10.1172/JCI154941>
- Dietrich E., Antoniadou K.* Molecularly targeted drugs for the treatment of cancer: oral complications and pathophysiology // *Hippokratia.* 2012. V. 16 (3). P. 196–199.
- Dromms R.A., Styczynski M.P.* Systematic applications of metabolomics in metabolic engineering // *Metabolites.* 2012. V. 2 (4). P. 1090–1122.
- Ellis J.K., Athersuch T.J., Thomas L.D. et al.* Metabolic profiling detects early effects of environmental and lifestyle exposure to cadmium in a human population // *BMC Med.* 2012. V. 10. P. 61.
- Ellison G.M., Vicinanza C., Smith A.J. et al.* Adult c-kit(-pos) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair // *Cell.* 2013. V. 154 (4). P. 827–842.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.039>
- Fodor W.L.* Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003. V. 1. P. 102.
- Gu W., Hasan S., Rocca-Serra P., Satagopam V.P.* Road to effective data curation for translational research // *Drug Discov. Today.* 2021. V. 26 (3). P. 626–630.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.12.007>
- Hulke M.L., Massey D.J., Koren A.* Genomic methods for measuring DNA replication dynamics // *Chromosome Res.* 2020. V. 28 (1). P. 49–67.
<https://doi.org/10.1007/s10577-019-09624-y>
- Irvine D.J., Maus M.V., Mooney D.J., Wong W.W.* The future of engineered immune cell therapies // *Science.* 2022. V. 378 (6622). P. 853–858.
<https://doi.org/10.1126/science.abq6990>
- Jiang S., Liberti L., Lebo D.* Direct-to-consumer genetic testing: a comprehensive review // *Ther. Innov. Reg. Sci.* 2023. V. 57 (6). P. 1190–1198.
- Kantor A., McClements M.E., MacLaren R.E.* CRISPR-Cas9 DNA base-editing and prime-editing // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21 (17). P. 6240.
<https://doi.org/10.3390/ijms21176240>
- Kapoor S., Rafiq A., Sharma S.* Protein engineering and its applications in food industry // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017. V. 57 (11). P. 2321–2329.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2014.1000481>
- Khanijou J.K., Kulyk H., Bergès C. et al.* Metabolomics and modelling approaches for systems metabolic engineering // *Metab. Eng. Commun.* 2022. V. 15. P. e00209.
- King R.S., Newmark P.A.* The cell biology of regeneration // *J. Cell Biol.* 2012. V. 196 (5). P. 553–562.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201105099>
- Liang K., Du Y.* Cell engineering techniques improve pharmacology of cellular therapeutics // *Biomater. Biosyst.* 2021. V. 2. 100016.
- Lizak N., Malpas C.B., Sharmin S. et al.* Association of sustained immunotherapy with disability outcomes in patients with active secondary progressive multiple sclerosis // *JAMA Neurol.* 2020. V. 77 (11). P. 1398.
- Lutz S., Iamurri S.M.* Protein engineering: past, present, and future // *Meth. Mol. Biol.* 2018. V. 1685. P. 1–12.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7366-8_1
- Ma L., Yang H.* What's next toward the bio-design and manufacturing field? // *Bio-Des. Manuf.* 2023. V. 6. P. 735–741.
<https://doi.org/10.1007/s42242-023-00260-4>
- Mann S.P., Treit P.V., Geyer P.E. et al.* Ethical principles, constraints and opportunities in clinical proteomics // *Mol. Cell Proteom.* 2021. V. 20. P. 100046.
<https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2021.100046>
- Medvedeva V., Sorenson E.J., Studneva M. et al.* The autoimmune syndrome through the prism of targeted AT-mediated proteolysis: innovative ideas, philosophy, and tools for practitioners of the next step generation // *Am. J. Biomed. Sci. Res.* 2022a. V. 15 (3). P. 319–327.
- Medvedeva V., Rose N., Miller A. D. et al.* The editorials: towards integrated biodesign-related and translational platforms to determine co-development for adaptation

- of innovative biotechnologies and to prognosticate the future of the healthcare and life science bioindustry // *British J. Health. Med. Res.* 2022b. V. 9 (4). 271–281.
- Mendell J.R., Al-Zaidy S., Shell R. et al. Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy // *N. Engl. J. Med.* 2017 V. 377 (18). P. 1713–1722. <https://doi.org/10.1056/NEJMoA1706198>. PMID: 29091557
- Mitsuishi M., Cao J., Bártolo P. et al. Biomanufacturing // *CIRP Ann.* 2013. V. 62 (2). P. 585–606.
- Neely B.A., Dorfer V., Martens L. et al. Toward an integrated machine learning model of a proteomics experiment // *J. Prot. Res.* 2023. V. 22 (3). P. 681–696. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00711>
- Oh B. Direct-to-consumer genetic testing: advantages and pitfalls // *Genom. Inform.* 2019. V. 17 (3). P. e33. <https://doi.org/10.5808/GI.2019.17.3.e33>
- Perin E., Borow K., Henry T. et al. Randomized trial of targeted transendocardial mesenchymal precursor cell therapy in patients with heart failure // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2023. V. 81 (9). P. 849–863. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2022.11.061>
- Santos A., Colaço A.R., Nielsen A.B. et al. A knowledge graph to interpret clinical proteomics data // *Nat. Biotechnol.* 2022. V. 40 (5). P. 692–702. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01145-6>
- Saw P.E., Song E.W. Phage display screening of therapeutic peptide for cancer targeting and therapy // *Prot. Cell.* 2019. V. 10 (11). P. 787–807. <https://doi.org/10.1007/s13238-019-0639-7>
- Shah S.H., Kraus W.E., Newgard C.B. Metabolomic profiling for the identification of novel biomarkers and mechanisms related to common cardiovascular diseases: form and function // *Circulation.* 2012. V. 126 (9). P. 1110–1120.
- Shuel S.L. Targeted cancer therapies: clinical pearls for primary care // *Can. Fam. Physician.* 2022. V. 68 (7). P. 515–518.
- Simons M., Raposo G. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009. V. 21 (4). P. 575–581.
- Singh R.K., Lee J.K., Selvaraj C. et al. Protein engineering approaches in the post-genomic era // *Curr. Prot. Pept. Sci.* 2018. V. 19 (1). P. 5–15. <https://doi.org/10.2174/1389203718666161117114243>
- Smith R.R., Lucio Barile L., Cho H.C. et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens // *Circulation.* 2007. V. 115 (7). P. 896–908. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655209>
- Sterner R.C., Sterner R.M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies // *Blood Cancer J.* 2021. V. 11 (4). P. 69. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7>
- Studneva M., Rose N., Gabibov A. et al. A new generation of translational tools designed to monitor multiple sclerosis (MS) at clinical and subclinical stages // *Med. Med. Sci.* 2021. V. 1 (5). P. 55–63.
- Suchkov S., Murphy S., Smith D., et al. Perspective: personalized and precision medicine (PPM) hold the hi-tech future for healthcare via biodesign to secure the human healthcare and biosafety // *World J. Mol. Med.* 2024a. V. 1 (1). P. 1–9.
- Suchkov S., Scherman D., Bonifazi D. et al. Personalized and precision medicine (PPM) as a unique healthcare model of the next step generation: the role of a nurses and nursing practice in transdisciplinary care team: the future of nursing services // *J. Med. Clin. Nurs. Stud.* 2024b. V. 1 (1). P. 1–13.
- Volk M.J., Tran V.G., Tan S.I. et al. Metabolic engineering: methodologies and applications // *Chem. Rev.* 2023. V. 123 (9). P. 5521–5570. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00403>
- Wang S.W., Gao C., Zheng Y.M. et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer // *Mol. Cancer.* 2022. V. 21 (1). P. 57. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01518-8>
- Xu Y., Ritchie S.C., Liang Y. et al. An atlas of genetic scores to predict multi-omic traits // *Nature.* 2023. V. 616 (7955). P. 123–131. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05844-9>
- Yang S., Zhu Z., Chen S. et al. Metabolic fingerprinting on retinal pigment epithelium thickness for individualized risk stratification of type 2 diabetes mellitus // *Nat. Comm.* 2023. V. 14 (1). P. 6573. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42404-1>
- Yang K.K., Wu Z., Arnold F.H. Machine-learning-guided directed evolution for protein engineering // *Nat. Methods.* 2019. V. 16 (8). P. 687–694. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0496-6>
- Zhang C., Quan R., Wang J. Development and application of CRISPR/Cas9 technologies in genomic editing // *Hum. Mol. Genet.* 2018. V. 27 (R2). P. R79–R88. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy120>
- Zhang P., Wu W., Chen Q., Chen M. Non-coding RNAs and their integrated networks // *J. Integr. Bioinform.* 2019. V. 16 (3). P. 20190027. <https://doi.org/10.1515/jib-2019-0027>
- Zhao N., Song Y., Xie X. et al. Synthetic biology-inspired cell engineering in diagnosis, treatment, and drug development // *Signal Transduct. Target Ther.* 2023. V. 8 (1). P. 112. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01375-x>

Human Health, Environmental Comfort and Well-Being. Part 1. Engineering and Design Resources of the Bioindustry on the Way to Safe Competition with the Resources of Natural Biocenoses and Health-Saving Systems

S. V. Suchkov^{a, b, g, p}, H. Abe^c, S. Murphy^{d, e}, D. Smith^f, V. S. Polyakova^{p, *},
D. Scherman^{h, i, j}, A. P. Glinushkin^k, P. Barach^l, A. O. Terent'ev^k, M. Tan^o, A. N. Suvorov^{m, n}

^aRussian Academy of Natural Sciences, Moscow, Russia

^bRussian University of Medicine, Department of Clinical Allergology and Immunology, Moscow, Russia

^cAbe Cancer Clinic, Tokyo, Japan

^dMassachusetts General Hospital (MGH), Boston, MA, USA

^eHarvard Medical School, Boston, MA, USA

^fMayo Clinic, Rochester, MN, USA

^gNew York Academy of Sciences, USA

^hEuropean Academy of Sciences, Liège, Belgium

ⁱNational Center for Scientific Research (CNRS), Paris, France

^jParis Descartes University, Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique d'Imagerie, Paris, France

^kZelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^lWayne State University, School of Medicine, Detroit, MI, USA

^mInstitute of Experimental Medicine, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

ⁿSt. Petersburg State University, Department of Microbiology, St. Petersburg, Russia

^oNAKADA Geriatric Health and Welfare Facilities, Nakada Tome Miyagi, Japan

^pUniversity of World Politics and Law, Moscow, Russia

*e-mail: med_nika2000@mail.ru

Everyone has the right to the highest attainable standard of health, and modern preventive, preventive and rehabilitative manipulations promote health and well-being. Thanks to a number of fundamental projects on the study of human health at various levels (genomic, proteomic, and metabolomic), and molecular mechanisms of the development of pathological conditions, there has been a great leap in the field of applied sectors of industrial biotechnology, including segments of the pharmaceutical and food industries, significantly replenished health-saving resources and improved the quality of life of the population. This article will review the advanced achievements of fundamental and applied research, as well as promising areas of the bioindustry.

Keywords: personalized and precision medicine, translational developments, nutritionology, biodesign, bioinformatics, biotechnology, genetics

УДК 614.2

ЗДОРОВЬЕ, ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ КОМФОРТ И БЛАГОПОЛУЧИЕ ЧЕЛОВЕКА. ЧАСТЬ 2. ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ КОМФОРТ – НОВЫЙ И СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ФАКТОР В ОХРАНЕ ЗДОРОВЬЯ СОВРЕМЕННОГО ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. С. В. Сучков^{1, 2, 7, 16}, Х. Абэ³, Ш. Мёрфи^{4, 5}, Д. Смит⁶, В. С. Полякова^{16, *},
Д. Шерман^{8–10}, А. П. Глинушкин¹¹, П. Барах¹², А. О. Терентьев¹¹, М. Тан¹⁵, А. Н. Суворов^{13, 14}

¹Российская академия естественных наук, Москва, Россия

²Российский университет медицины, кафедра клинической аллергологии и иммунологии,
Москва, Россия

³Онкологическая клиника Абэ, Токио, Япония

⁴Массачусетская больница общего профиля, Бостон, США

⁵Медицинская школа Гарварда, Бостон, Массачусетс, США

⁶Клиника Мэйо, Рочестер, Миннесота, США

⁷Нью-Йоркская академия наук, Нью-Йорк, США

⁸Европейская академия наук, Льеж, Бельгия

⁹Национальный центр научных исследований, Париж, Франция

¹⁰Университет Декарта, отделение химической фармакологии и генетики визуализации,
Париж, Франция

¹¹Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

¹²Медицинская школа Университета штата Уэйн, Детройт, Мичиган, США

¹³Институт экспериментальной медицины РАН, Санкт-Петербург, Россия

¹⁴Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра микробиологии СПбГУ,
Санкт-Петербург, Россия

¹⁵Гериатрические учреждения здравоохранения и социального обеспечения Накада,
Накада Томе Мияги, Япония

¹⁶Университет мировой политики и права, Москва, Россия

*e-mail: med_nika2000@mail.ru

Поступила в редакцию 08.02.2024 г.

После доработки 09.02.2024 г.

Принята к публикации 13.02.2024 г.

Со времен зарождения человечества Человек по своей природе стремится к состоянию защищенности, стараясь сделать свое существование максимально комфортным. Соответственно среди множества факторов, влияющих на здоровье, комфорт и благополучие человека, важными являются качество окружающей микросреды и экологии, а также система здравоохранения и ресурсы здоровьесбережения. В этом плане экологическая безопасность, обладая системным характером, привносит в модель персонализированной и прецизионной медицины существенный вклад, оптимизируя состояние баланса во взаимосвязи природных, техногенных, физиологических и социальных процессов. Соответственно индивидуализированное питание и фармакоинтервенция в превентивно-профилактических целях, являясь важными инструментами сохранения здоровья, представляют собой интегративный подход, направленный на понимание взаимодействия между питанием и окружающей средой в рамках сформировавшегося или формируемого образа жизни. В данном обзоре будут рассмотрены основные составляющие охраны здоровья человека, а также их влияние на сохранение стабильности экобиоценозов.

Ключевые слова: персонализированная и прецизионная медицина, трансляционные разработки, нутрициология, биодизайн, биоинформатика, биотехнология, генетика

DOI: 10.31857/S0042132424030047, EDN: PRWWWQ

ВВЕДЕНИЕ

Персонализированная и прецизионная медицина (ППМ) как глобально обновляемая модель охраны здоровья получила и получает развитие благодаря адресному использованию индивидуализированных (пациент-ассоциированных) манипуляций с учетом влияния генетических, фенотипических и экспосомальных (внешнесредовых или экологических) факторов (Suchkov, 2019).

Интерактомика, сетевая медицина, системная биоинженерия и их место в реализации задач ТраМед

Особое внимание мы обращаем на два сверхновых раздела системной биологии – **интерактомику** и **сетевую биомедицину**, малоизвестные широкой аудитории, но, будучи феноменальными источниками идей, крайне значимые для развития сверхновых технологий в области здравоохранения, здоровьесбережения и биоиндустрии.

Именно сетевая биомедицина и ее уникальная ресурсная база радикально поменяли как наши традиционные представления относительно первичных причин и механизмов, рождающих ту или иную форму патологии на фоне взаимодействия индивидуума с сетевыми факторами окружающей микросреды, так и смысл применения лечебно-диагностических биопрепаратов в клинике.

Концепция же сетевой биомедицины гласит, что каждая клетка помимо генов, белков и миллионов метаболитов пронизана межгенными, межбелковыми и иными сетями взаимодействий (включая регуляторные) – **интерактомами**. И согласно определению, **интерактомика** (англ. **Interactomics**) – это дисциплина, находящаяся на стыке системной биологии и биоин-

форматики, которая занимается исследованиями белок-белковых взаимодействий и оценкой последствий этих взаимодействий для клетки (Goh et al. 2007; Taylor et al., 2009; Vidal et al., 2011; Lage, 2014; Ung et al., 2016; Huttlin et al. 2017; Bludau, Aebersold, 2020).

При этом, следуя философии модели **сетевой** структуры заболеваний человека, основанных на межмолекулярных и межклеточных взаимодействиях и отображаемых в интерактоме, родилась концепция интерактомного кластера, содержащего связанные между собой молекулярные субстраты болезни и названного **модулем** заболевания. И в дополнение к вышесказанному появившиеся в последние годы инструменты сетевой медицины сформировали основу для изучения взаимодействий биокомпонентов живой клетки и интерактомных (сетевых) механизмов конкретных заболеваний. Иными словами, сегодня развитие биосистем может быть смоделировано в виде сетевых структур, где типовые характеристики могут быть представлены как узлы, а отношения между этими характеристиками – как связи между такими узлами, выдавая в руки биодизайнера уникальную сетевую палитру для моделирования в живом макроорганизме динамического взаимодействия межмолекулярных, межклеточных, межтканевых и межорганых систем. Прогресс в этом направлении сыграл колоссальную роль в выявлении ассоциированных с заболеваниями системных мутаций, создав предпосылки для эффективного поиска высокоточных биомаркеров и конструирования на их основе таргетируемых биоконструкций с диагностической и терапевтической направленностью (Conte et al., 2020).

Сегодня уже не секрет, что, контактируя друг с другом, гены и их продукты образуют сложные сети взаимодействий внутри клеток – **интерактом** (рис. 1) как карту биологически значимых



Рис. 1. Интерактом сквозь призму сетевой биомедицины.

межмолекулярных и межклеточных взаимодействий (Cusick et al., 2005; Plewczyński, Ginalski, 2009; Przytycka et al., 2010; Ghadie et al., 2018).

Расположение кластеров на карте интерактома может дать профессиональному эксперту новую информацию о связях между заболеваниями и их патогенезом. Ибо у болезней с перекрывающимися кластерами, не имеющих общих патогенных белков, все равно обнаруживаются признаки сходства, иллюстрирующие на карте интерактома взаимосвязь между степенью перекрывания кластеров с частотой возникновения сходной симптоматики в ходе развития и прогрессирования ряда болезней (рис. 2а, б).

Кроме того, с возрастанием степени перекрывания кластеров растет и вероятность возникновения этих заболеваний одновременно. Пересечения кластеров для разных болезней

на карте интерактома помогут установить механизмы развития заболеваний на основе данных о более изученных. Со временем карта интерактома человека будет уточняться и мы сможем использовать ее для предсказания эффектов тех или иных мутаций и раскрытия новых терапевтических возможностей уже используемых препаратов.

Одно из основных предположений, вытекающих из вышесказанного о том, что болезни следует рассматривать как нарушение тесно взаимосвязанных интерактомных сетей, заключается в том, что болезни в высокой степени взаимосвязаны.

Среди известных сетевых (интерактомных) структур доминируют **межгенные сети** (Bebek, 2012; Costanzo et al., 2016; Wiredja, Bebek, 2017; Cui et al., 2022) (рис. 3а–в).

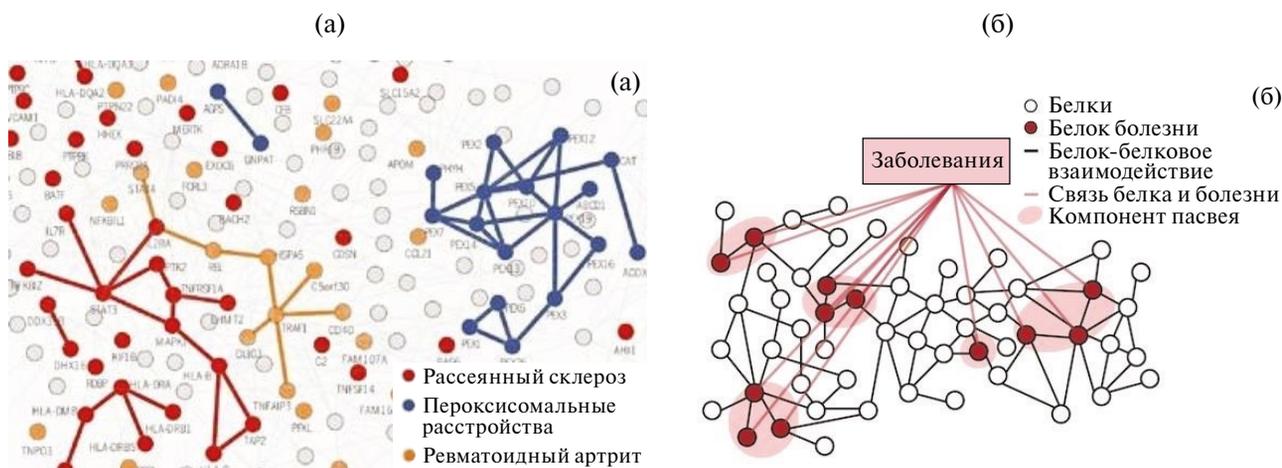
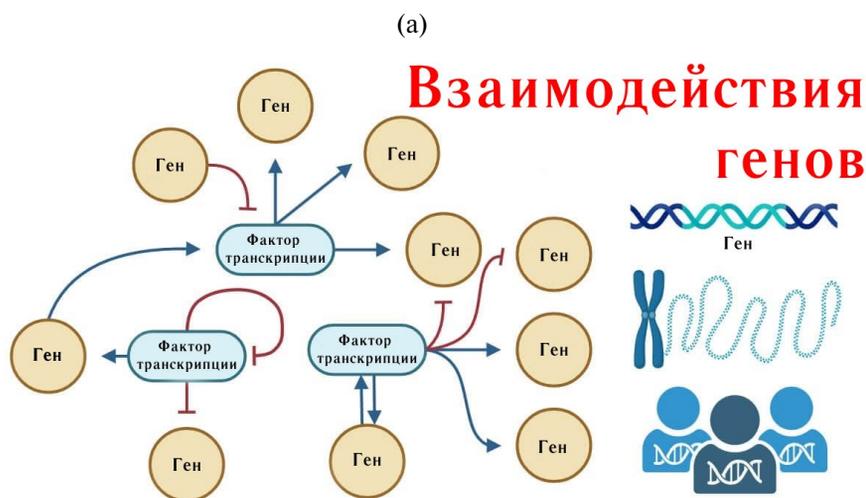
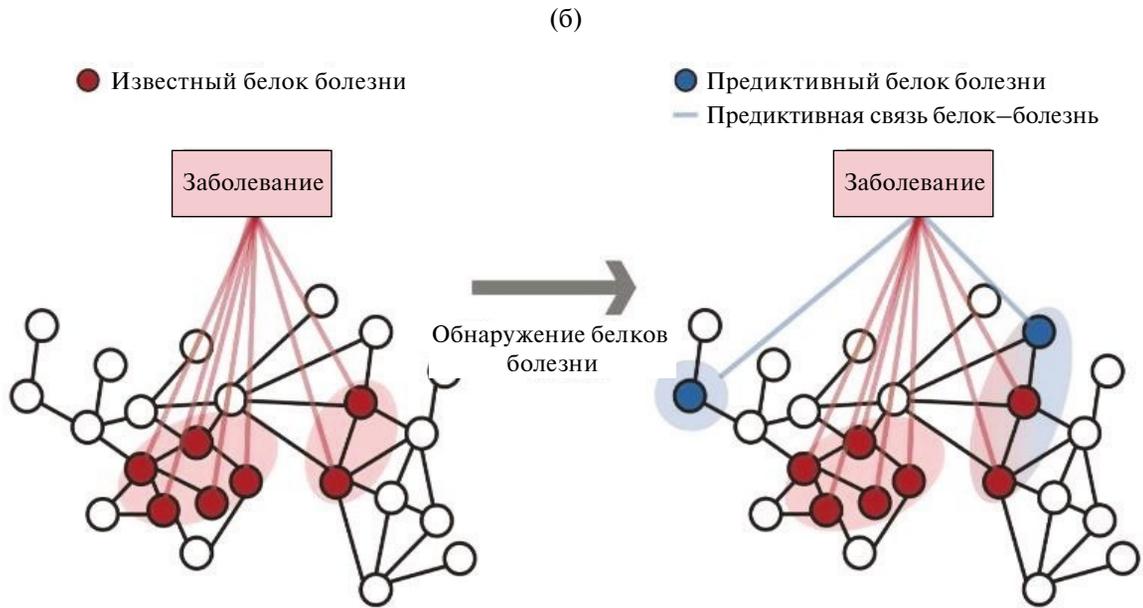


Рис. 2. Патологические кластеры на карте интерактома (а); интерактом и его особенности сквозь призму ассоциаций белок–болезнь (б).





(в)

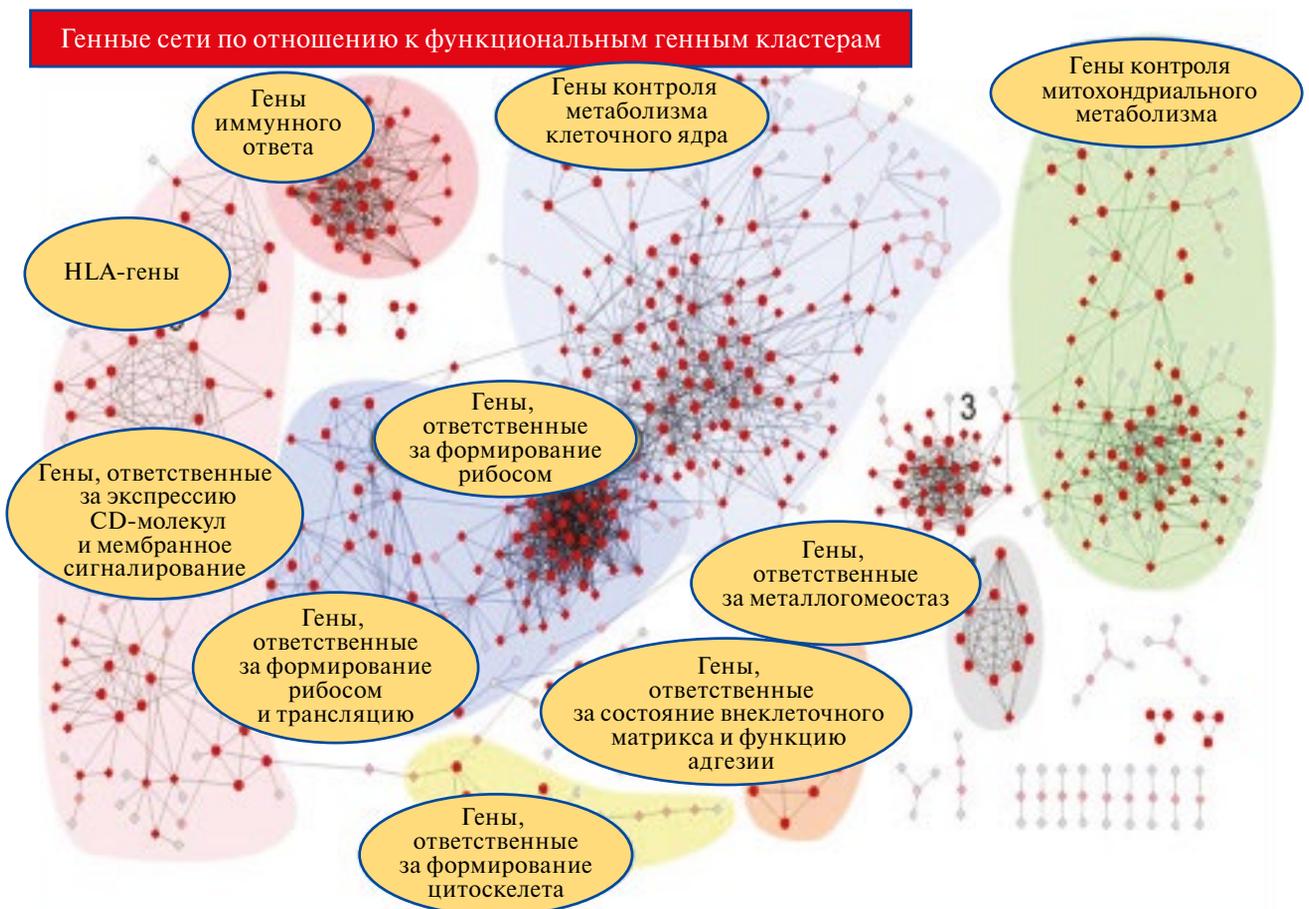


Рис. 3. Принципы межгенных взаимодействий при формировании генного интерактома (а); белки-предикторы как ключевые драйверы патогенеза заболевания (б); генные сети по отношению к функциональным генным кластерам (в).

Данные сети формируются генами и генными кластерами в целях группового контроля:

а) за работой сигнальных путей и метаболических каскадов;

б) протеканием в организме физиологических процессов;

в) формированием доклинических стадий типовых патологических процессов, например, предрака или преддиабета.

И именно в структуре интерактивных сетей специалистами клиники Мауо (США) были обнаружены огромные по размеру и объемам информации сетевые межбелковые инфраструктуры и их стратегические составляющие — **биомаркеры-интерактомы (сетевые биомаркеры/NBB и динамические сетевые био-**

маркеры/DNBB), замыкающие в своих границах большие массивы данных (Big Data), крайне значимые для функционирования регуляторных и метаболических путей и живых систем в целом. Они совершили космический рывок в отношении ресурсов систем здоровьесбережения и дизайнерской биотехнологии при создании биосистем с предиктивно-диагностической, превентивно-профилактической и лечебно-реабилитационной ориентацией (Kaiser et al., 2022). А конкретнее — для диагностики летальной формы лейкоза в индивидуальном порядке идентифицирована сеть, состоящая из 97 генов и 400 межгенных взаимодействий (рис. 4).

Соответственно случайная или индуцированная (обычно под действием патогена, онкогена

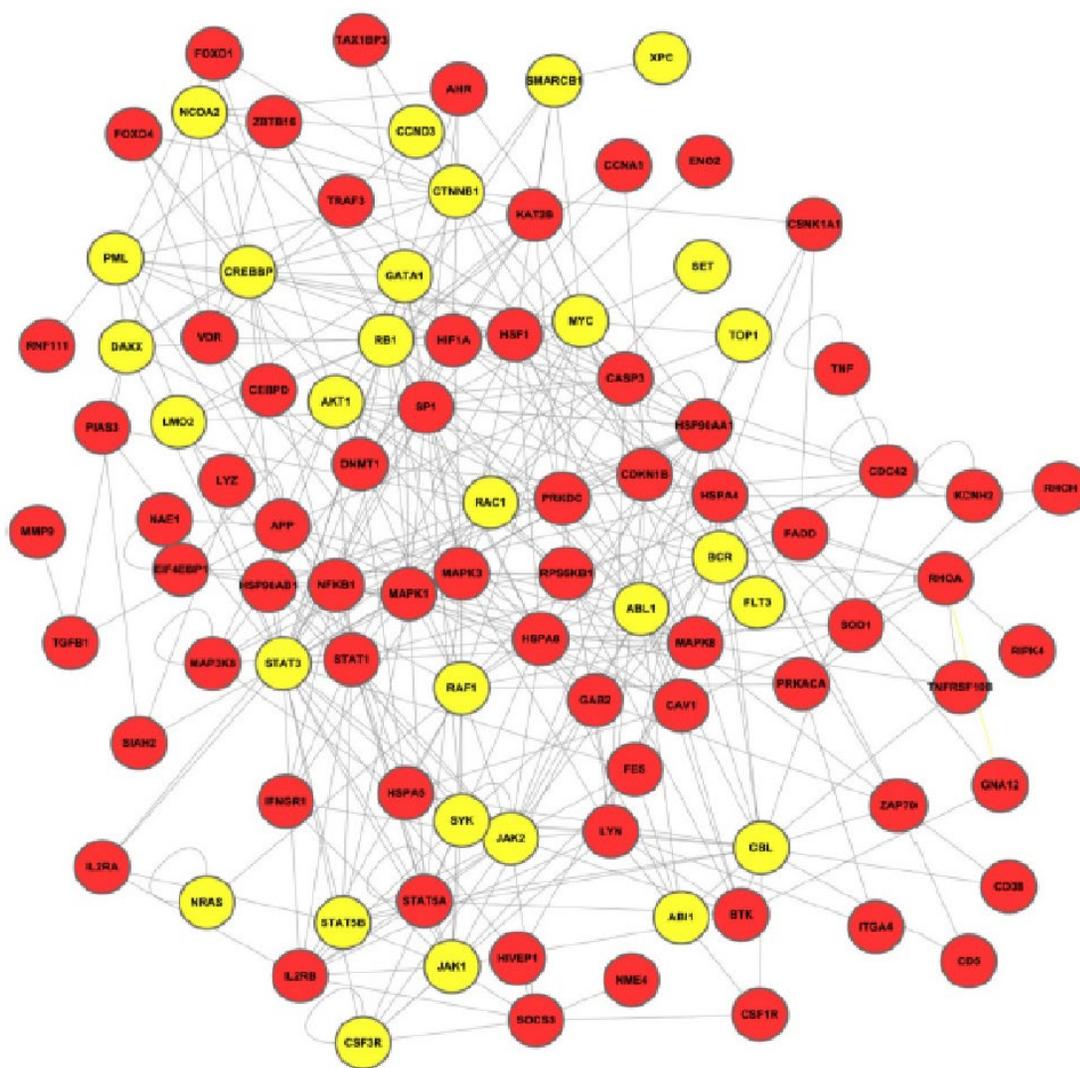


Рис. 4. Сетевые биомаркеры лейкоза (обозначены желтым цветом).

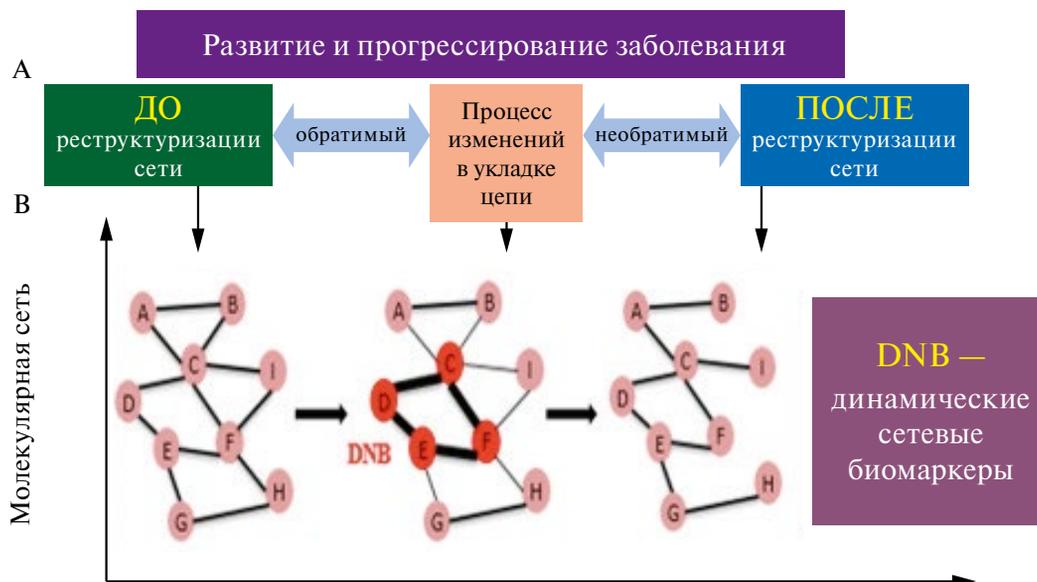


Рис. 5. Динамика формирования критических (переходных) состояний во внутренней укладке сети как стимул к рождению первой (доклинической) стадии заболевания.

или ЛП) реструктуризация внутренней укладки сетей обуславливает конформационный сдвиг с выраженной энтропийной динамикой, вызывая формирование семейства принципиально новых динамических сетевых биомаркеров (DNB), служащих природными индикаторами развития критических сдвигов и прогностическими инструментами для оценки характера и скорости прогрессирования патологического процесса (рис. 5).

Соответственно сетевые биомаркеры (NBBs) в отличие от биомаркеров-каноников стали источниками бикомпонентной информации, включая биомаркерные и сетевые взаимодействия между последними. Динамические сетевые биомаркеры (DNBBs) приглашают нас в трехмерный мир межмаркерного взаимодействия, отражая динамику сетевой инфраструктуры в ходе прогрессирования заболевания или на фоне терапевтического эффекта биофармацевтического продукта нового поколения (Fang, Chen, 2020).

Другими словами, сетевые биомаркеры могут с прецизионной точностью (безошибочно) дифференцировать три принципиально отличные друг от друга состояния — **здоровое (физиологическое)**, **больное (патологическое)** и **пограничное**, т.е. реально, генная сеть — это группа генов, координированное функционирование которых обеспечивает формирование определенного фенотипического признака организма. Характер-

ной особенностью организации генных сетей является их способность к саморегуляции за счет замкнутых регуляторных контуров с отрицательными и положительными обратными связями. А молекулярной основой существования таких регуляторных контуров является наличие сайтов-мишеней в ДНК, РНК и белках, с которыми могут взаимодействовать различные молекулярные компоненты генной сети и внешние регуляторные факторы. Благодаря этим двум типам регуляторных контуров возможно поддержание определенного функционального состояния генной сети или ее переход в другой режим функционирования, в том числе и под влиянием факторов внешней среды. А компьютерный анализ генов предрасположенности к комплексным заболеваниям с помощью баз данных и онлайн-инструментов биоинформатики позволяет строить сложные модели прогрессии заболеваний, определять потенциальные гены-мишени для терапии.

При этом любое хроническое заболевание проявляется не в нарушениях работы отдельных молекул или групповых скоплениях последних, а является прямым следствием отказа работы соответствующей сети или сетевого кластера (так называемым системном или сетевом патологическом синдроме), что можно рассматривать как совокупность взаимодействий между собой сетевых компонентов и сетей в целом.

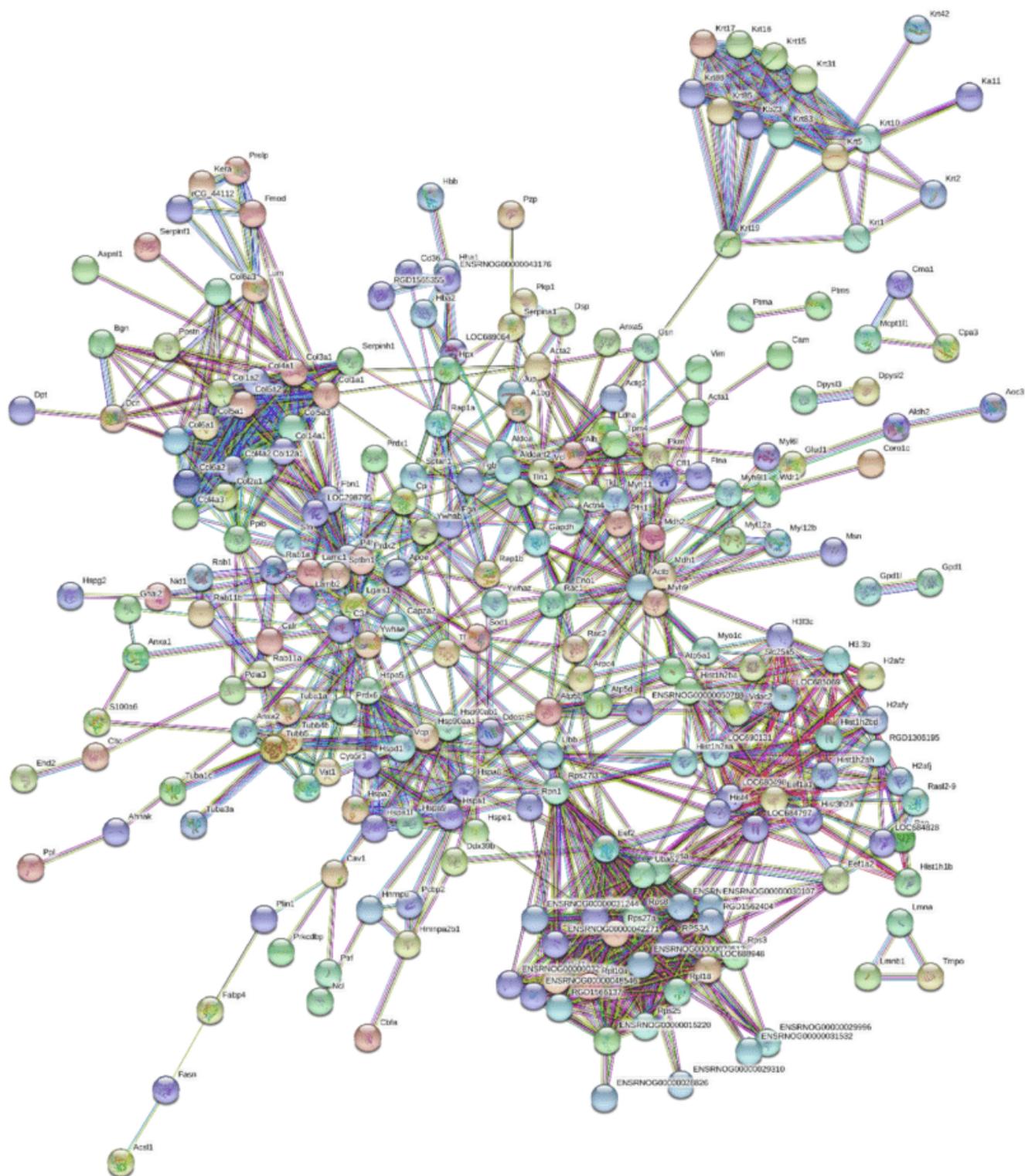


Рис. 6. Карта белок-белкового взаимодействия белков, идентифицированных в межфасциальном матриксе.

Особый интерес в работе с сетями представляют белок-белковые взаимодействия (ББВ) (Safari-Alighiarloo et al., 2014; Athanasios, 2017; Silverbush, Sharan, 2019; Karimizadeh et al., 2019; Chen et al., 2019) (рис. 6), хотя в реалиях все типы взаимодействий связаны между собой. Например, ББВ содержат много ферментов, которые, в свою очередь, образуют метаболические сети, формируя протеомо-метаболомный интерактом. Аналогично сети регуляторных генов существенно перекрываются с сетями ББВ и сигнальными сетями, формируя на выходе геномно-протеомные интерактомы (Lin, Lai, 2022).

В протеомном интерактоме взаимодействующие компоненты (в данном случае белки) называются **узлами (nodes)** или **стержневыми белками (seeds)**, а взаимодействия между узлами отображаются линиями и называются **ребрами (edges)**. Узлы, к которым сходятся много ребер, называются **хабами (hubs)** (рис. 7а, б).

В интерактоме человека 650 000 взаимодействий (ребер) между 25 000 белками (узлами) формируют модули, играющие важную роль в заболеваниях и являющиеся крайне полезными инструментами для характеристики биологических процессов на глобальном уровне генерирования новых гипотез, которые могут быть дополнительно проверены и применены при создании лечебно-диагностических биофармакоконструкций.

И совершенно очевидно, что динамическая реструктуризация внутренней укладки сетей диктует биодизайнеру необходимость:

1) системного сравнительного анализа конфигураций физиологических и патологических состояний сетевых структур для идентификации максимально информативных сетевых биомаркеров в целях высокоэффективной и надежной диагностики, мониторинга и терапии;

2) разработки высокоточных (прецизионных) ЛП принципиально нового поколения для минимизации рисков патологической трансформации исходной (физиологической) конформации сетевой инфраструктуры в ее патологический аналог – ЛП с превентивно-профилактическим эффектом таргетной ориентации.

Соответственно межбелковые интерактомы и стали платформами для идентификации стратегических сетевых биомаркеров следующего поколения и создания на основе последних диагностических, превентивно-профилактических и лечебных биопрепаратов дня завтрашнего.

Учитывая высокий уровень сложности в интерпретации и практическом использовании ресурсной базы интерактомики, неудивительно, что интерактомные сети и сетевые взаимодействия в целом еще не полностью просчитаны. Но в скором времени станет доступен полный каталог вариантов последовательностей среди приблизительно 7 миллиардов человеческих геномов, живущих на Земле людей. При этом биоинформатика и математическое моделирование, и интерактомика в частности, будут иметь решающее значение для развития дизайнерских проектов в сфере трансляционных исследований и разработок (ТрИиР).

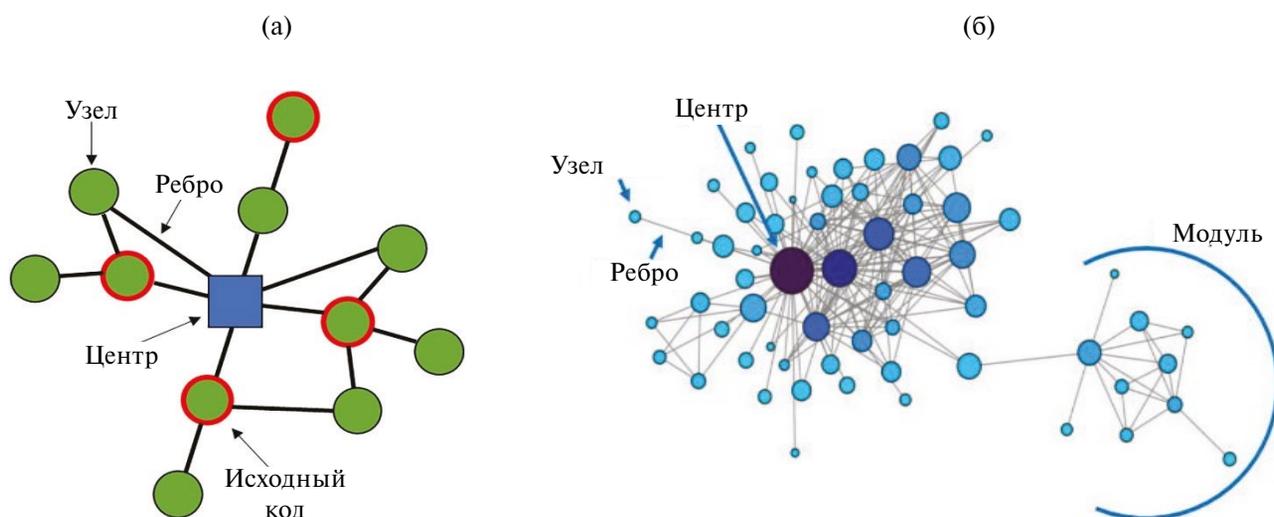


Рис. 7. Схематическое представление компонентов сети (а); пример сети с указанием узлов, ребер, центрально расположенных генов (концентраторов) и групп тесно связанных генов (модулей) (б).



Рис. 8. Цифровой сервис подбора рациона персонализированного питания.

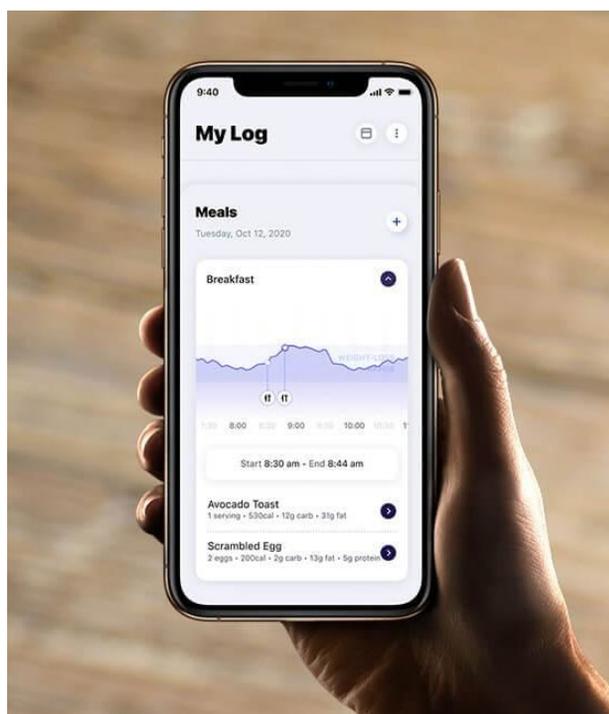


Рис. 9. Программные сенсорные пакеты Signos и MINA.

Персонализированная нутрициология, молекулярная гастрономия и прецизионная фудомика в реализации задач ТраМед

Исключительную привлекательность для инвесторов составляют тенденции, ориентированные на биологизацию дизайнерских IT- и нано-сенсорных технологий, открывающие широкие возможности по созданию миниатюрных сенсорных и калькуляторных нанобиоустройств, способных работать внутри живого организма и одновременно в контакте с окружающей природой (Fernandez, Raine, 2021) (рис. 8).

Такого рода устройства встраивают в живой организм для детекции заболеваний или применяют в работе с пищевыми продуктами, а также используют для мониторинга основных метаболических процессов с обработкой аккумулируемых данных и принятием обоснованных врачебных или ветеринарных решений. Среди них – программные сенсорные пакеты Signos, MINA (Mixfit Intelligent Nutrition Assistant) и Seahorse (рис. 9, 10).

Они гарантируют для обученных клиентов: а) контроль за основными метаболиче-



Рис. 10. Программный сенсорный пакет Seahorse.

скими процессами по динамике базовых показателей крови и б) поиск оптимальных модификаций в режимах питания (Signos) или обеспечивают специалистов-диетологов и фуд-дизайнеров разработкой индивидуальных протоколов персонализированного (как здорового, так и функционально-сбалансированного или специализированного) питания в почасовом, суточном и месячном режимах и, соответственно, готовыми к употреблению обоснованными решениями (MINA).

Не менее значим для ежедневной практики среди группы пациентов и лиц из групп риска сенсорный пакет Seahorse (рис. 10). Данный гаджет гарантирует: а) отслеживание уровня гликемии; б) контроль за основными метаболическими процессами по динамике базовых пока-

зателей крови (для спортсменов и лиц, работающих в стрессовых и экстремальных ситуациях) и в) поиск оптимальных рационов и режимов питания в состоянии отдыха и спорта.

Особую роль в реализации задач в сферах охраны здоровья и здоровьесбережения играют нутрибио- и агробиодизайн, а также ассоциированные с ними нутрибио- и агробиоинженерия. К инновационным продуктам последних следует отнести нутрицевтики-функционалы, БАДы, специализированные пищевые добавки, витамины и минералы, а также таргетные пре-, про- и метабиотики (включая мультиштаммовые) с превентивно-профилактической ориентацией.

Возвращаясь к нутрицевтикам, следует подчеркнуть, что нутрицевтические биомаркеры



Рис. 11. Нутрицевтические биомаркеры в практике врача-нутрициолога и профилактике заболеваний с наследственными и алиментарными формами патологий.

отражают реакцию геномно-конституционального ландшафта организма на поступление в организм пищевых ингредиентов с последующим влиянием продуктов их расщепления на экспрессию адресных наборов генов (включая гены, отвечающие за метаболизм жирных кислот). Соответственно для оценки поставленных целей и задач врач-нутрициолог использует комбинацию методов липидомики, метаболомики, геномики и протеомики при построении карт взаимодействий между липидными профилями и характером экспрессии генов у пациентов с различными формами заболеваний в целях идентификации надежных **нутриобиомаркеров**, иллюстрирующих значимые биологические процессы, патологические сдвиги в организме обследуемого лица и эффективность проводимой фармако- и диетотерапии (Matthews, Norman, 2021) (рис. 11).

В этом ключе следует особо подчеркнуть поколение интегративных сетевых биомаркеров, способных обосновывать комплексные оценки не только поглощения пищевых ингредиентов, но и их метаболизма, открывая дорогу для аналитической работы над участием пищевых рационов и специализированных диет-протоколов в провоцировании тех или иных форм заболеваний и обнажая влияние процессов переваривания пищи и продуктов переваривания на системы мета- и эпигеномного контроля. Диет-значимые интерактомы могут различаться в тканях и по стадиям развития, являясь по-

лезными инструментами для характеристики системных физиологических и патологических процессов на глобальном уровне и для генерирования платформ в ходе создания дизайнерских фарма- и нутрицевтиков новых поколений.

Резюмируя вышесказанное относительно ценности нутригеномного профилирования и его вклада в развитие персонализированной нутрициологии, прецизионной фудомики и кастомизированных диет для целевых групп индивидуумов (больные дети, спортсмены, лица в экстремальных ситуациях), следует подчеркнуть, что огромную роль в превенции и профилактике хронических заболеваний и оптимизации диетического рациона для специализированных групп потребителей играют технологии и протоколы **прецизионной фудомики** (рис. 12а, б) (Vimalaswaran et al., 2015; Ferguson et al., 2016; Chaudhary et al., 2020; Osada, 2023).

Именно ресурсы персонализированной нутрициологии и прецизионной фудомики реализуют прямую зависимость компонентов рациона от картины эпигеномного метилирования ДНК (геномный фактор) с одной стороны и метаболического баланса (феномный фактор) – с другой (рис. 13).

При этом стратегическая цель фуд-дизайнера – чтобы потребитель мог есть ТУ, что принадлежит только ЕМУ, но получая визуальное, тактильное, вкусовое и чувственное удовольствия и одаривая себя ментальным осознанием того,

(а)



(б)

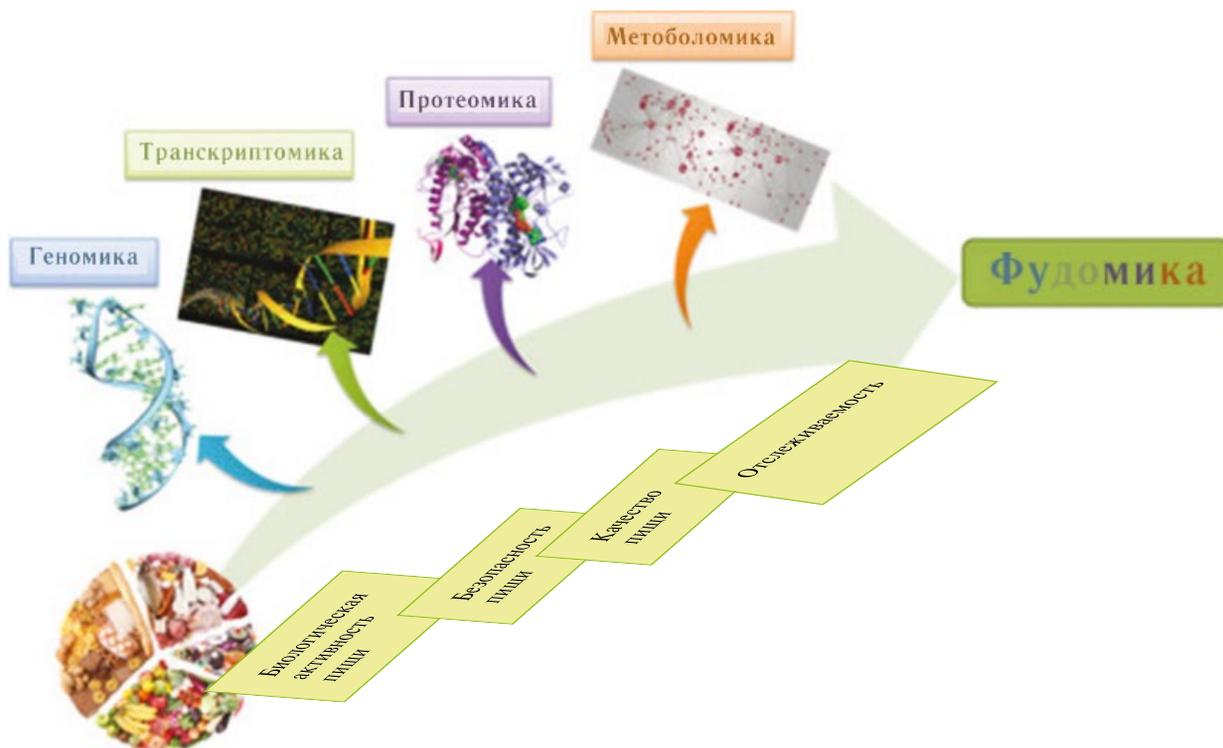


Рис. 12. Архитектура фудомики (а); архитектура фудомики с позиций ОМИКС-технологий (б).

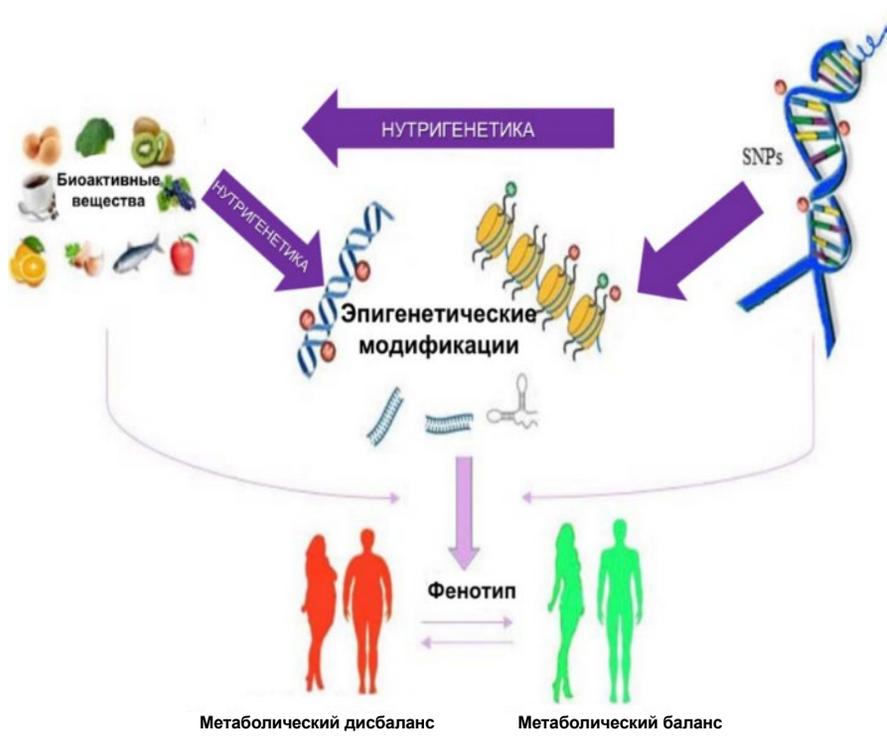


Рис. 13. Перспективы персонализированной нутрициологии и прецизионной фудомики: взаимоотношения между геномным ансамблем, компонентами диеты, обменом веществ и здоровьем.

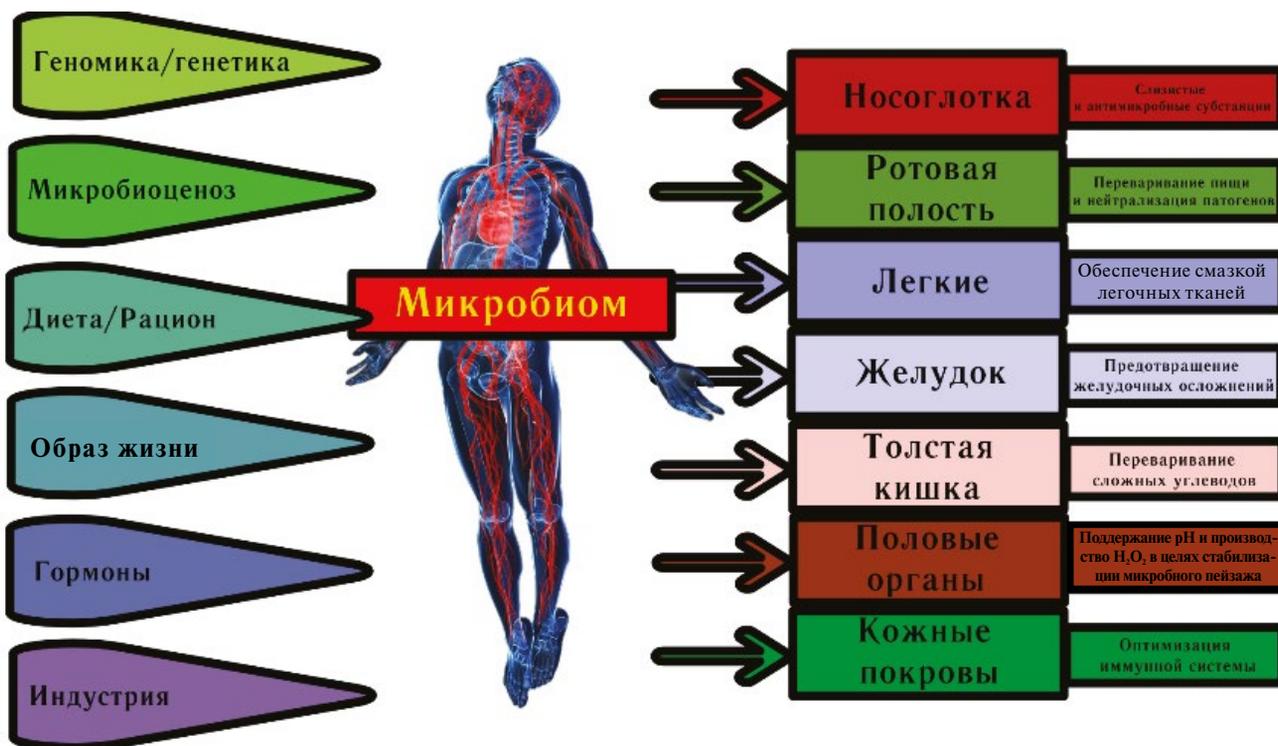


Рис. 14. Эталонный микробиом сквозь призму взаимоотношений с режимом питания, отдыха и микроокружением.

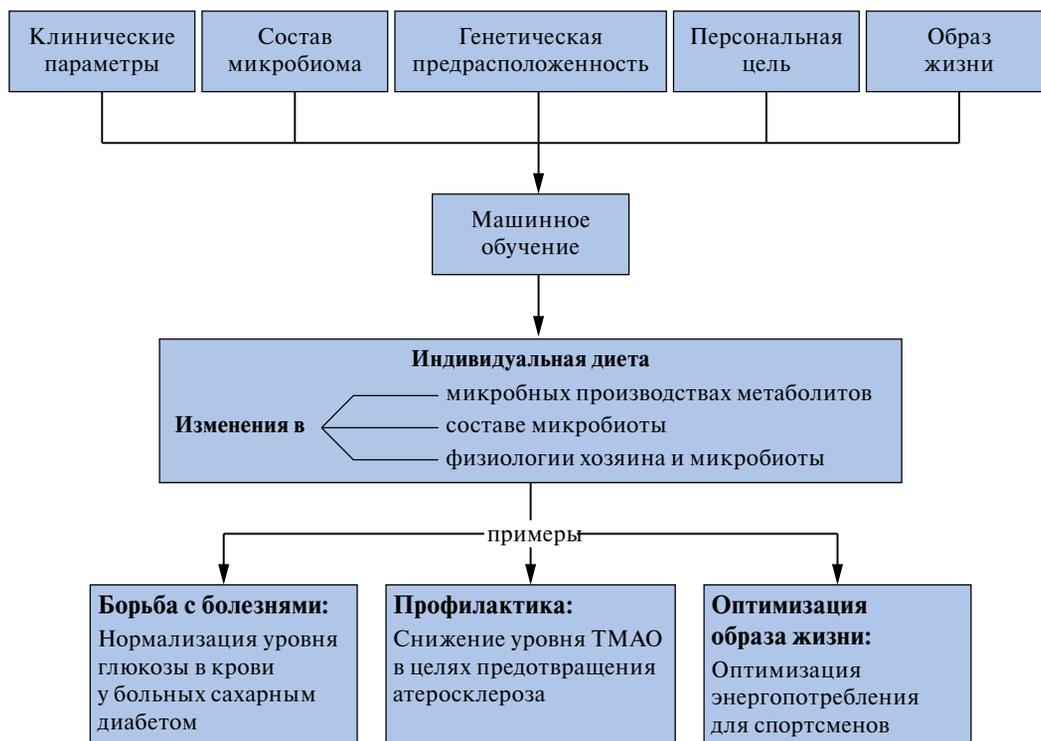


Рис. 15. Дизайн диеты на основе спектров микробиоты.

что происходит с едой и с ним лично в процессе ее поглощения. А еще точнее и глубже, фуд-дизайнеру будущего нужен иной взгляд на питание в целом, акцентируя осевое внимание на тройке **потребитель–еда–микробиоценоз**, просчитывая для каждого индивидуума помимо прочего и “эталонный” микробиом (рис. 14).

Соответственно **персонализированная нутрициология** (в паре с нутригеномикой) и **прецизионная фудомика** в едином тандеме рассматриваются как инновационный взгляд на здоровое питание, основанный на оценке взаимодействий между геномами трех типов: а) геномами употребляемых в пищу организмов; б) геномами эндомикробиоты и в) геномом человека-потребителя, служащего хозяином для вышеуказанных геномных наборов.

Интеграция этих индивидуальных показателей хозяина и эндомикробиома в единые рабочие модули эффективно дополняет устаревшие и исчерпавшие свой потенциал традиционные подходы к оценке диетологических паттернов и определяет спектр пищевых продуктов при разработке индивидуализированных диет с прецизионной гастрономией в рамках программы по управлению собственным здоровьем (ПУСЗ) (Di Renzo et al., 2019).

Таким образом, сгенерированные диетой микробиомные, эпи- и метагеномные сдвиги могут быть использованы для разработки сбалансированных протоколов персонализированных диет и, соответственно, оптимизации физиологического здоровья клиента-хозяина с профилактикой заболеваемости. А обеспеченная экспертом-диетологом и фуд-дизайнером целевая персонализация диет и рационов направлена, помимо прочего, и на выявление ключевых особенностей микробиома, используя для этих целей соответствующие ИТ-алгоритмы и базы данных (рис. 15).

Подытоживая вышесказанное, следует упомянуть о дизайнерской разработке находящегося на стадии апробации уникального полифункционального нутригенетического теста GENOMEX, способного определять индивидуальную предрасположенность к ожирению путем математической оценки взаимоотношений между генами-драйверами и провоцирующих ожирение факторов, а также безошибочно рекомендуя клиенту спектр лечебных манипуляций по коррекции избыточного веса, предлагая для этих целей строго индивидуализированные диет-протоколы.

Соответственно в сегментах, например, детства, активного школьного возраста, творческой юности и студенчества, плодотворного среднего возрастного периода и креативного долголетия обоснованная итогами мультигеномного тестирования персонализированная диетотерапия становится ориентированной на оптимизацию продуктивного потенциала личности в соответствии с вышеуказанным возрастным диапазоном, повышая тем самым планку возраста и средней продолжительности жизни современного человека и предоставляя ему ряд гарантий.

При этом система поддержки принятия врачебных решений (СППВР) обеспечивает информационное сопровождение врача при обследовании и ведении пациента, будучи ориентированная на принятие обоснованных (врачебных и нутрицевтических) решений. А интеграция СППВР, электронных медицинских карт (ЭМК), историй болезни (ИБ), индивидуализированных диет-протоколов и кастомизированных рационов, а также медицинских регистров (MedReg) в целом оказывает для здоровьесберегающих технологий высококачественную помощь, оказание которой минимизирует потенциальные и прогнозируемые риски и угрозы здоровью конкретных индивидуумов или популяций, проживающих в определенных регионах, биоценозах и даже эпидочагах. Соответственно на любой из стадий болезни или предболезни генетическое тестирование дает возможность получать информацию об индивидуальном риске, выявляя патологический процесс на его доклинической стадии и далее обеспечивая эффективный и своевременный контроль по предикции и прогнозированию стадий прогрессии, рисков осложнений, угроз рецидивов и эффектов от лекарственных и нутрицевтических биопрепаратов.

Масштабы индивидуальных рисков определяются специальными расчетами на основе валидированных панелей биомаркеров с использованием соответствующих алгоритмов и программ и требуют своевременной и эффективной коррекции. Финальные итоги предиктивно-прогностического, диагностического и мониторингового тестирования используются в создании единых информационных баз (электронных историй болезни и медицинской документации, а также биобанков), необходимых для системного обеспечения мониторинга индивидуального здоровья (с использованием мобильных телесистем и облачных технологий). Более точно, мы на пути к использованию риск-ориентирован-

ной предиктивно-прогностической и мониторинговой диагностики дня завтрашнего.

И, соответственно, стратегическим сегментом построения эффективной биозащиты (индивидуального, популяционного и национального плана) становится глобальная система мониторинга продовольственной и лекарственной безопасности с учетом отдельных (интегрируемых) показателей хронической заболеваемости, обеспечивая данный вид сервиса соответствующей инженерной инфраструктурой и инструментами контроля за рисками развития регионов с эпидочагами, массовыми недоеданиями и отравлениями.

Персонализированная нутрициология, молекулярная гастрономия и прецизионная фудомика, делающие свои первые пионерские и осторожные шаги, уже объединяют широкий круг врачей-клиницистов, молекулярных экспертов-диетологов и фуд-дизайнеров, разработчиков алгоритмов и создателей банков данных, сетевые госпитальные и поликлинические структуры, школы и детские сады, а также службы по уходу, фитнес-центры и множественные ритейл-точки (магазины, разносчики пищевых заказов, рестораны и др.). И естественно становится очевидной редкая по масштабу, но дружественная и одновременно коммерческая кооперация частных инициатив и широкой поддержки со стороны социума в форме общественно-частного партнерства, активно стимулирующая претворение в реальной практике технологических инноваций персонализированной нутрициологии, прецизионной фудомики и фуд-дизайна как стратегического сегмента охраны здоровья и здоровьесбережения в целом (Marcum, 2020).

Соответственно в рамках консенсуса между учеными-исследователями, экспертами-дизайнерами, врачами-клиницистами, лидерами в сфере пищевой биоиндустрии, а также политиками и стратегами мы способны продвигать на рынок глобального здорового питания уникальную ресурсную базу персонализированной нутрициологии, прецизионной фудомики и пищевой биоиндустрии, оптимизируя при этом пути доступа к вышеуказанным секторам. Ибо именно эти сектора, существенно влияющие на системы здоровьесбережения и состояние агропродовольственного рынка, ощутимо затрагивают национальную биобезопасность, выступая серьезным гарантом: продовольственной безопасности, стабильности национальных генофондов и позиций России в мировом рыночном пространстве глобального питания.

Итак, мы начинаем понимать, что ППМ как модель следующего поколения безупречно проинтегрировала в фундаментальные, клинические, инженерно-дизайнерские и IT-сектора современной науки, демонстрируя источники интеграции новейшего технологического инструментария сквозь призму целей и задач практической медицины и здоровьесбережения.

Биоинформатика, математическое моделирование и их место в реализации задач ТраМед

Современная медицина, принципы профилактики и охраны здоровья остро нуждаются в инновационном инструментарии, а также ЛП и нутрицевтических средствах принципиально новых поколений, гарантом которых становится ТраМед, в пакете которой весомое место заняла **биоинформатика**, основанная на принципах системной и структурной биологии, обеспечивив существенный прорыв в контроле за поведением сложных биологических систем с одной стороны и математическом моделировании динамики сетевых инфраструктур – с другой (Tenenbaum, 2016; Vano et al., 2020; Taguchi, 2023).

Большинство из задач здоровьесбережения, экологического комфорта и благополучия уже решаются в рамках уникальных ресурсов биоинформатики (алгоритмов искусственного интеллекта, машинного обучения и блок-чейна), обеспечивая феноменальный способ обработки, майнинга и интерпретации огромного (Гулливера) массива данных (Big Data) и позволяя:

а) реконструировать геномные коды (что в перспективе важно для биодизайна и ТраМед в целом);

б) выявлять информацию в виде сигналов и кодов, необходимую для формирования следующих уровней экспрессии генов и их продуктов – протеома и метаболома;

в) конструировать модели современных предиктивно-диагностических инструментов и целевых ЛП и нутрицевтиков следующих поколений.

Так, в частности, с помощью программного инструментария искусственного интеллекта и алгоритмов, которые обрабатывают миллионы молекулярных структур, оцениваются потенциальные свойства фармацевтических и нутрицевтических биоконструкций, оценивая данные о том, как ЛП или БАДы действовали в прошлом, тем самым самообучая рабочую платформу и наделяя последнюю перспективной ресурсной базой (Choi et al., 2020).

Применение ресурсов искусственного интеллекта и машинного обучения позволяет: 1) серьезно повысить точность диагностики; 2) сделать реальным рождение сверхэффективных персональных лекарств и БАДов; 3) обеспечить рождение персонального ассистента в каждом смартфоне, служащего для потребителя координатором фармакотерапевтических и нутрицевтических протоколов профилактики и лечения.

Как следует из вышеизложенного, сбор и анализ больших массивов информации с созданием многоуровневых общих и специализированных банков данных приближает человечество к пониманию и адекватным оценкам индивидуальных особенностей экспрессии генов с одной стороны и формулировке прецизионных оценок рисков для здоровья индивидуума – с другой, оптимизируя тем самым планку возраста и средней продолжительности жизни современного человека и предоставляя ему ряд гарантий. Соответственно стратегическим сегментом построения эффективной биозащиты человечества становится глобальная система мониторинга состояния индивидуального, популяционного и национального здоровья вкупе с продовольственной и лекарственной безопасностью, обеспечивая данный вид сервиса соответствующей инженерной инфраструктурой и инструментами контроля за рисками развития регионов с угрожающими здоровью признаками и тенденциями.

По прогнозам международных аналитиков, мировой рынок биоинформатики в сфере биодизайна и ТраМед к 2024 г. вырастет до \$11.05 млрд (в 2014 г. он составлял всего \$419.7 млн). При этом наиболее быстрорастущими сегментами станут: а) ППМ, б) биофарминдустрия, основанная на продуктивности фармакодизайновых проектов, и в) пищевая индустрия, проинтегрированная с секторами нутриобиодизайна. Мотивации – моделирование форматов лечения и ТрИиР принципиально новых поколений (Jiang et al., 2020).

Огромный прикладной потенциал биоинформатики совершенно очевиден, причем ее роль важна как для медицины, так и для самых различных сфер, включая биодизайн и ТраМед. Соответственно конвергенция фундаментальной биомедицины, системной биологии, биоинформатики и современных технологических биоплатформ, наблюдаемая как явление на фоне соответствующих социальных и экономических сдвигов, становится парадигмой сегодняшнего дня.

*Биоиндустрия и экологический комфорт
сквозь призму ППМ и медицинской экологии –
новый стиль в охране здоровья
современного человека как участника
промышленной революции*

Не секрет, что промышленная биотехнология как осевой сегмент систем охраны здоровья, ресурсов здоровьесбережения и биоиндустрии создает фундаментальную основу промышленности, по-своему решающей проблемы материальных ресурсов, обеспечения энергией, охраны окружающей среды и формирования потенциальных рисков для человечества.

Первоначально интерес человечества был обращен к определению влияния природы на человека, позднее – к вопросам оценки состояния природной среды, а в конце XX–начале XXI в. акцент сделан на рациональном использовании природных ресурсов, поиске путей минимизации техногенного воздействия на природную среду, устойчивом региональном развитии. Соответственно устойчивое социально-экономическое развитие территории немислимо без учета экологических факторов, предполагающего всестороннюю оценку любого действия человека на среду его жизнедеятельности и биосферу в целом. И человечество сегодня вынуждено решать чрезвычайно сложную задачу: как при эффективном использовании природных ресурсов или ресурсов, подвергнутых инженерно-дизайнерским манипуляциям, нанести наименьший ущерб самой природе, а также жизни и деятельности населения (Fu, 2018).

При этом возникновение экологических проблем связано с интенсивным влиянием человека на природу, которое приобретает опасный и агрессивный характер. А круг приложений биотехнологии достаточно широк и включает такие направления, как:

- а) пищевая, фармацевтическая и химическая промышленность;
- б) агробиоиндустрия;
- в) практическая медицина;
- г) эковиоиндустрия, которая, используя эковиотехнологии, снижает антропогенную нагрузку путем целого ряда природных и инженерных манипуляций.

Среди вышеуказанных экотехнологий с диагностической, мониторинговой и превентивно-профилактической ориентацией особое внимание привлекают **нанобиосенсоры** (при восстановлении природных объектов как основ

жизнеобитания), применение которых крайне эффективно в тандемах с технологиями **фиторемедиации** (с использованием растений) и **биоремедиации** (с использованием микроорганизмов), минимизирующих риски и угрозы здоровью с одной стороны и сохраняющих в общем экологическом каркасе природные ресурсы здоровьесбережения нетронутыми – с другой. (Для справки: **экологический** каркас территории, обладающей присущими ей природными и антропогенными свойствами и ресурсами, – это совокупность экосистем с индивидуальным режимом природопользования для каждого участка, образующая пространственно-организационную инфраструктуру, которая поддерживает экологическую стабильность территории (Лебедев, 2008)).

Таким образом, особую значимость в общей инфраструктуре такого рода каркасов в современном мире промышленной революции приобретает **экологический комфорт** – комфорт для личности в условиях промышленной революции, развития ранее недоступных менталитету человечества секторов биоиндустрии и, соответственно, рождаемых на стыке бесчисленного количества отраслей биоиндустрии нового направления **эковиомедицины**, недавно утвержденного ВОЗ и ориентируемого на обеспечение экологической безопасности человека как индивидуума и/или отдельных популяционных сообществ. Поэтому, осознавая ограниченность природных благ и рост качества окружающей человека природной среды, крайне важным аспектом современной системы образования и воспитания становится формирование нового отношения человека к природе, а также воспитание и поддержание экологической культуры в социумах, что по достоинству заслужило международную популярность, выступая важнейшим инструментом в решении проблемы охраны природы и поддержания генофондов человечества в индивидуальном, популяционном и национальном ключах (Гнедых, 2010; Хуррамов, 2012).

К сожалению, однако, традиционная медицина с многовековым стажем игнорирует роль экологического фактора в генезе целого ряда экпатологий (включая сахарный диабет или аллергические реакции, спровоцированные продуктами современной пищевой промышленности или биоиндустрии вакцин). А под воздействием факторов окружающей среды прогрессируют 80% из 6000 известных заболеваний, что побуждает нас задуматься о необходимости развития сфер **персонализированной** (продиктованной данными по геномному ландшафту кон-

кретного индивидуума) нутрициологии и **прецизионной** вакциномики соответственно (Гнедых, 2010). На этом фоне, с истощением выработанных в ходе эволюции защитных механизмов, обезвреживающих внешние повреждающие агенты, связывают деградирующее репродуктивное здоровье, нарушения иммунной сферы, вспышки новых неописанных заболеваний, рождение мутировавших агрессивных форм рака, усиление эффектов хронически протекающего переутомления и процессов нейродегенеративного поражения нервной системы. А с таким угрожающим фактором внешней среды как городское образование связывают возрастающую и преобладающую долю хронических в общем реестре заболеваний.

Особое внимание следует уделить рискам возникновения эпи- и пандемических очагов – когда в ответ на изменения окружающей среды первые (доклинические) стадии многих заболеваний возникают внутриутробно, что особенно актуально для детей с врожденными пороками развития, орфанными заболеваниями и др. В таких случаях ресурсы ППМ незаменимы, оказывая не традиционно интуитивные лечебные, а генетически обоснованные превентивно-профилактические эффекты, вооружая экологическую медицину уникальной философией персонализированного подхода к таргетным манипуляциям с клиентом (пациентом или ЛГР).

На государственном и, естественно, социальном уровнях ППМ такого рода должна выглядеть как повышение экологической культуры общества, но, к сожалению, носителей экологического знания, а тем более, интегрированного с пониманием концепции ресурсов здоровьесбережения и пониманием новейших возможностей обновляемой модели охраны здоровья, у нас мало.

При этом, однако, активное использование разработок в области ППМ, стремление к экологическому комфорту и инновациям можно ожидать уже к 2024 г. при том, что уже на настоящий момент мировой рынок ППМ оценивается в 4 трлн долл. Большое значение в границах продвинутых рынков приобретают ПУСЗ, отличающиеся профилактической направленностью и ориентированные на комплексное удовлетворение потребностей человека как участника рыночных преобразований, потребителя и рынка в целом.

В рамках таких программ производятся прецизионные мониторинговые оценки промежу-

точных итогов взаимодействия между тестируемым индивидуумом, окружающей средой (микроэкобиоценозом), спектром применяемых таргетных ЛП, персонализированных вакцин и нутрицевтиков, особенностями питания и спецификой образа жизни – ключевых факторов, влияющих на состояние здоровья любого индивидуума и человеческой популяции в целом. Иными словами, ставка делается не на традиционного врача-лекаря, а на обученного индивидуума в паре с доктором-специалистом и врачом-координатором принципиально новой генерации, который и становится своего рода “дирижером” многостадийного процесса управления индивидуальным, популяционным, а в итоге национальным здоровьем в его превентивном и профилактическом ключах и который способен обеспечить национальную биобезопасность в условиях мировой глобализации, когда важнейшим конкурентным преимуществом в роли приоритетного становится индекс человеческого развития как показатель уровня цивилизации той или иной страны (Voevodin et al., 2017).

При этом стратегический вклад в формирование современного облика ППМ с одной стороны и биоиндустрии и ее секторов – с другой вносят **биодизайнеры** – многопрофильные творцы-создатели биопродуктов и, соответственно, основоположники биоэкономики будущего (Для справки: в США к настоящему времени построено более 250 центров дизайнерских и трансляционных разработок с совокупными годовыми бюджетами порядка 45 млрд долл.). Соответственно ОБЩЕСТВУ жизненно необходима принципиально новая дизайнерская ШКОЛА в сфере промышленной биотехнологии, имеющая академические, инженерно-производственные и маркетинговые корни.

Решение такого, казалось бы, сверхсложного вопроса возможно уже сегодня, реализуя организацию дизайнерских проектов и управление ими подготовленными экспертами-биодизайнерами и управленцами-биоантрепренерами принципиально нового поколения. И, полагаясь на прагматический оптимизм, наше (российское) профессиональное сообщество обязано на базах целого ряда ВУЗов и компаний выстроить первую (пионерскую) конструкцию магистерской программы “Биодизайнер и биоантрепренер в создании и реализации безопасных для человечества инновационных проектов в области промышленной биотехнологии и биоиндустрии”.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уже из первых итогов становится ясно, что принципиально новое направление, именуемое “**биодизайн**”, способно создать структурированный рыночный биопродукт – предиктивно-диагностический тест (ПДТ), прогностический инструмент, терапевтическую фармакоконструкцию, профилактический БАД (пре- или пробиотик), превентивно-профилактический или лечебно-реабилитационный протокол. А ТраМед как инновационному оператору отрасли будет принадлежать ведущая роль в развитии высокотехнологичных секторов практического здравоохранения, фарма- и нутрицевтики и биоиндустрии в целом на протяжении ближайших десятилетий.

Таким образом, мы находимся на грани глобальных перемен. А реализация целей и задач ППМ обеспечит со временем переход от системы, ориентированной на лечение заболевания, к системе управления здоровьем собственным, которое следует отнести к составляющей безопасности национальной и Большой Евразии в целом, незамедлительно обеспечивая государственными и межгосударственными гарантиями.

И главной задачей аудитории становится координация национальной и международной деятельности, ориентируемой на проведение глобальной реформы высшего образования, целью которой является продуманное и поэтапное внедрение в практику адаптированной к национальным стандартам ресурсной базы ТраМед как новой модели реализации биодизайнерских проектов, перевооружение которой кадровым потенциалом и технологическими платформами принципиально новой генерации гарантируется едиными усилиями трансдисциплинарной межуниверситетской микросреды.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования с участием человека или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гнедых Н.Н.* Роль стратегических карт в управлении человеческими ресурсами современного предприятия // Управление человеческими ресурсами – основа развития инновационной экономики. 2010. № 2. С. 226–230.
- Лебедев А.Н., Ковешников А.И.* Концепция формирования общего экологического каркаса на территориях Орловской, Брянской и Калужской областей. http://science-bsea.bgita.ru/2008/les_2008/lebedev_konceptcia.htm
- Хуррамов И.А.* Проблемы экологического образования и воспитания на примере мирового сообщества // Молодой ученый. 2012. № 11. С. 493–496.
- Athanasios A., Charalampos V., Vasileios T., Ashraf G.M.* Protein-protein interaction (PPI) network: recent advances in drug discovery // *Curr. Drug Metab.* 2017. V. 18 (1). P. 5–10. <https://doi.org/10.2174/138920021801170119204832>
- Bano R., Gupta S., Shekhar C.* Translational research in biomedical sciences in India: Challenges, observations and national perspectives // *Indian J. Med. Res.* 2020. V. 152 (4). P. 335–341.
- Bebek G.* Identifying gene interaction networks // *Meth. Mol. Biol.* 2012. V. 850. P. 483–494. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-555-8_26
- Bludau I., Aebersold R.* Proteomic and interactomic insights into the molecular basis of cell functional diversity // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020. V. 21 (6). P. 327–340. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0231-2>
- Chaudhary N., Kumar V., Sangwan P. et al.* Personalized nutrition and -omics // *Comp. Foodomics.* 2020. P. 495–507. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22880-1>
- Chen S.J., Lia D.L., Chen C.H. et al.* Construction and analysis of protein-protein interaction network of heroin use disorder // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 4980. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41552-z>
- Choi R.Y., Coyner A.S., Kalpathy-Cramer J. et al.* Introduction to machine learning, neural networks, and deep learning // *Transl. Vis. Sci. Technol.* 2020. V. 9 (2). P. 14. <https://doi.org/10.1167/tvst.9.2.14>
- Conte F., Fison G., Licursi V. et al.* A paradigm shift in medicine: A comprehensive review of network-based approaches // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2020. V. 1863 (6). P. 194416. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.194416>
- Costanzo M., Vandersluis B., Koch E.N. et al.* A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function // *Science.* 2016. V. 353 (6306). <https://doi.org/10.1126/science.aaf1420>
- Cui T., El Mekkaoui K., Reinval J. et al.* Gene-gene interaction detection with deep learning // *Comm. Biol.* 2022. V. 5 (1238). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04186-y>

- Cusick M.E., Klitgord N., Vidal M., Hill D.E.* Interactome: gateway into systems biology // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14 (2). P. R171–R181.
- Di Renzo L., Gualtieri P., Romano L. et al.* Role of personalized nutrition in chronic-degenerative diseases // *Nutrients.* 2019. V. 11 (8). P. 1707. <https://doi.org/10.3390/nu11081707>
- Fang Z., Chen L.* Personalized prediction of human diseases with single-sample dynamic network biomarkers // *Biomark. Med.* 2020. V. 14 (8). P. 615–620. <https://doi.org/10.2217/bmm-2020-0066>
- Ferguson L.R., De Caterina R., Görman U. et al.* Guide and position of the international society of nutrigenetics/nutrigenomics on personalised nutrition: Part 1 – fields of precision nutrition // *J. Nutr. Nutrigenom.* 2016. V. 9 (1). P. 12–27. <https://doi.org/10.1159/000445350>
- Fernandez M.A., Raine K.D.* Digital food retail: public health opportunities // *Nutrients.* 2021. V. 13 (11). P. 3789. <https://doi.org/10.3390/nu13113789>
- Fu B.* Preface for special issue, ecotechnologies for controlling non-point source pollution and protecting aquatic ecosystem (ENPE-2017) // *Sci. Tot. Environ.* 2018. V. 618. P. 1032. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.085>
- Ghadie M.A., Coulombe-Huntington J., Xia Y.* Interactome evolution: insights from genome-wide analyses of protein-protein interactions // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2018. V. 50. P. 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.10.012>
- Goh K.I., Cusick M.E., Valle D. et al.* The human disease network // *PNAS USA.* 2007. V. 104 (21). P. 8685–8690.
- Huttlin E.L., Bruckner R.J., Paulo J.A. et al.* Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks // *Nature.* 2017. V. 545 (7655). P. 505–509.
- Jiang T., Gradus J.L., Rosellini A.J.* Supervised machine learning: a brief primer // *Behav. Ther.* 2020. V. 51 (5). P. 675–687. <https://doi.org/10.1016/j.beth.2020.05.002>
- Kaiser R.H., Chase H.W., Phillips M.L. et al.* Dynamic resting-state network biomarkers of antidepressant treatment response // *Biol. Psychiatry.* 2022. V. 92 (7). P. 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2022.03.020>
- Karimizadeh E., Sharifi-Zarchi A., Nikaein H. et al.* Analysis of gene expression profiles and protein-protein interaction networks in multiple tissues of systemic sclerosis // *BMC Med. Genom.* 2019. V. 12. P. 199. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0632-2>
- Lage K.* Protein-protein interactions and genetic diseases: The interactome // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1842 (10). P. 1971–1980.
- Lin J.S., Lai E.M.* Protein-protein interactions: yeast two-hybrid system // *Bacterial protein secretion systems* / Eds L. Journet, E. Cascales. N.Y.: Humana Press, 2017. V. 1615. P. 177–187. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9_14
- Marcum J.A.* Nutrigenetics/nutrigenomics, personalized nutrition, and precision healthcare // *Curr. Nutr. Rep.* 2020. V. 9 (4). P. 338–345. <https://doi.org/10.1007/s13668-020-00327-z>
- Matthews D.E., Norman K.* Editorial: Biomarkers in nutritional research // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2021. V. 24 (5). P. 393–394. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000769>
- Osada J.* Nutrition genomics // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24 (7). P. 6490. <https://doi.org/10.3390/ijms24076490>
- Plewczyński D., Ginalski K.* The interactome: predicting the protein-protein interactions in cells // *Cell Mol. Biol. Lett.* 2009. V. 14 (1). P. 1–22.
- Przytycka T.M., Singh M., Slonim D.K.* Toward the dynamic interactome: it's about time // *Brief Bioinform.* 2010. V. 11 (1). P. 15–29.
- Safari-Alighiarloo N., Taghizadeh M., Rezaei-Tavirani M. et al.* Protein-protein interaction networks (PPI) and complex diseases // *Gastroenterol. Hepatol. Bed. Bench.* 2014. V. 7 (1). P. 17–31.
- Silverbush D., Sharan R.* A systematic approach to orient the human protein-protein interaction network // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 3015. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10887-6>
- Suchkov S.V.* Personalized and precision medicine as a new model of the healthcare services // *V Russ. Congress of laboratory medicine, September 12, 2019.*
- Taguchi Y.H.* Bioinformatic tools for epitranscriptomics // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2023. V. 324 (2). P. C447–C457. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00437.2022>
- Taylor I.W., Linding R., Warde-Farley D. et al.* Dynamic modularity in protein interaction networks predicts breast cancer outcome // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27 (2). P. 199–204.
- Tenenbaum J.D.* Translational bioinformatics: past, present, and future // *Genom. Proteom. Bioinform.* 2016. V. 14 (1). P. 31–41.
- Vidal M., Cusick M.E., Barabasi A.L.* Interactome networks and human disease // *Cell.* 2011. V. 144 (6). P. 986–998.
- Vimalaswaran K.S., Le Roy C.I., Claus S.P.* Foodomics for personalized nutrition: how far are we? // *Curr. Opin. Food Sci.* 2015. V. 4. P. 129–135.
- Voevodin D.A., Rozanova G.N., Poddubikov A.V., Mikhailova N.A.* Microbiocenosis, immune system and heredity // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2017. V. (2). P. 116–126.
- Ung M.H., Liu C.C., Cheng C.* Integrative analysis of cancer genes in a functional interactome // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 29228.
- Wiredja D., Bebek G.* Identifying gene interaction networks // *Meth. Mol. Biol.* 2017. V. 1666. P. 539–556. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7274-6_27

Human Health, Environmental Comfort and Well-Being. Part 2. Ecological Comfort as a New and Strategic Factor in the Protection of Modern Human Health

**S. V. Suchkov^{a, b, g, p}, H. Abe^c, S. Murphy^{d, e}, D. Smith^f, V. S. Polyakova^{p, *}, D. Scherman^{h, i, j},
A. P. Glinushkin^k, P. Barach^l, A. O. Terent'ev^k, M. Tan^o, A. N. Suvorov^{m, n}**

^a*Russian Academy of Natural Sciences, Moscow, Russia*

^b*Russian University of Medicine, Department of Clinical Allergology and Immunology, Moscow, Russia*

^c*Abe Cancer Clinic, Tokyo, Japan*

^d*Massachusetts General Hospital (MGH), Boston, MA, USA*

^e*Harvard Medical School, Boston, MA, USA*

^f*Mayo Clinic, Rochester, MN, USA*

^g*New York Academy of Sciences, USA*

^h*European Academy of Sciences, Liège, Belgium*

ⁱ*National Center for Scientific Research (CNRS), Paris, France*

^j*Paris Descartes University, Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique d'Imagerie, Paris, France*

^k*Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^l*Wayne State University, School of Medicine, Detroit, MI, USA*

^m*Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

ⁿ*St. Petersburg State University, Department of Microbiology, St. Petersburg, Russia*

^o*NAKADA Geriatric Health and Welfare Facilities, Nakada Tome Miyagi, Japan*

^p*University of World Politics and Law, Moscow, Russia*

*e-mail: med_nika2000@mail.ru

Since the dawn of humanity, human beings have inherently sought a state of security, trying to make their existence as comfortable as possible. Accordingly, among the many factors affecting human health, comfort and well-being, the quality of the micro-environment and ecology, as well as the health care system and health-saving resources, are important. In this regard, environmental security, with its systemic nature, brings a significant contribution to the PPM model by optimizing the state of balance in the interrelationship of natural, anthropogenic, physiological and social processes. Accordingly, individualized nutrition and pharmacointervention for preventive and prophylactic purposes, being important tools for health preservation, represent an integrative approach aimed at understanding the interaction between nutrition and the environment within the formed or formed lifestyle. This review will consider the main components of human health protection, as well as their impact on the preservation of ecobiocenosis stability.

Keywords: personalized and precision medicine, translational development, nutritional science, biodesign, bioinformatics, biotechnology, genetics

УДК 639.1.03.111.6

РАССЕЛЕНИЕ И АККЛИМАТИЗАЦИЯ ПЯТНИСТОГО ОЛЕНЯ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

© 2024 г. А. П. Каледин^{1, *}, Д. В. Жуков², С. В. Бекетов³, В. И. Фертиков²,
А. В. Смуров⁴, В. М. Макеева⁴

¹Российский государственный аграрный университет –
Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева, Москва, Россия

²Государственный комплекс “Завидово” Федеральной службы охраны Российской Федерации,
Тверская обл., Конаковский район, пгт. Козлово, Россия

³Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

⁴Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: kaledinap@rambler.ru

Поступила в редакцию 12.02.2024 г.

После доработки 12.02.2024 г.

Принята к публикации 13.02.2024 г.

В статье рассматриваются вопросы сохранения, распространения и акклиматизации пятнистого оленя на территории Российской Федерации в целом, и в частности в Центральном федеральном округе и в национальном парке Государственного комплекса “Завидово”. Подробно анализируется состояние первичного ареала пятнистого оленя в Приморском крае, а также история расселения и динамики численности его поголовья в Российской Федерации. По отдельным областям Центрального федерального округа приводятся результаты кадастровой оценки ресурсов пятнистого оленя, включая среднюю многолетнюю численность, среднюю многолетнюю плотность населения (гол.) на 1000 га свойственных угодий и среднюю многолетнюю стоимость ресурсов (млн руб.). В качестве эффективной модели акклиматизации пятнистого оленя приведен опыт его хозяйственного использования в Государственном комплексе “Завидово” (Тверская обл.).

Ключевые слова: пятнистый олень, первичный ареал, расселение, акклиматизация, численность поголовья, кадастровая оценка, биопродуктивность, биотехнические мероприятия

DOI: 10.31857/S0042132424030054, EDN: PRTGTC

ВВЕДЕНИЕ

Впервые пятнистый олень *Cervus nippon* был охарактеризован голландским зоологом Конрадом Якобом Темминком в 1838 г. в ходе работы над многотомным изданием “Животный мир Японии” (цит. по: Жуков, 2022).

Всего, по разным оценкам, у пятнистого оленя насчитывается от 14 до более чем трех десятков подвидов (Государственный доклад ..., 2017, 2021; Алазнели и др., 2018). По официальным данным Министерства природных ресурсов РФ на территории России обитает только один подвид – уссурийский пятнистый олень *Cervus nippon hortulorum* (Swinhoe, 1864), он же маньчжурский или пятнистый олень Дыбовского (*Cervus nippon mantchuricus* или *dybowskii*) (*Cervus nippon* ..., 2024). Первооткрывателем этого подвида является Роберт Суинхо, получивший до-

ступ к изучению ранее закрытых для иностранцев областей Китая. По его данным уссурийский пятнистый олень обитал севернее реки Хуанхэ (цит. по: Жуков, 2022).

ОПИСАНИЕ, ОБРАЗ ЖИЗНИ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ ПЯТНИСТОГО ОЛЕНЯ

С учетом большого числа подвидов для пятнистого оленя характерен большой разброс роста в холке – 75–120 см, длины – 145–190 см и массы тела – 70–160 кг (Кабельчук, Лысенко, 2013; Государственный доклад ..., 2017, 2019, 2020; Алазнели и др., 2018). При этом самым крупным подвидом считается именно уссурийский пятнистый олень (Кабельчук, Лысенко, 2013; Об утверждении Плана ..., 2014).

У пятнистого оленя небольшой, но длинный хвост, уши крупные и заостренные, носовое зеркало большое, радужная оболочка глаз коричневого цвета с горизонтальным прямоугольным зрачком (Чегорка, 1989; Государственный доклад ..., 2019).

Самцы значительно крупнее самок, носят небольшие рога, которые слабо ветвятся. Обычно олени имеют 2–3 отростка на рогах, включая один надглазничный. Реже на рогах встречаются четыре отростка, в единичных случаях – пять и даже шесть (Государственный доклад ..., 2019). След похож на таковой у благородного оленя, но отличается меньшими размерами (Об утверждении Плана ..., 2014; Государственный доклад ..., 2020).

Волосной покров грубый и ломкий, его окраска в летний период рыжевато-коричневая разных оттенков, темнее в области шеи, светлее на брюхе и боках, вдоль хребта проходит ярко выраженная темно-бурая или черная полоса. Внутренняя часть бедра, брюшная и паховая области и околостовое зеркало – белоснежные. Бока оленей испещрены характерными пятнами, напоминающими своей четкой формой лепестки цветов. Для сеголетков характерно семь или восемь рядов пятен (Государственный доклад ..., 2017, 2019).

В зимний период пятнистый олень приобретает бурую и серовато-темную окраску, пятна почти не проявляются. Самцы в отличие от самок более темные, на расстоянии выглядят угольно-черными, с густой гривой волос на шее (Кабельчук, Лысенко, 2013; Государственный доклад ..., 2019, 2021).

Пятнистые олени держатся небольшими стадами по 7–10 гол., но встречаются и более крупные табуны. Например, в условиях парковых хозяйств они содержатся в количестве сотен и даже тысяч голов (Алазнели и др., 2018; Государственный доклад ..., 2021). Стада пятнистых оленей смешанные и состоят по преимуществу из самок с некоторым количеством молодых телят и нескольких самцов, с хорошо различимой доминирующей особью (Государственный доклад ..., 2017, 2019).

Зимой стада пятнистых оленей группируются вблизи лесных чаш, обычно по южным каменистым склонам гор с густыми кустарниками и в низменностях (Гуренко, Семашко, 2003). Подобное размещение помогает им защититься от холода, к тому же на склонах снежный покров менее глубокий, что облегчает выпас. К весне

олени спускаются с возвышенностей на открытую местность, где ищут свежую траву (Сидоров, 1980; Гуренко, Семашко, 2003). После отела самки бродят днем в густых зарослях кустарника, к вечеру выходят на открытые места. Летом держатся у водоемов, если есть возможность, выходят к берегу моря (Богачев и др., 1982). Осенью пасутся на полянах (Сидоров, 1980).

Самки пятнистого оленя становятся половозрелыми в возрасте 1.5 лет. Участвовать в гоне они начинают на третьем, иногда на втором году жизни, самцы обычно с трех лет (Присяжнюк, 1997; Фокин, Айрапетьян, 2004).

Брачный сезон пятнистых оленей продолжается в среднем с сентября до ноября, пик гона приходится на середину октября и длится 3–8 дней (Тихонов, 1983). Гон проходит тихо, сражения между самцами почти не возникают, но в пантовых хозяйствах часто происходят жестокие драки, что связано с нарушенным соотношением полов и с отличными от природных условиями обитания (Эрнст и др., 1994; Волошина, 1997; Каледин и др., 2011). Быки пятнистых оленей обычно собирают гаремы из 3–5 самок, в хозяйствах количество самок в гареме отдельного самца может достигать до 6–20 особей (Волошина, 1997; Эрнст и др., 1994). Течка у самок длится около семи дней (Фокин, Айрапетьян, 2004).

Стон пятнистого оленя во время гона имеет свои особенности – он отличается мощными свистящими звуками, переходящими в хриплый рев (Каледин и др., 2011; Koichi et al., 2010). Во время гона самцы выбивают копытами площадки размером около 4 м². Из-за недостаточного питания в период гона самцы могут терять до 25% массы тела (Волошина, 1997), после окончания гона они объединяются в табуны холостяков и оставляют самок (Кабельчук и др., 2013).

Беременность у самок пятнистого оленя составляет 7–7.5 мес. Отел происходит массово и в природных популяциях приходится на середину мая. У самок акклиматизированных популяций отел начинается в июне–июле, иногда в августе (Köller, 1990; Agetsuma et al., 2003).

Самки на период отела и первых недель лактации отделяются от группы, к которой возвращаются после того, как оленята достаточно окрепнут. В период выкармливания сеголетков самки в стаде держатся отдельно от самцов. Молодые самцы во время роста рогов держатся поодиночке. Рога растут в период с апреля по июнь, их сброс происходит в марте–апреле, а к началу

июня у молодых оленей обычно уже есть по паре небольших отростков (Государственный доклад ..., 2017, 2021; Алазнели и др., 2018).

Самки приносят одного—двух телят, в редких случаях трех (Храмцов, 1980). Выкармливание молоком длится около пяти месяцев, но уже на 10—20 день жизни сеголетки способны самостоятельно пастись. Телята остаются с матерью до следующей весны, иногда дольше (Алазнели, Каледин, 2017б).

Во главе группировки матерей с детенышами встает одна из самок, которая во время опасности предупреждает остальных оленей резким, низким свистом (Об утверждении Плана ..., 2014; Государственный доклад ..., 2017, 2020). Пятнистые олени пугливы и, заметив опасность, уходят крупными прыжками (Государственный доклад ..., 2019, 2020). Поднимающиеся при этом в районе хвоста белые волосы визуально увеличивают в размерах околехвостовое зеркало, что, как считается, помогает бегущим оленям, и в особенности молодым, не терять друг друга из вида (Об утверждении Плана ..., 2014; Государственный доклад ..., 2017, 2020). По современным представлениям околехвостовое зеркало используется также для ориентирования телят, следующих за белым пятном матери (Государственный доклад ..., 2020).

В возрасте около 10—12 мес. у самцов в местах роста рогов появляются выросты высотой до 4 см. Первые неразветвленные рога отрастают в апреле и опадают в мае—июне следующего года. Следующие рога уже ветвистые и сбрасываются ежегодно в апреле. Очищаются рога от кожи примерно в августе—сентябре (Волошина, 1997). Молодые самцы во время роста рогов держатся поодиночке (Государственный доклад ..., 2017, 2021; Алазнели и др., 2018).

Акклиматизированные особи сбрасывают и отрастают новые рога позже, иногда на один—два месяца (Каледин, 2014; Agetsuma et al., 2003).

Продолжительность жизни пятнистого оленя в дикой природе составляет в среднем не более 10—15 лет, но в неволе, например в пантовых хозяйствах, может достигать 17—20, а в некоторых случаях и до 25 лет, при этом у самок старше пятнадцатилетнего возраста еще может появиться потомство (Волошина, 1997).

Пятнистые олени способны успешно преодолевать водные преграды, существует мнение, что их ареал расширился благодаря способности переплывать проливы шириной более 10 км (Кале-

дин и др., 2011; Алазнели, Каледин, 2016а, 2017а).

Несмотря на приспособляемость к широкому диапазону условий для пятнистого оленя критичным лимитирующим фактором является глубина снежного покрова. При его величине более 15 см возникают существенные трудности выпаса, а 20—30 см снега будут уже пограничным уровнем для выживания популяции. Кроме глубины снежного покрова, перекрывающего доступ к пище, еще одним фактором выживания в зимний период является снежный наст, который может серьезно повреждать ноги пятнистых оленей. В целом продолжительность зимы оказывает существенное влияние на численность популяции (Чегорка, 1986; Эрнст и др., 1994; Алазнели, Каледин, 2016б, 2017а).

Пятнистые олени на своей территории перемещаются определенными маршрутами, вытаптывая тропы, на которых в прошлом промысловые охотники устанавливали разнообразные ловушки, такие как изгороди с ловчими ямами, капканы и т.п.

Дневные часы пятнистые олени проводят в зарослях под прикрытием кустарников и деревьев. На открытые поляны для пастбы они выходят вечером, рано утром или в ночное время (Истребление бродячими собаками ..., 2021), питаются разнообразным растительным кормом, включая более 300 видов растений (Голубева и др., 2021). Прежде всего это представители семейств: розовые (Rosaceae), лютиковые (Ranunculaceae), астровые (Asteraceae), кленовые (Aceraceae), аралиевые (Araliaceae), сельдереевые (Apiaceae), березовые (Betulaceae), яснотковые (Lamiaceae) и сытевые (Cyperaceae). Некоторые исследователи считают, что благодаря разнообразному рациону мясо пятнистых оленей обладает всеми необходимыми питательными веществами, при этом общее содержание жира в нем меньше, чем у других копытных (Каледин, 2010; Маслов 2011; Алазнели, Каледин, 2017б, 2018).

В весенний период основную пищу пятнистых оленей составляют травы: молодые осоки, разнообразные злаки, зонтичные и сложноцветные. Летом добавляются кустарниковые и древесные растения, а одним из необычных и любимых кормов являются листья и побеги винограда (Алазнели, Каледин, 2016б). Осенью пятнистый олень начинает употреблять плоды и семена. Желуди в годы богатого урожая являются почти исключительным осенне-зимним кормом. Зимой основу питания составляет древесный корм. В это время из древесных пород наиболее охотно

пятнистые олени объедают ветви маньчжурского ореха, бархата и аралии, а также активно потребляют кору (Каледин, 2010).

Основным пищевым конкурентом пятнистого оленя является благородный олень со всеми его подвидами. Менее значимы – лось и кабарга. Из других млекопитающих – заяц-беляк, лемминги и водоплавающие птицы. Однако в годы пика численности полевок Миддендорфа и леммингов они могут изымать до 70% годового прироста растительности и их роль как конкурентного вида значительно возрастает (Фокин, Айрапетьян, 2004; Алазнели, Каледин, 2017а, 2018).

Доля влияния хищников на смертность пятнистого оленя составляет 33%. Наибольший урон оленям приносят волки, одичавшие и безнадзорные собаки. При этом избирательная добыча волком больных и ослабленных зверей подтверждается лишь отчасти (Кабельчук и др., 2013; Каледин, 2016). Кроме волков, пятнистых оленей уничтожают такие животные как россомаха, медведь, реже рысь. Возможны нападения на телят хищных птиц: например беркута, орлана-белохвоста и ворона (Кабельчук и др., 2013; Алазнели, Каледин, 2018).

Что касается болезней, то у пятнистых оленей зарегистрированы случаи заболевания сибирской язвой, бруцеллезом, некробактериозом, колибактериозом, бешенством, туберкулезом,

бронхопневмонией, саркаптозом (чесоткой), ящуром, эмфизематозным карбункулом, лептоспирозом, гемморагической септициемией (пастереллезом) (Хахин, Присяжнюк, 1985). Встречаются различные болезни, вызываемые простейшими и паразитическими грибами, такими как кокцидиоз и стригущий лишай. Из гельминтозов чаще всего отмечают дикроилюоз. На диких пятнистых оленях могут паразитировать клещи (*Dermocentor*, *Ixodes* и др.), мошки (*Simulium maculatum*), мокрецы, слепни, кровососки (*Lipoptena cervi*), власоседы, носоглоточный овод и другие эктопаразиты. Однако среди диких оленей эпизоотии никогда не достигают таких размеров, как у животных в пантовых хозяйствах, что обусловлено их скученностью (Эрнст и др., 1994).

Важно отметить, что современный ареал пятнистого оленя считается вторичным (Петрашов, 1980; Кабельчук, Лысенко, 2013). Изначально он занимал единую обширную область, включающую Китай, Японию, Корею, Приморский край, Хабаровский край и другие территории, но в связи с урбанизацией местообитаний оказался раздробленным (Чегорка, 1989; Кабельчук, Лысенко, 2013; Каледин, Мерзленко, 2014; Valerius, 1998) (рис. 1). В настоящее время почти не осталось нативных популяций пятнистого оленя в Китае и Корее, а самая крупная природная популяция этого региона находится в При-

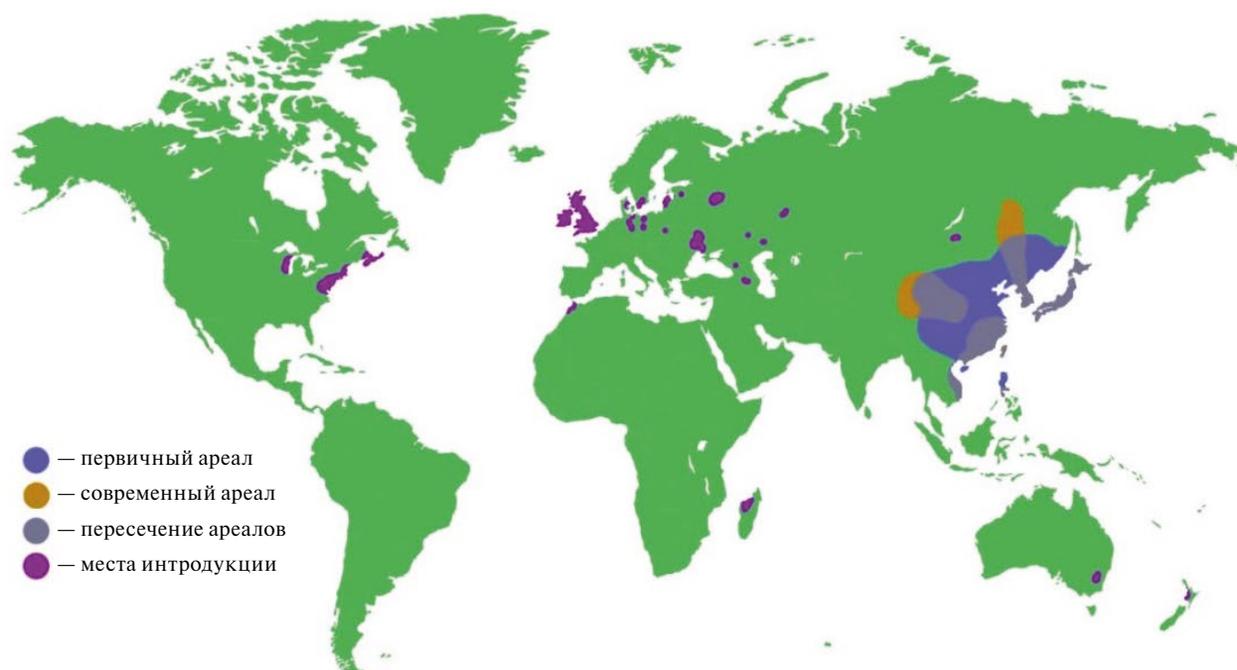


Рис. 1. Ареал пятнистого оленя в прошлом и в настоящее время.

морском крае (Кабельчук, Лысенко, 2013; Каледин, Мерзленко, 2014; Valerius, 1998).

Из-за угрозы исчезновения в конце XIX в. многие государства начали работы по расселению, интродукции и реинтродукции пятнистого оленя (Гуренко, Семашко, 2003; Каледин и др., 2009). Уже в начальный период массовой интродукции было установлено, что при обеспечении необходимых биотехнических мероприятий пятнистый олень успешно приспосабливается к новым условиям обитания (см. рис. 1) (Чегорка, 1986). В результате в разных странах разных континентов сформировались постоянные популяции, при этом пятнистые олени зачастую образовывали гибриды с местными видами оленей (Данилкин, 1999).

Чаще всего в природе пятнистый олень скрещивается с маралом, изюбром, аксисом (Арамилов, 2009; Государственный доклад ..., 2021; Kurt, 1990; Asher et al., 1999). Как правило, гибридные формы оленей имеют смешанные признаки обоих видов. Например, помеси пятнистого и благородного оленей меньше по размеру благородных оленей и больше пятнистых, а на туловище у них присутствуют пятна рыжеватого цвета (Сойнова, 2005; Маслов, 2011). Ранее подобные помеси ошибочно считали самостоятельным видом пятнистого оленя, но исследования их ДНК опровергли эти предположения (Asher et al., 1999).

Как уже отмечалось выше, естественный первичный ареал пятнистого оленя в Российской Федерации расположен в Приморском крае (Абрамов, 1963). До середины XIX в. пятнистый олень заселял здесь все дубово-широколиственные и кедрово-широколиственные леса в долинах рек и на прилегающих к ним склонах небольших гор (Присяжнюк, 1997; Фокин, Айрапетьян, 2004), включая ближайшие острова в заливе Петра Великого, на которые животные перебирались по льду или вплавь. После многоснежных зим 1877–1878 гг. и 1891–1892 гг. и в результате бесконтрольной охоты поголовье пятнистого оленя в Приморском крае значительно сократилось (Присяжнюк, 1981) и долгое время не превышало 1.5 тыс. особей (цит. по: Жуков, 2022).

Еще в 1970-х гг. пятнистые олени встречались лишь в Лазовском районе, на побережье Ольгинского района и в восточной части Партизанского района. Однако в начале 1980-х гг., в связи с улучшением мер охраны и с наступлением более благоприятной зимней климатической обстановки, численность приморской популяции пятнистого оленя начала расти, а область обитания популяции расширилась почти до исходно-

го первичного состояния ареала (Байдавлетов, 1980).

С 2008 г. численность популяции в Приморском крае превысила 4 тыс. гол., что позволило исключить этот подвид пятнистого оленя из Красной книги Приморского края (Красная книга Хабаровского ..., 2008). В настоящее время популяция пятнистого оленя находится здесь вне опасности исчезновения и продолжает стабильно расти.

РАССЕЛЕНИЕ ПЯТНИСТЫХ ОЛЕНЕЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

В начале XX в. началось активное расселение пятнистых оленей вне их природного ареала (рис. 2) (Фокин, Айрапетьян, 2004; Каледин, 2014). За период с 1933 по 1991 г. в рамках работ по интродукции и сохранению вида в Российской Федерации было выпущено свыше 4 тыс. пятнистых оленей (Маковкин, 1999; Agetsuma et al., 2003). Основные выпуски производились в охотничьих хозяйствах, парках и заповедниках европейской части России. Параллельно развивалось полувольное (вольерное) содержание и разведение пятнистых оленей.

Несмотря на наличие крупной популяции в Приморском крае, одомашнивать пятнистых оленей начали значительно позднее, чем маралов. Первым их начал разводить Я.С. Поносов в 1781 г. (Гуренко, Семашко, 2003), а самое крупное хозяйство пятнистых оленей было создано М.И. Янковским на п-ве Сидими (позднее переименованном в его честь). До этого на нем водились только дикие олени. В 1908 г. под хозяйство М.И. Янковского выделили участок более чем 2000 га и к 1914 г. в нем имелось уже около 2000 гол. пятнистых оленей (Köller, 1990). Практически в то же время было организовано крупное частное хозяйство на о. Аскольд, а позднее и на других островах Японского моря.

Первая интродукция пятнистых оленей в европейскую часть тогда еще Российской империи была начата в 1909 г., когда в степной заповедник Ф. Фальц-Фейна ("Аскания-Нова") (Таврическая губерния) с Дальнего Востока было завезено несколько животных. В 1926 г. уже в Советской России были произведены выпуски пятнистого оленя вблизи оз. Байкал (цит. по: Жуков, 2022). В 1933 г. пятнистые олени были выпущены на территории Завидовского охотничьего хозяйства (Тверская обл.), а позже, в 1938 г., 240 особей пятнистого оленя из оленесовхозов Приморского края были завезены в заповедники:



Рис. 2. Распространение пятнистого оленя: 1 – места выпуска в пределах бывшего СССР; 2 – первичный ареал (по: Фокин, Айрапетьян, 2004).

Хоперский (Воронежская обл.), Жигулевский (Самарская обл.), Ильменский (Челябинская обл.), Мордовский (республика Мордовия), Тебердинский (Карачаево-Черкесская Республика), Окский (Рязанская обл.) и национальный парк “Бузулукский бор” (Самарская и Оренбургская обл.) (Алазнели, Каледин, 2017б). К 1980 г. пятнистые олени были расселены в 45 охотхозяйствах и организациях охотхозяйственной отрасли на особо охраняемых природных территориях (ООПТ) 25 областей, краев и автономных республик СССР. Общее число расселенных животных составило более 3 тыс. голов. Однако не во всех новых местах интродукция дала положительные результаты (Каледин, 2010, 2014; Алазнели, Каледин, 2017а; Koichi et al., 2010). Распространение пятнистых оленей осложнялось из-за двух главных особенностей этого вида – оседлости и невозможности выживания при глубоком снежном покрове (Маковкин, 1999).

Самыми удачными были выпуски в 1938 г. в Мордовском и Хоперском заповедниках, где в Мордовском заповеднике численность на-

селения пятнистых оленей к середине 1960-х гг. увеличилась с 53 до 300 голов, а в Хоперском – за период с 1972 по 1988 гг. – с 27 до 1800 особей (Фадеев, 1984; Маковкин, 1999).

В свою очередь, успехи интродукции и размножения пятнистых оленей в охотничьих хозяйствах позволили уже с 1976 г. сделать его объектом любительской и спортивной охоты в Российской Федерации с выделением ежегодных квот на добычу. В 1986 г. началась работа по реинтродукции пятнистых оленей в Приморском крае в целях восстановления аборигенной популяции и ее естественного ареала (Филонов, 1993).

Всего же к середине 1980-х гг. общая численность пятнистых оленей достигла 20 тыс. гол., включая 10 тыс. особей в местах интродукции (Алазнели, Каледин, 2016б).

В последующем, только за 23-летний период 1996–2019 гг. прирост поголовья пятнистого оленя составил 20.1 тыс. особей или ≈ 900 гол. ежегодно. В 2019 г. количество пятнистого оленя по всей Российской Федерации возросло до 31.9 тыс. гол.

АККЛИМАТИЗАЦИЯ ПЯТНИСТОГО ОЛЕНЯ В ЦЕНТРАЛЬНОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ РФ

История акклиматизации пятнистого оленя в Центральном федеральном округе (ЦФО) РФ началась вскоре после первых опытов по его интродукции. Всего же за 1933–1991 гг. в ЦФО за более чем 20 этапов выпусков в охотничьи угодья было завезено 3458 пятнистых оленей (рис. 3) (Алазнели, Каледин, 2017б).

Акклиматизация пятнистого оленя в областях ЦФО РФ в целом прошла успешно, крупные популяции сохранились и их численность продолжает расти (Алазнели и др., 2017). Исключение составила только Смоленская обл. В Воронежской обл., несмотря на успешную интродукцию пятнистых оленей, было принято решение на федеральном уровне о его полном изъятии из природы, так как свободноживущие пятнистые олени наносят ущерб лесному хозяйству, интенсивно уничтожая подрост и подлесок.

В целом в ЦФО за последние 17 лет численность пятнистого оленя выросла почти вдвое с 3.7 до 6 тыс. гол., что позволило вести постоянную его добычу без угрозы для выживания (Фертиков, 1999; Кривенко и др., 2007; Кадастр животного мира ..., 2021).

Во многом акклиматизация и сохранение популяций пятнистого оленя в европейской части России стали возможными благодаря работам по обеспечению биотехнических и охранных мероприятий (Улитин, 1999, 2009; Сафонов, 2002). При их отсутствии не было бы возможным выживание пятнистых оленей в зимний период, так как во всех охотничьих угодьях ЦФО регулярно отмечается критическая для пятнистых оленей

глубина снежного покрова, превышающая 30 см (цит. по: Жуков, 2022).

Во многих охотничьих хозяйствах ЦФО имеются вольеры для содержания или передержки пятнистых оленей (Каледин и др., 2018) и воспроизводственные участки или зоны покоя (Дежкин, 1999, 2000).

Иным словами, при достаточном контроле со стороны человека акклиматизированные пятнистые олени могут пережить даже суровые многоснежные зимы и жаркое лето, при этом они держатся близ мест выпуска и не совершают дальних миграций.

Немаловажна и борьба с хищниками. Например, за последние 15 лет неуклонно растет численность волка, также остро стоит проблема с одичавшими и безнадзорными собаками, которые ежегодно уничтожают сотни пятнистых оленей, как на территории заповедников, так и в охотничьих хозяйствах (Whitehead, 1993).

С 1990-х гг. идет активное хозяйственное применение ресурсов пятнистого оленя (рис. 4), практическая значимость которых подтверждается объемами их использования. С ростом численности популяций увеличиваются объемы добычи.

Добыча пятнистого оленя регламентирована и не подвергает опасности существование его популяций. Максимальный лимит по добыче пятнистого оленя был установлен в сезоне 2006–2007 гг. и составил 1600 гол., а самая высокая добыча была зафиксирована в 2018–2019 гг. – 934 головы пятнистого оленя. Лимиты устанавливаются на уровне 5% от послепромысловой численности, а объемы добычи – в объеме 3% от численности поголовья. С учетом того, что

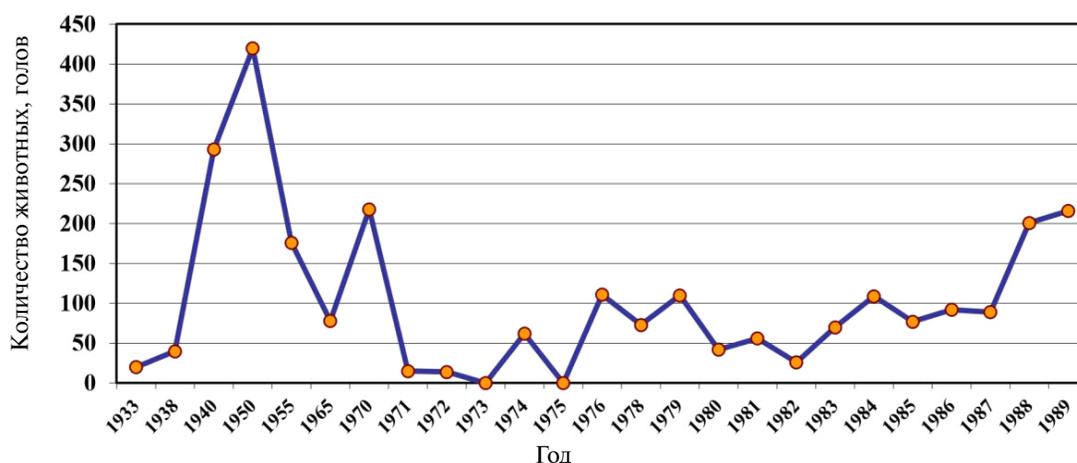


Рис. 3. Выпуски пятнистого оленя в Центральном федеральном округе РФ с 1933 по 1989 г. (по: Алазнели, Каледин, 2016б).

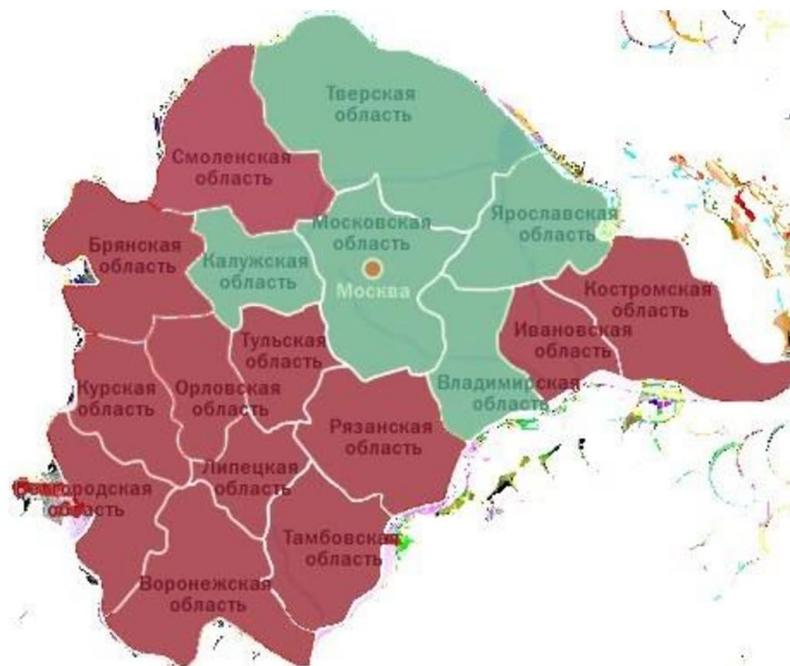


Рис. 4. Хозяйственное использование пятнистого оленя в областях ЦФО. Зеленым цветом отмечены области, где численность оленя стабильна и его ресурсы активно используются; красным – области, в которых оленя нет или его встречи единичны (по: Алазтели и др., 2017).

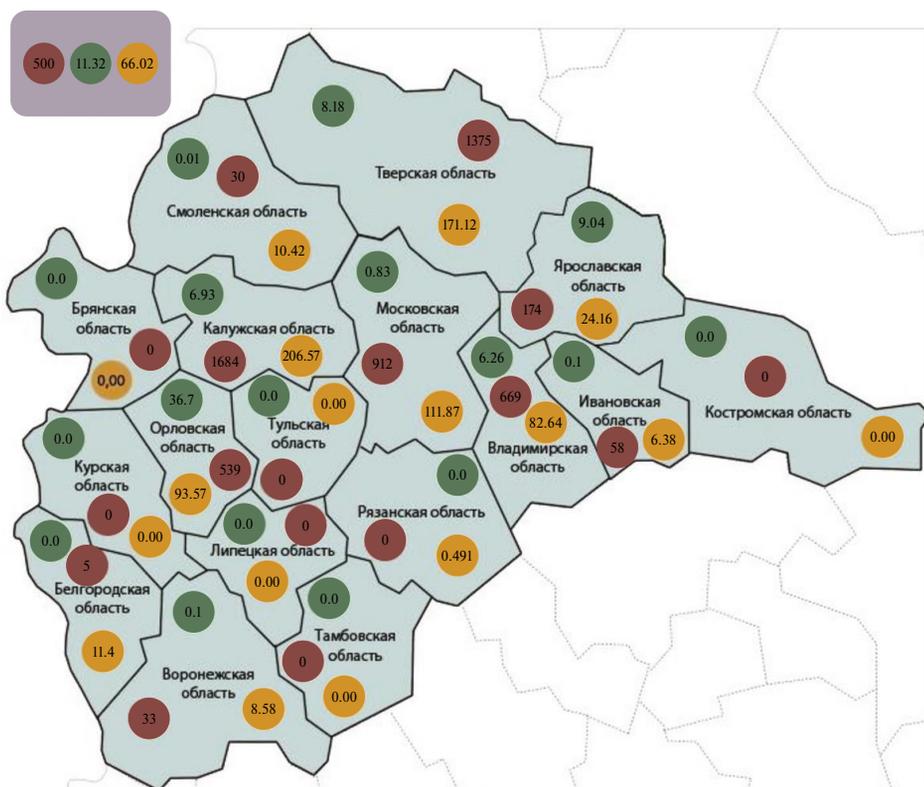


Рис. 5. Кадастровая карта ресурсов пятнистого оленя в Центральном федеральном округе: ● – средняя многолетняя численность ресурсов пятнистого оленя (гол.) (всего в среднем по областям – 5499, в среднем – по 500 голов на одну область); ● – средняя многолетняя плотность населения пятнистого оленя на 1000 га свойственных угодий (гол.) (в среднем по областям – 11.32 голов на 1000 га); ● – средняя многолетняя стоимость ресурсов пятнистого оленя (млн р.) (всего по областям – 726.3, в среднем – 66.02).

квоты определяют для конкретных хозяйств отдельными постановлениями, их реальный объем по хозяйствам находится на уровне 10% от послепромысловой численности местных популяций (цит. по: Жуков, 2022).

Необходимой и неотъемлемой частью процесса мониторинга ресурсов охотничьих животных помимо учета является составление кадастра. Работы по созданию кадастра ресурсов пятнистого оленя в ЦФО РФ проводились в 2018 г. (Алазнели, Каледин, 2016а; Алазнели и др., 2018). Кадастровая карта пятнистых оленей позволяет наглядно оценить их среднегодовалую численность, плотность и стоимость, как в ЦФО в целом, так и по отдельным областям (рис. 5) (Каледин и др., 2016б; Алазнели, Каледин, 2017б).

Согласно представленной карте видно, что доминирующими по ресурсам пятнистого оленя являются Тверская и Московская области ЦФО.

РАССЕЛЕНИЕ И ЧИСЛЕННОСТЬ ПЯТНИСТОГО ОЛЕНЯ В ГОСУДАРСТВЕННОМ КОМПЛЕКСЕ “ЗАВИДОВО” (ТВЕРСКАЯ ОБЛ.)

История расселения пятнистого оленя в Государственном комплексе “Завидово” (ГК “Завидово”) уходит корнями в 1930-е гг., когда были завезены первые животные, затем их выпуски продолжились (рис. 6). За 75 лет с момента первого выпуска охотничьи угодья находились под контролем разных ведомств и только в 2009 г. им придали статус национального парка. С этого момента развернулась большая работа по охране территории и проведению воспроизводственных мероприятий животного мира.

В целом, динамика численности пятнистого оленя в ГК “Завидово” за последние 54 года имела неравномерный характер. Можно видеть (рис. 7), что за период с 1967 г. по 1987 г. наблюдалась тенденция к росту, затем с 1988 по 1989 г. численность снизилась почти в 2 раза, с 1990 по 2002 г. стабилизировалась на среднем уровне в 950 голов и с 2003 по 2017 г. последовательно нарастала. В 2017 г. поголовье пятнистых оленей достигло своего максимума за весь рассматриваемый период и составило 3739 голов (рис. 7), затем произошло его незначительное снижение.

За последние 18 лет средняя многолетняя плотность пятнистого оленя на 1000 га пригодной площади для данного вида составила 29 голов. При этом наибольшую плотность животных отмечали в 2017 г. — 41 гол. на 1000 га собственных угодий для пятнистых оленей, а наименьшую в 2004 г. — 15 гол. на 1000 га (рис. 8).

Добыча пятнистого оленя в ГК “Завидово” велась с учетом его фактической численности, что хорошо видно на объемах его изъятия за период 2011–2020 гг. (рис. 9). При этом наибольшее количество пятнистого оленя было добыто в 2019 г. — 297 гол., что составило 8.7% от общей численности, а наименьшее в 2014 г. — 36 гол., или 1.1%. Соответственно за последние 10 лет изъятие пятнистого оленя в среднем составило 4.2% и не превышало 8.7% от общей численности.

При добыче пятнистых оленей в 2021 г. были проведены исследования, связанные с их экстерьерными особенностями, массой тела, массой мяса, массой внутренних органов (табл. 1). Всего было исследовано 52 особи из них 48 гол. — взрослые особи и 4 гол. — сеголетки. Возрастной

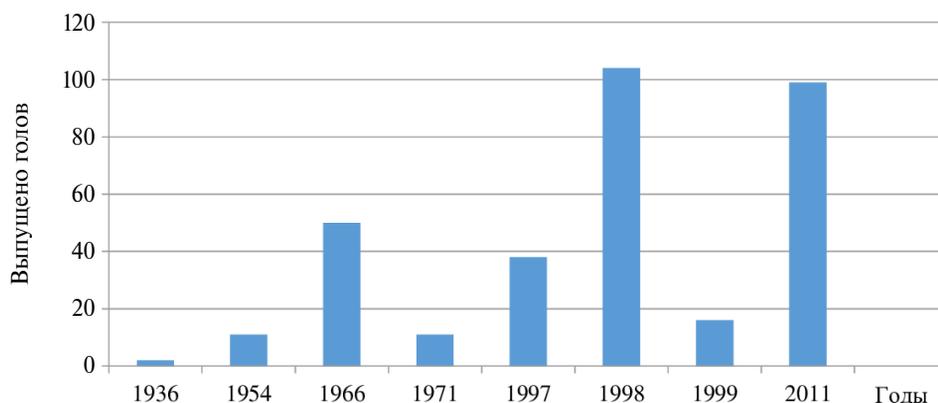


Рис. 6. Выпуск пятнистого оленя в ГК “Завидово” с 1936 по 2011 г.

Численность, голов

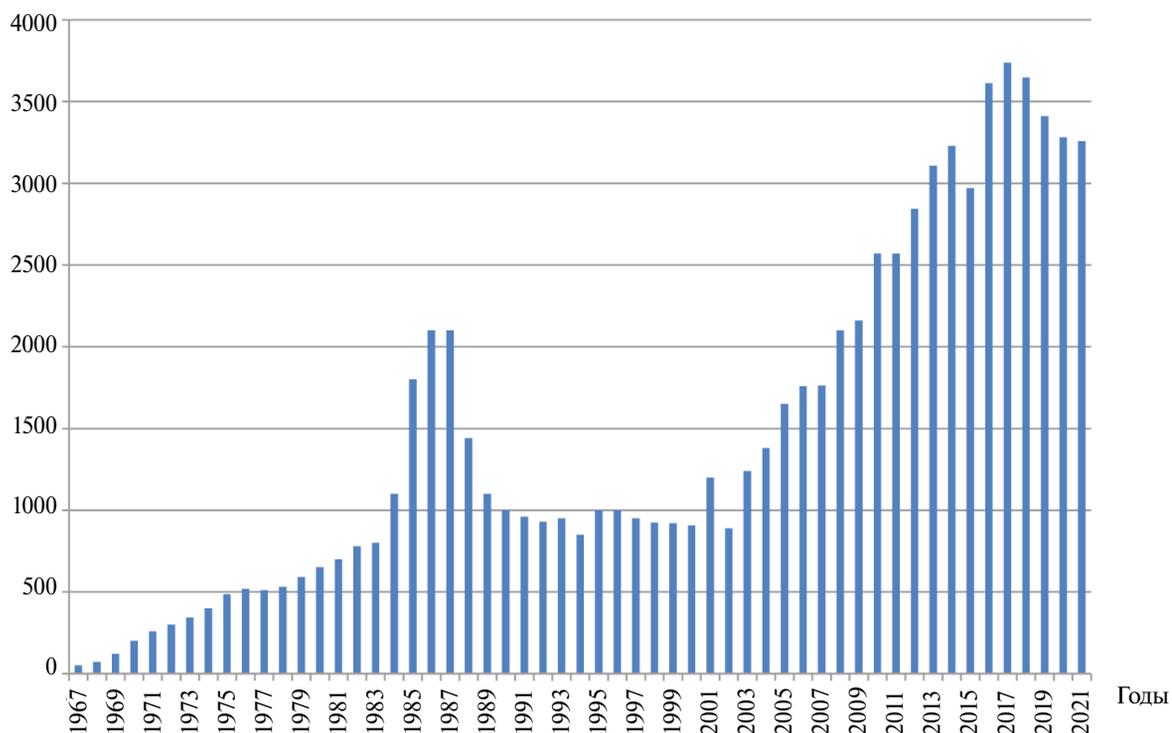


Рис. 7. Динамика численности пятнистого оленя в ГК “Завидово” 1967–2021 гг.

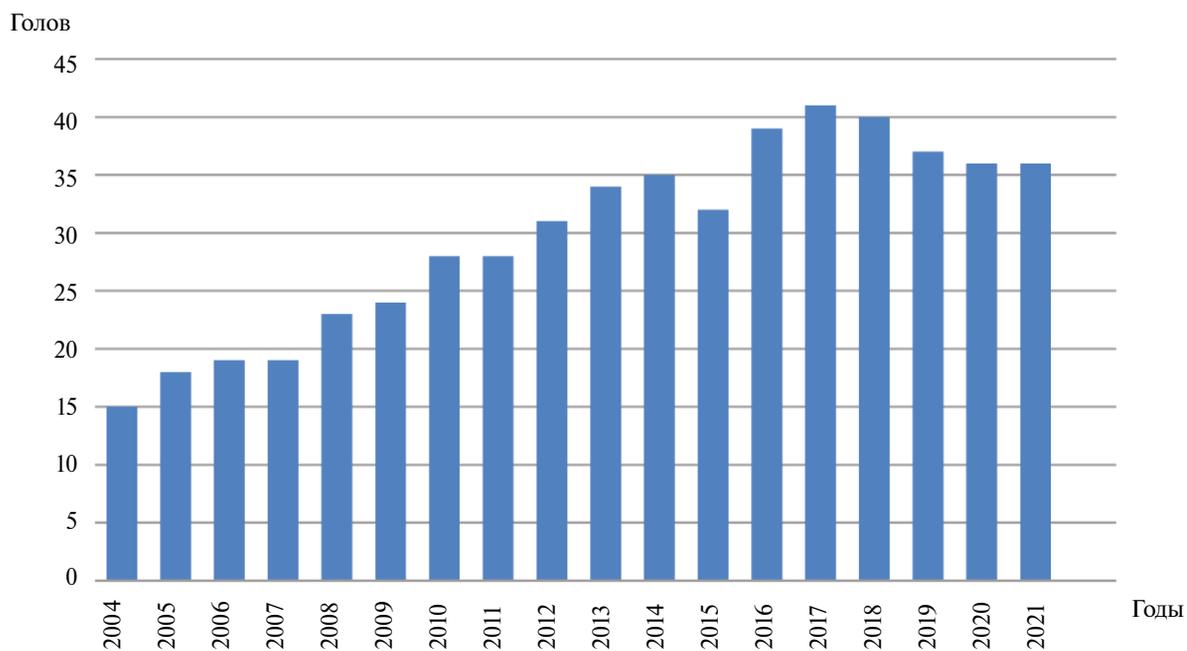


Рис. 8. Плотность населения пятнистого оленя на 1000 га свойственных угодий в ГК “Завидово” 2004–2021 гг.

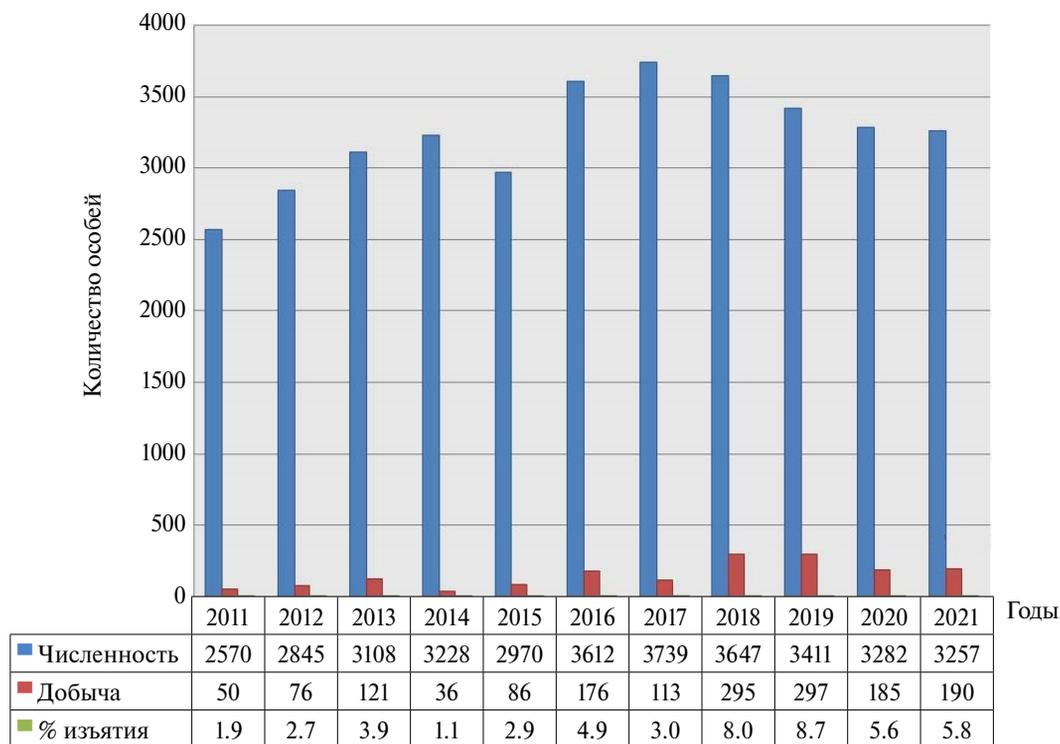


Рис. 9. Динамика численности, добычи и процент изъятия пятнистого оленя в ГК “Завидово” в 2011–2021 гг.

состав животных находился в пределах от 2 до 5 лет. Из самцов было исследовано 10 особей в возрасте 2 лет, 6 особей – 3 лет, 8 особей – 4 лет и 4 особи – 5 лет, из 20 самок – 5 особей в возрасте 2 лет, 13 особей – 3 лет и 2 особи – 4 лет. У 4 северо-летних исследовали по 2 особи каждого пола.

Одним из важных экологических показателей, который служит для оценки эффективности использования охотничьих животных, является биологическая продуктивность охотничьих угодий. Для расчета биопродуктивности использовали показатель среднего веса мяса пятнистого

Таблица 1. Экстерьерные и интерьерные показатели пятнистого оленя в ГК “Завидово”

№ п/п	Пол	Возраст животного, лет	Длина тела, см	Высота в холке, см	Объем груди, см	Масса животного, кг	Масса мяса, кг	Выход мяса от массы животного, %	Масса, кг				
									сердца	печени	легких	левой почки	правой почки
1	Самец	4	170	110	118	103	52.7	51.2	0.75	1.38	1.33	0.13	0.13
2	Самец	4	175	110	116	105	49.4	47.0	0.90	1.26	1.44	0.16	0.15
3	Самка	3	158	99	106	77	38.8	50.4	0.70	0.84	1.04	0.08	0.08
4	Самка	2	166	103	104	72	37.2	51.6	0.65	0.68	0.84	0.08	0.08
5	Самка	2	154	104	93	63	32.3	51.3	0.57	0.61	0.69	0.10	0.11
6	Самец	5	182	119	117	117	58.4	49.9	0.86	1.7	1.32	0.15	0.14
7	Самец	4	169	119	121	107	53	49.5	0.83	1.35	1.22	0.11	0.11
8	Самка	3	144	107	99	70	35.2	50.3	0.63	0.89	0.88	0.06	0.05
9	Самец	3	157	115	113	80.5	41.1	51.1	0.80	1.16	1.11	0.12	0.10

Таблица 1 (продолжение)

№ п/п	Пол	Возраст животного, лет	Длина тела, см	Высота в холке, см	Объем груди, см	Масса животного, кг	Масса мяса, кг	Выход мяса от массы животного, %	Масса, кг				
									сердца	печени	легких	левой почки	правой почки
10	Самка	4	155	104	107	79	40.3	51.0	0.62	0.89	1.03	0.13	0.11
11	Самец	2	143	97	104	66	34.1	51.7	0.48	0.95	1.01	0.07	0.09
12	Самец	4	173	117	118	109	52.2	47.9	0.81	1.36	1.35	0.14	0.14
13	Самец	2	158	107	107	69	35.3	51.2	0.52	1.1	0.98	0.09	0.08
14	Самец	3	164	112	116	83	42.1	50.7	0.71	1.2	1.18	0.11	0.11
15	Самка	3	151	101	104	73	36.4	49.9	0.65	0.92	0.97	0.07	0.08
16	Самец	2	136	94	97	61.5	31.8	51.7	0.45	0.80	1.00	0.06	0.06
17	Самка	До года	128	91	94	41.5	20.5	49.4	0.31	0.51	0.63	0.04	0.04
18	Самка	2	150	95	92	58	31.6	54.5	0.45	0.60	1.09	0.06	0.06
19	Самец	2	144	104	97	68.5	35.9	52.4	0.45	0.89	1.26	0.06	0.06
20	Самец	2	149	103	103	67	34	50.7	0.69	0.90	1.24	0.10	0.08
21	Самец	2	148	102	109	69.5	35.8	51.5	0.55	0.70	1.25	0.08	0.10
22	Самка	До года	133	93	85	45	22	48.9	0.32	0.53	0.68	0.05	0.04
23	Самка	3	157	95	108	79	41.2	52.2	0.69	0.89	1.04	0.07	0.07
24	Самец	3	161	104	109	82	39.6	48.3	0.79	1.2	1.17	0.11	0.11
25	Самец	2	146	104	99	69.5	35.4	50.9	0.67	0.83	1.22	0.09	0.09
26	Самка	3	156	101	104	79	40.5	51.3	0.71	0.82	1.17	0.09	0.08
27	Самец	До года	123	87	88	37	18.5	50.0	0.23	0.42	0.63	0.04	0.04
28	Самка	3	156	103	117	71.5	37.2	52.0	0.63	1.12	1.12	0.10	0.09
29	Самец	3	161	105	105	71	36.2	51.0	0.46	0.98	1.02	0.06	0.06
30	Самка	3	150	104	109	76.5	38.4	52.2	0.59	0.95	1.11	0.08	0.08
31	Самец	2	147	110	109	63	32.1	51.0	0.39	0.82	0.98	0.05	0.05
32	Самка	4	166	105	105	81	39.8	49.1	0.66	1.09	1.06	0.12	0.12
33	Самка	3	149	102	104	70.4	36.1	51.3	0.61	1.07	1.10	0.11	0.10
34	Самец	5	180	127	123	126	62.1	49.3	0.85	1.27	1.38	0.14	0.14
35	Самец	4	165	120	115	101	50.6	50.1	0.81	1.29	1.36	0.12	0.13
36	Самец	До года	129	86	84	40.5	22	54.3	0.26	0.62	0.80	0.04	0.04
37	Самка	3	158	109	104	69.5	32.7	47.1	0.46	0.99	0.95	0.08	0.07
38	Самец	4	163	113	110	90.5	47.5	52.5	0.61	1.28	1.18	0.08	0.07
39	Самец	2	139	104	101	57	29.4	51.6	0.37	0.92	0.82	0.06	0.06
40	Самец	5	182	118	125	126	62.7	49.8	0.81	1.26	1.36	0.13	0.13
41	Самец	3	167	117	112	86	42.6	49.5	0.59	1.18	1.09	0.09	0.09
42	Самка	3	161	105	110	75.5	38.2	50.6	0.61	1.11	1.10	0.10	0.09

Таблица 1 (окончание)

№ п/п	Пол	Возраст животного, лет	Длина тела, см	Высота в холке, см	Объем груди, см	Масса животного, кг	Масса мяса, кг	Выход мяса от массы животного, %	Масса, кг				
									сердца	печени	легких	левой почки	правой почки
43	Самка	3	164	106	109	73.7	37.4	50.7	0.60	1.09	1.10	0.09	0.09
44	Самка	3	156	104	105	72.3	36.8	50.9	0.58	1.04	1.08	0.08	0.09
45	Самка	2	136	91	103	57	31.1	54.6	0.47	0.62	0.96	0.06	0.06
46	Самец	3	166	119	119	73.4	37.2	50.7	0.49	0.98	1.03	0.07	0.06
47	Самка	2	142	102	102	57	29.1	51.1	0.46	0.79	1.09	0.06	0.06
48	Самец	4	169	115	115	107	61.3	57.3	0.80	1.58	1.35	0.11	0.11
49	Самец	2	149	107	104	77	41.3	53.6	0.45	1.22	0.80	0.07	0.07
50	Самец	5	179	130	125	139.5	77	55.2	1.14	2.33	1.89	0.15	0.14
51	Самец	4	178	128	122	106	59	55.7	0.73	1.55	1.24	0.14	0.13
52	Самка	3	157	108	103	70	37.7	53.8	0.51	0.86	0.86	0.08	0.09

оленя и пригодную площадь охотничьих угодий для данного вида (Каледин, Абдулла-Заде, 2011; Каледин и др., 2011).

Средняя масса мяса пятнистого оленя в ГК “Завидово” составила 40 кг. При расчете средней массы использовалась приведенная выше выборка из 52 добытых пятнистых оленей в 2021 г.

По нашим оценкам среди взрослых особей максимальная масса мяса составила 77 кг, у сеголетков – 22 кг, а минимальная, соответственно, – 29 и 18.5 кг.

Наибольшая биопродуктивность охотничьих угодий была в 2017 г. и составила 1.63 кг/га, а наименьшая в 2011 г. – 1.12 кг/га. Что касается

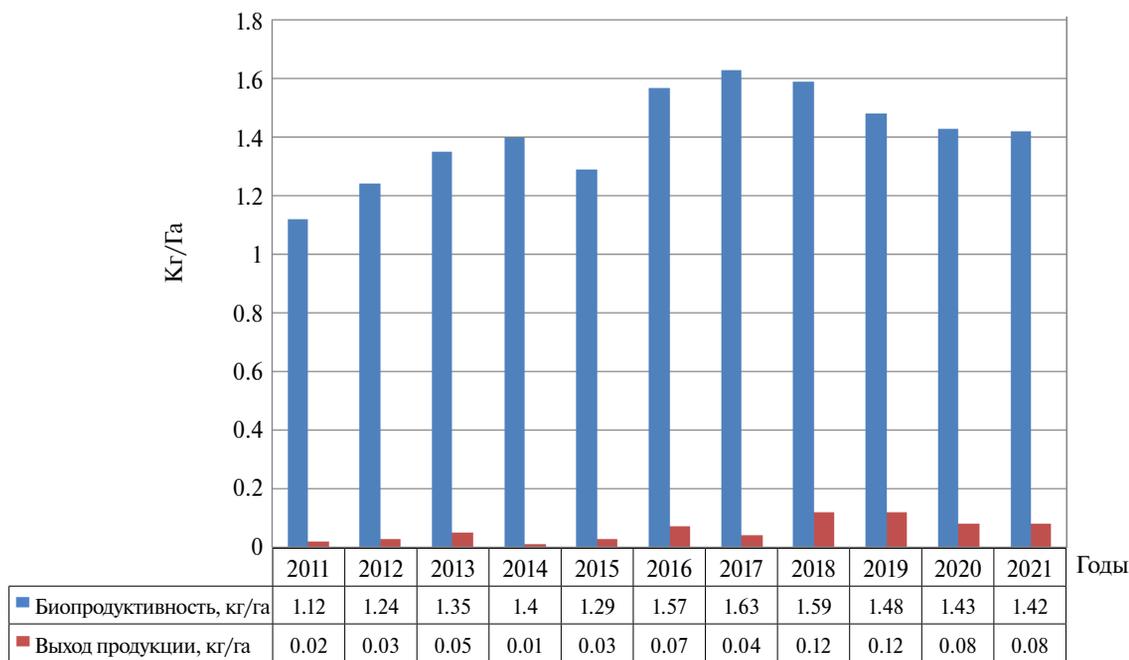


Рис. 10. Биологическая продуктивность охотничьих угодий для пятнистого оленя и выход его продукции в ГК “Завидово” с 2011 по 2021 г.

выхода продукции, то наибольшее ее значение было в 2018–2019 гг. – 0.12 кг/га, а наименьшее в 2014 г. – 0.01 кг/га (см. рис. 4). В среднем биологическая продуктивность охотничьих угодий для пятнистого оленя в ГК “Завидово” была на уровне 1.41 кг/га, а выход его продукции – 0.05 кг/га, что не превышало 3.5% от биопродуктивности охотничьих угодий (рис. 10).

Важной составляющей добычи пятнистого оленя является животолов в целях расселения.

В табл. 2 представлены результаты многолетней работы национального парка по расселению пятнистого оленя из ГК “Завидово” в центральные регионы страны.

Всего с 1985 по 2018 г. в ГК “Завидово” было отловлено для реализации и расселения 781 гол. пятнистого оленя. Больше всего пятнистых оленей было поставлено в Тверскую обл. – 634 гол., Московскую – 67 гол., Рязанскую – 47 гол., Ленинградскую – 30 гол. и Белгородскую – 3 гол.

Таблица 2. Отлов пятнистого оленя в ГК “Завидово” для расселения в центральные регионы России

Год реализации	Количество животных, голов	Кому реализовано	Регион
1985	24	Нет данных (н. д.)	Тверская обл.
1986	14	н. д.	Тверская обл.
1987	60	г. Калинин	Тверская обл.
1988	50	Подольское охотхозяйство	Московская обл.
1988	63	н. д.	Тверская обл.
1989	63	н. д.	Тверская обл.
1990	24	н. д.	Тверская обл.
1991	2	н. д.	Тверская обл.
1992	30	Кимрское охотхозяйство	Тверская обл.
1994	27	Зубцовское охотхозяйство	Тверская обл.
1995	10	Зубцовское охотхозяйство	Тверская обл.
1998	4	Конаковское ДРСУ	Тверская обл.
2003	3	ЗАО “Лисья нора”, Дмитровский район	Московская обл.
2004	3	КО “Завидово”	Тверская обл.
2005	3	ЗАО “Бамстройпуть”	Московская обл.
2006	23	Осташковское РООиР	Тверская обл.
2006	2	“Трансстройинвест”	Московская обл.
2007	4	Николо-Угрешский монастырь	Московская обл.
2007	8	Безбородовское ГООХ	Тверская обл.
2008	18	Охотхозяйство “Медведица”, г. Кашин	Тверская обл.
2009	47	ЗАО “Собор-Агро”	Рязанская обл.
2011	25	ООО “Сезон охоты”, г. Зубцов	Тверская обл.
2011	20	ОАО Агрофирма “Дмитрова гора”	Тверская обл.
2011	7	ООО “Дубки”, г. Ржев	Тверская обл.
2012	8	ФГБУ “Безбородовское ГООХ”	Тверская обл.
2012	10	ООО “Дубки”, г. Ржев	Тверская обл.

Таблица 2 (окончание)

Год реализации	Количество животных, голов	Кому реализовано	Регион
2012	20	ООО “Титов Бор” Ржевский район	Тверская обл.
2013	30	Приозерское общество охотников и рыболовов	Ленинградская обл.
2013	30	ООО “Подсобное хозяйство “Нестерово”	Тверская обл.
2014	50	ОАО Агрофирма “Дмитрова гора”	Тверская обл.
2015	39	ОАО Агрофирма “Дмитрова гора”	Тверская обл.
20015	14	ФГБУ “Безбородовское ГООХ”	Тверская обл.
2016	20	ОАО Агрофирма “Дмитрова гора”	Тверская обл.
2017	4	г. Лотошино	Московская обл.
2018	18	ФГБУ “Безбородовское ГООХ”	Тверская обл.
2018	1	г. Лотошино	Московская обл.
2018	3	ООО “Белая губерния”	Белгородская обл.

Для устойчивой плотности населения пятнистого оленя и поддержания его жизнедеятельности в зимний период в ГК “Завидово” широко применяется подкормка (Мануш, 2009). Улучшение кормовой базы копытных животных имеет не только особое значение для оптимизации процессов их содержания и разведения (Егоров, 1992; Шевцов, Бруснигин, 2014; Харитонов и др., 2015), но и привлекает много других видов животных.

Для подкормки копытных в ГК “Завидово” используют концентрированные (комбикорм, зерно) и грубые корма (сено, сенаж), корнеплоды (Мануш, 2009). Чаще всего на площадках применяют сено, сенаж и зерно кукурузы. Как правило, подкормка проводится в зимнее время, но так как олени охотно посещают поля, засеянные кукурузой, подсолнухом и озимыми, а кабаны — поля со злаками и корнеплодами, для отвлечения животных от потрав сельскохозяйственных культур ее применяют и в летне-осенний период.

Из млекопитающих чаще всего на подкормочных площадках бывают пятнистый олень, марал и косуля. Пятнистые олени являются одним из самых многочисленных видов парноногих в национальном парке. На подкормочные площадки животные выходят различными по численности группами — от единичных особей до стад в несколько сот голов. Посещают они подкормочные площадки с сентября по май включительно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проводимые с конца XIX—начала XX в. в разных странах мира мероприятия по охране, расселению, акклиматизации и одомашниванию пятнистого оленя являются успешным примером сохранения вида, повышения биологического разнообразия охотничьих животных, рекреации паркового хозяйства и эффективного использования биоресурсов.

В Российской Федерации пятнистый олень был расселен на значительной территории в заповедниках, заказниках и охотничьи хозяйствах, где образовал новые очаги обитания. При этом до 40% общего поголовья пятнистых оленей сосредоточено в европейской части страны (Северо-Западный, Центральный, Поволжский, Северо-Кавказский, Южный, Уральский федеральные округа).

В свою очередь, на Центральный федеральный округ приходится 25% поголовья. Крупные очаги обитания пятнистого оленя в ЦФО сформированы в Московской, Тверской, Калужской, Владимирской и Орловской областях. Здесь благодаря искусственно созданным условиям для воспроизводства (охрана, обильная подкормка, ветеринарный контроль) олени образовали устойчивые группировки популяционного ранга и используются в качестве объектов охоты (цит. по: Каледин и др., 2022).

Реализуемая в течение многих лет в национальном парке ГК “Завидово” (Тверская обл.)

система охраны и биотехнических мероприятий оказала существенное и благоприятное влияние на акклиматизацию вида и может рассматриваться в качестве эффективной модели. Так, к 2021 г. группировка оленей в ГК “Завидово” достигла численности в 3257 гол., а плотность населения — 36 особей на 1000 га собственных угодий, добыча — 190 гол. Средняя многолетняя биологическая продуктивность охотничьих угодий составила 1.41 кг/га, а выход его продукции — 0.05 кг/га, что стало возможным благодаря использованию комплексного биотехнического подхода.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных одобрены Локальным этическим комитетом Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН №92 от 22.04.2024.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алазнели И.Д., Каледин А.П.* Вопросы акклиматизации пятнистого оленя в центральной полосе европейской части Российской Федерации на примере ООО “Скнятинское охотничье хозяйство” // Междунар. науч. теоретико-практ. альманах. Смоленск: Изд-во ИП Борисова С.И., 2016а. № 2. С. 196–199.
- Алазнели И.Д., Каледин А.П.* Естественное и промысловое изъятие пятнистого оленя в ООО “Скнятинское охотничье хозяйство” Тверской области // Междунар. науч. теор.-практ. альманах. Смоленск: Изд-во ИП Борисова С.И., 2016б. № 2. С. 181–183.
- Алазнели И.Д., Каледин А.П.* О результатах акклиматизации пятнистого оленя в ЦФО РФ // Мат. 7-й междунар. науч.-практ. конф. “Сохранение разнообразия животных и охотничье хозяйство России”. М.: РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2017а. Т. 1. С. 8–10.
- Алазнели И.Д., Каледин А.П.* Ресурсы пятнистого оленя и их использование в Российской Федерации, Московской и Тверской областях // Междунар. науч. теор.-практ. альманах. Смоленск: Изд-во ИП Борисова С.И., 2017б. Т. 2. С. 170–176.
- Алазнели И.Д., Каледин А.П.* Оценка стоимости ресурсов пятнистого оленя в областях Центрального федерального округа России // Междунар. науч. теор.-практ. альманах. Смоленск: Изд-во ИП Борисова С.И., 2018. С. 197–200.
- Алазнели И.Д., Остапчук А.М., Каледин А.П.* Акклиматизация пятнистого оленя в европейской части Российской Федерации: история, современное состояние и перспективы // Междунар. журн. теории и научной практики. Смоленск: Изд-во ИП Борисова С.И., 2018. Т. 1 (2). С. 84–105.
- Алазнели И.Д., Романов А.П., Каледин А.П.* Ресурсы пятнистого оленя и их использование в ООО “Скнятинское охотничье хозяйство” Тверской области // Междунар. науч. теоретико-практ. альманах. Смоленск: Изд-во ИП Борисова С.И., 2017. Т. 2. С. 87–92.
- Арамилев С.В.* Распространение и некоторые аспекты экологии пятнистого оленя (*Cervus nippon hortulorum* Swinhoe, 1864) на юге Дальнего Востока России: Дис. ... канд. биол. наук. Владивосток: БПИ ДВО РАН, 2009. 162 с.
- Байдавлетов Р.Ж.* Распределение и численность копытных в Северо-Восточном Забайкалье // Копытные фауны СССР. М.: Наука, 1980. С. 63–64.
- Богачев А.С., Вахреев Г.И., Велижанин А.Г и др.* Пятнистый олень Приморья // Охота и охотничье хозяйство. 1982. № 2. С. 12–13.
- Волошина И.В.* Динамика численности дикого пятнистого оленя на среднем Сихотэ-Алине // Тез. междунар. совещ. “Редкие виды млекопитающих России и сопредельных территорий”. М.: [б. и.], 1997. С. 21.
- Голубева О.Н., Каледин А.П., Жуков Д.В.* Ресурсы благородного и пятнистого оленей и их хозяйственное использование // Мат. II Всерос. (национальной) науч.-практ. конф. “Ресурсы дичи и рыбы: использование и воспроизводство”. Красноярск: Красноярский ГАУ, 2021. С. 77–83.
- Государственный доклад “О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2016 году”. М.: Минприроды России; НИА-Природа, 2017. 760 с.
- Государственный доклад “О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2018 году”. М.: Минприроды России; НПП-Кадастр, 2019. 844 с.
- Государственный доклад “О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2019 году”. М.: Минприроды России; МГУ им. М.В. Ломоносова, 2020. 1000 с.
- Государственный доклад “О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2020 году”. М.: Минприроды России; МГУ им. М.В. Ломоносова, 2021. 864 с.
- Гуренко Ф.А., Семашко В.Ю.* Олени. М.: АСТ, 2003. 236 с.
- Данилкин А.А.* Олени (Cervidae). М.: ГЕОС, 1999. 552 с.
- Дежкин В.В.* Категории и задачи охраняемых природных территорий России (к обновленной концепции заповедного дела) // Сб. науч. трудов экологического факультета МНЭПУ. М.: МНЭПУ, 1999. № 1. С. 126–141.
- Дежкин В.В.* Природопользование: курс лекций. М.: Издательство МНЭПУ, 2000. 91 с.

- Егоров А.Н. Опыт борьбы с болезнями диких животных и профилактика эпизоотии на охраняемой территории // *Болезни и паразиты диких животных*. М.: [б. и.], 1992. С. 50–56.
- Жуков Д.В. Акклиматизация пятнистого оленя в Национальном парке “Государственный комплекс “Завидово””: Дис. ... канд. биол. наук. М.: РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2022. 131 с.
- Истребление бродячими собаками диких животных // Центр правовой зоозащиты. <http://www.animalsprotectiontribune.ru/tem5.html>, свободный (дата обращения: 21.12.2023).
- Кабельчук Б.В., Лысенко И.О. Биология и экология диких копытных Ставрополя и их влияние на экосистемы особо охраняемых природных территорий при вольном и полувольном содержании и разведении. Ставрополь: АРГУС, 2013. 160 с.
- Кабельчук Б.В., Диреганов И.О., Лысенко Т.Г. и др. Экология, разведение и содержание пятнистого и благородного оленей в полувольных условиях в Ставропольском крае: методические указания. Ставрополь: АРГУС, 2013. 110 с.
- Кадастр животного мира Ямало-Ненецкого автономного округа и применение кадастровых сведений в природоохранной практике // *Российская академия естественных наук. Научный центр “Охрана биоразнообразия”*. http://www.ecoexpertcenter.ru/imp_pics/inf_blok/Kadastr_present.pdf, свободный (дата обращения: 23.11.2023).
- Каледин А.П. Очерки истории охоты. М.: Прима-пресс Экспо, 2010. 224 с.
- Каледин А.П. Охотничье хозяйство и сохранение биоразнообразия. М.: ПТП ЭРА, 2014. 256 с.
- Каледин А.П., Абдулла-Заде Э.Г. Производство и переработка продукции охотничьих хозяйств как объекта АПК: экономико-организационные аспекты // *Экономика сельскохозяйственных и перерабатывающих предприятий*. 2011. № 9. С. 27–28.
- Каледин А.П., Мерзленко М.Д. Охота и лес. М.: ПТП ЭРА, 2014. 272 с.
- Каледин А.П., Бояркин А.И., Блохин Г.И. Возможность акклиматизации пятнистого оленя (*Cervus nippon*) на юге о. Сахалин // *Мат. III междунар. науч.-практ. конф. “Сохранение разнообразия животных и охотничье хозяйство России”*. М.: РГАУ-МСХА, 2009. С. 323–326.
- Каледин А.П., Абдулла-Заде Э.Г., Дежкин В.В. Эколого-экономические аспекты современного природопользования. М.: МГООиР, 2011. 268 с.
- Каледин А.П., Юлдашбаев Ю.А., Николаев А.А. и др. Вопросы сохранения охотничьих ресурсов и их стоимостной оценки в Российской Федерации и Московской области // *Междунар. техн.-эконом. журн.* 2016а. № 4. С. 24–29.
- Каледин А.П., Абдулла-Заре Э.Г., Николаев А.А. и др. Модель динамики популяции лося в Подмосковье // *Междунар. техн.-эконом. журн.* 2016б. № 3. С. 54–58.
- Каледин А.П., Филатов А.И., Остапчук А.М. Основы охотничьего ресурсоведения. Реутов: ЭРА, 2018. 344 с.
- Каледин А.П., Бекетов С.В., Жуков Д.В. и др. Микросателлитный анализ популяций уссурийского пятнистого оленя, акклиматизированного в европейской части России // *Теор. и прикл. экол.* 2022. № 2. С. 37–44.
- Красная книга Хабаровского края. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и животных: официальное издание. Хабаровск: Минприроды Хабаровского края; Изд. дом “Приамурские Ведомости”, 2008. 632 с.
- Кривенко В.Г., Равкин Е.С., Мирутенко М.В. Опыт инвентаризации региональных заказников Ямало-Ненецкого АО на основе кадастра животного мира // *Мат. 2-й междунар. науч.-практ. конф. “Сохранение разнообразия животных и охотничье хозяйство России”*. М.: РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2007. С. 40–53.
- Маковкин Л.И. Дикий пятнистый олень Лазовского заповедника и сопредельных территорий (материалы исслед. 1981–1996 гг.). Владивосток: Русский остров, 1999. 133 с.
- Мануш П.С. Биотехнические мероприятия для копытных на территории национального парка // *Национальный парк “Завидово” 80 лет (1929–2009), сборник. Юб. науч. чтения*. М.: Деловой мир, 2009. С. 60–62.
- Маслов М.В. Особенности обитания пятнистого оленя *Cervus nippon* (Temminck, 1838) в Уссурийском заповеднике: Дис. ... канд. биол. наук. Владивосток: БПИ ДВО РАН, 2011. 153 с.
- Петрашов В.В. Состояние аборигенной популяции дикого пятнистого оленя // *Копытные фауны СССР*. М.: Наука, 1980. С. 249–250.
- Присяжнюк В.Е. Факторы смертности дикого пятнистого оленя на юге Приморского края // *Биологические аспекты охраны редких животных СССР*. М.: [б. и.], 1981. С. 44–45.
- Присяжнюк В.Е. Погодно-климатические условия последней четверти XX века как решающий фактор изменения состояния материковой популяции аборигенного пятнистого оленя и перспектив ее выживания // *Тез. междунар. совещ. “Редкие виды млекопитающих России и сопредельных территорий”*. М.: [б. и.], 1997. С. 78.
- Сафонов В.Г. Мониторинг охотничьих ресурсов: история и современные проблемы // *Использование и охрана природных ресурсов в России*. 2002. № 11–12. С. 96–99.
- Сидоров С.В. Расселение пятнистого оленя на Северном Кавказе // *Копытные фауны СССР*. М.: Наука, 1980. С. 258–260.

- Об утверждении Плана мероприятий по реализации Стратегии развития охотничьего хозяйства в Российской Федерации до 2030 г. // Приказ Министерства природных ресурсов и экологии России от 28 ноября 2014 г. № 527 (с изменениями на 16 декабря 2015 г.).
<https://docs.cntd.ru/document/420240629>, свободный (дата обращения: 01.12.2023).
- Сойнова О.И. Антропогенные и естественные факторы, определяющие численность марала, европейского благородного и пятнистого оленей в центральных областях России: Дис. ... канд. биол. наук. М.: РГАЗУ, 2005. 176 с.
- Тихонов А.А. Облавные охоты на копытных // Охота и охотничье хозяйство. 1983. № 11. С. 12–14.
- Улитин А.А. Экологические, правовые и экономические проблемы охотничьего хозяйства России в связи с охраной охотничьих ресурсов: Дис. ... докт. биол. наук. М.: ИПЭЭ РАН, 1999. 88 с.
- Улитин А.А. Эколого-популяционные и организационные основы ведения охотничьего хозяйства России // Сб. мат. XXIX междунар. конгресса биологов-охотоведов. М.: [б. и.], 2009. Ч. 1. С. 213–215.
- Фадеев Е.К. Пятнистый олень в СССР // Охота и охотничье хозяйство. 1984. № 5. С. 18–21.
- Фертиков В.И. Состояние популяций диких копытных Центрального региона России: История формирования, динамика численности, лечение и профилактика болезней, управление: Дис. ... докт. биол. наук в форме науч. докл. М.: ИПЭЭ РАН, 1999. 62 с.
- Фокин И.М., Айрапетьян А.Э. Интродуцированные млекопитающие в России: экологический и экономический эффект // Биологические инвазии в водных и наземных экосистемах. М.; СПб.: Тов-во науч. изд. КМК, 2004. С. 320–340.
- Филонов К.П. Оценка состояния популяций оленей. М.: Наука, 1993. 272 с.
- Харитонов М.А., Андрианов А.В., Логинов С.Б. и др. Опыт содержания и разведения пятнистого оленя (*Cervus nippon* Temminck) в полувольных условиях на территории ФГБУ “Безбородовское ГООХ” // Вестн. Тверского ГУ. Серия: Биол. Экол. 2015. № 4. С. 121–129.
- Хахин Г.В., Присяжнюк В.Е. Современное состояние и численность пятнистого оленя в СССР // Экологические особенности охраны животного мира. М.: Наука, 1985. С. 14–23.
- Храмцов В.С. Проблемы охраны пятнистого оленя в Лазовском заповеднике // Копытные фауны СССР. М.: Наука, 1980. С. 272.
- Чегорка П.Т. Фенотипические критерии диагностики благородных и пятнистых оленей и гибридов между ними в смешанных популяциях // Тез. докладов Всесоюзного совещания “Проблемы охраны генофонда и управления экосистемами в заповедниках лесной зоны”. М.: [б. и.], 1986. Т. 2. С. 222–225.
- Чегорка П.Т. К вопросу о гибридизации благородного и пятнистого оленей // Экология, морфология, использование и охрана диких копытных животных // Тез. Всесоюз. совещания, Москва, 20–22 февраля 1989 г. Москва: [б. и.], 1989. С. 112–114.
- Шевцов В.М., Бруснигин П.Ф. Современное состояние численности охотничьих животных на территории государственного природного заказника федерального значения – государственного комплекса “Таруса” // X юбилейные научные чтения “Национальный парк “Завидово” 85 лет (1929–2014 гг.): Природа и Наука”. М.: Кремль-фильм, 2014. С. 399–410.
- Эрнст Л.К., Дмитриев Н.Г., Паронян И.А. Генетические ресурсы сельскохозяйственных животных в России и сопредельных странах. СПб.: Изд-во ВНИИГРЖ, 1994. 472 с.
- Agetsuma N., Sugiura H., Hill D.A. et al. Population density and group composition of Japanese sika deer (*Cervus nippon yakushimae*) in an evergreen broad-leaved forest in Yakushima, southern Japan // Ecol. Res. 2003. V. 18 (5). P. 475–483.
<https://doi.org/10.1046/j.1440-1703.2003.00571.x>
- Asher G.W., Gallagher D.S., Tate M.L. et al. Hybridization between sika deer (*Cervus nippon*) and axis deer (*Axis axis*) // J. Heredity. 1999. V. 90 (1). P. 236–242.
<https://doi.org/10.1093/jhered/90.1.236>
- Cervus nippon* Temminck, 1838 // ООПТ России.
<http://oopt.aari.ru/bio/8803>, свободный (дата обращения: 11.02.2024).
- Koichi K., Saitoh T., Uno H. et al. Adaptive management of sika deer populations in Hokkaido, Japan: theory and practice // Popul. Ecol. 2010. V. 52 (3). P. 373–387.
<https://doi.org/10.1007/s10144-010-0219-4>
- Köller J. Das vorkommendes japanischen sikahirsches (*Cervus nippon nippon* Temminck 1838) und des dybowski-hirsches (*Cervus nippon hortulorum* Swinhoe 1864) in Ungarn // Eur. J. Wildl. Res. 1990. V. 36 (2). P. 73–82.
<https://doi.org/10.1007/BF02241804>
- Kurt F. Sika deer (subgenus *Sika*) // Grzimek’s encyclopedia of mammals. New York: McGraw-Hill, 1990. P. 174–175.
- Valerius G. Deer of the world: their evolution, behavior, and ecology. Mechanicsburg: Stackpole Books, 1998. 421 p.
- Whitehead K.G. The Whitehead encyclopedia of deer. Stillwater: Voyageur Press, 1993. 704 p.

Settlement and Acclimatization of Sika Deer in the Russian Federation

A. P. Kaledin^a, D. V. Zhukov^b, S. V. Beketov^{c,*}, V. I. Fertikov^b,
A. V. Smurov^d, V. M. Makeeva^d

^a*Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia*

^b*State Complex “Zavidovo”, Federal Protective Service of the Russian Federation, Kozlovo, Tver Region, Russia*

^c*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^d*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

**e-mail: svbeketov@gmail.com*

The article discusses the issues of conservation, distribution and acclimatization of sika deer on the territory of the Russian Federation, the Central Federal District and of the National Park “State Complex “Zavidovo”. A detailed analysis of the condition of the first range of sika deer in the Primorsky Krai, as well as the history of settlement and dynamics of its population in the Russian Federation. For the regions of the Central Federal District, the results of the cadastral assessment of sika deer resources were calculated, including the average long-term week, the average long-term illumination of the population (animals) per 1000 hectares of characteristic lands and the average long-term cost of resources (million rubles). As an effective model for the acclimatization of sika deer, an experience of its economic use was carried out in the National Park “State complex “Zavidovo” (Tver region).

Keywords: sika deer, primary habitat, resettlement, acclimatization, livestock groups, cadastral assessment, bioproductivity, biotechnical measures

УДК 577.12

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МИКРОРНК775А И ЕЕ РОЛЬ В ПОСТТРАНСКРИПЦИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ ПРИ ГИПОКСИИ

© 2024 г. Д. Н. Федорин¹, А. Е. Хомутова¹, А. Т. Епринцев^{1,*}

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

*e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 15.11.2023 г.

После доработки 29.12.2023 г.

Принята к публикации 12.01.2024 г.

Под действием гипоксии в растительном организме изменяется транскрипция генов, ответственных за адаптацию к стрессу, вызванному низким содержанием кислорода. Изменения метаболических путей в стрессовых условиях могут регулироваться микроРНК. Было установлено, что в листьях кукурузы под действием гипоксии увеличивается содержание микроРНК775А. Применение флуоресцентного зонда miR775A-ROX позволило установить увеличение количества РНК-индуцирующих комплексов сайленсинга (RISC), сформированных на основе микроРНК775А, в листьях кукурузы при развитии гипоксического стресса. Полученные результаты свидетельствуют о том, что микроРНК775А участвует в процессах адаптации организма к гипоксическим условиям путем регуляции экспрессии генов-мишеней на посттранскрипционном уровне по механизму РНК-интерференции.

Ключевые слова: *Zea mays*, микроРНК775А, РНК-интерференция, RISC, RITS, гипоксия

DOI: 10.31857/S0042132424030067, **EDN:** PRSVTA

ВВЕДЕНИЕ

Низкий уровень кислорода является одним из абиотических факторов, стимулирующих растения к запуску каскада адаптивных реакций. Несмотря на обилие молекулярных и фенотипических данных о реакциях растений на гипоксию, до сих пор остается неясным, как воспринимается снижение уровня кислорода и контролируются сложные и обширные изменения экспрессии (Bailey-Serres, Chang, 2005). В реакции на дефицит кислорода принимают участие различные транскрипционные факторы, в частности, была выявлена значительная роль в адаптации к гипоксии транскрипционных факторов семейства NIF, активируемых микроРНК (Силина и др., 2023).

МикроРНК – небольшие молекулы РНК (20–22 нт), регулирующие экспрессию целевых генов на посттранскрипционном уровне путем ингибирования трансляции или расщепления их мРНК. В растениях микроРНК действуют путем нацеливания на почти идеально комплементарные мРНК для их эндонуклеолитического расщепления, в том числе и чувствительные к гипоксии (Vazquez, 2006; Moldovan et al., 2010).

МикроРНК участвуют во многих процессах, включая адаптивные реакции на стресс путем подавления соответствующих генов-мишеней, кодирующих регуляторные и функциональные белки (Yanfei et al., 2013).

Свое действие микроРНК осуществляют несколькими механизмами. В случае экспорта в цитоплазму с одной из нитей дуплекса связывается комплекс РНК-индуцированного сайленсинга (RISC), а вторая нить впоследствии деградирует (Iwakawa, Tomari, 2022). У растений действие комплекса RISC включает эндонуклеолитическое расщепление гибридов микроРНК-РНК мишени, посттрансляционную репрессию целевого белка и метилирование цитозиновой ДНК или гистонов (Voinnet, 2009). Большое значение в регуляторном механизме посредством RISC играют нуклеазы AGO1, AGO4, AGO6 и AGO7, особенно AGO1 и AGO4 (Vaucheret, 2008).

Кроме того, микроРНК являются ключевым звеном РНК-направленного метилирования ДНК, которое реализуется в ядре комплексом РНК-индуцированного транскрипционного сайленсинга (RITS). Компоненты RITS локали-

зуются во всех участках гетерохроматина и необходимы для его сборки. Данный комплекс у *Arabidopsis* состоит из трех белков: AGO1, Chp1, Tas3 (Partridge et al., 2002; Sadaie et al., 2004; Verdel et al., 2004). Ключевым компонентом RITS-комплексов является AGO2, содержащий PIWI-домен, сходный с рибонуклеазой H и включающий также консервативные каталитические аминокислотные остатки, формируя каталитический центр RITS (Song et al., 2004; Joshua-Tor et al., 2006). Связываясь с микроРНК, данный комплекс не выходит в цитоплазму в отличие от RISC, а действует в ядре, связываясь непосредственно с ДНК (Bhattacharjee et al., 2019).

Изменение содержания зрелой микроРНК в клетке носит стресс-зависимый характер, что обусловлено ее синтезом из гена-предшественника, и оценка вариации ее содержания в клетках важна для определения стратегии регуляции генов-мишеней (Zhang et al., 2020). ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) является золотым стандартом для количественной оценки экспрессии генов, в том числе его модификация с применением специфических олигонуклеотидов “стебель–петля” может использоваться для мультиплексных реакций обратной транскрипции и клонирования малых РНК с большой эффективностью и специфичностью (Heid et al., 1996; Nicot et al., 2005).

Конструкция олигонуклеотидов “стебель–петля” способна специфически обратно транскрибировать только выбранную зрелую микроРНК, которая впоследствии амплифицируется с помощью ПЦР-РВ (Chen et al., 2005). Типичный праймер для обратной транскрипции (ОТ) “стебель–петля” включает 5–8-нуклеотидную последовательность 3'-элемента, комплементарную 3'-концу зрелой микроРНК, последовательность стебля и петли, которая также содержит универсальный 3'-сайт праймирования для последующего ПЦР-РВ.

Ряд исследований показал, что содержание микроРНК775А изменяется при гипоксии (Moldovan et al., 2010; Mishra et al., 2022). Ингибирование митохондриального дыхания привело к значительному увеличению транскриптов микроРНК775А, что может свидетельствовать о том, что данная микроРНК участвует в регуляции экспрессии генов ферментов, задействованных в процессе дыхания (Moldovan et al., 2010). В связи с этим целью работы было исследование роли микроРНК775А в регуляции генов-мишеней в листьях кукурузы при гипоксии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования в работе использовали листья 14-дневной кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская 76, выращенной гидропонным методом при 14-часовом световом дне с интенсивностью света 90 мкмоль квантов $\cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, при температуре окружающей среды 25°C.

Действие низких концентраций кислорода в среде осуществлялось путем помещения растений с предварительно удаленной корневой системой на 24 ч в вакуум-эксикатор, в который подавался азот. В качестве контрольной группы использовались растения с предварительно удаленной корневой системой, помещенные в вакуум-эксикатор в условиях нормальной аэрации. Для исключения влияния фотосинтетической системы обе группы растений предварительно экспонировались в темноте в течение 24 ч до проведения эксперимента. На протяжении всего времени эксперимента растения также находились в условиях отсутствия источников света (Епринцев и др., 2021).

Выделение суммарной РНК из растительных образцов осуществляли методом гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. В качестве осадителя использовали LiCl (Venupusa et al., 2020).

Обратную транскрипцию проводили с использованием обратной транскриптазы M-MuLV (СибЭнзим, Россия), согласно инструкции производителя. Для получения кДНК суммарной РНК клетки использовали праймер Oligo(dT)₁₅ (Евроген, Россия). Параметры проведения обратной транскрипции следующие: инкубация смеси при 70°C – 5 мин, 37°C – 60 мин, 70°C – 10 мин.

Для получения кДНК анализируемой микроРНК реакцию обратной транскрипции осуществляли со специфическим разработанным зондом для микроРНК775А. Параметры проведения обратной транскрипции следующие: инкубация смеси при 16°C – 30 мин, 42°C – 30 мин, 85°C – 5 мин (Kramer, 2011).

Схема разработки зонда для количественной оценки микроРНК775А включает формирование 3'-сайта праймирования для последующей ПЦР (Kramer, 2011). Для создания специфического зонда типа “стебель–петля” для проведения обратной транскрипции исследуемой микроРНК использовали последовательность из 44 нуклеотидов, представляющую собой вариант “стебель–петля” HSV-1:

5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC-3'

с комплементом из шести к зрелой микроРНК775А. Результатом формирования специфического зонда для количественной оценки зрелой микроРНК775А с помощью ПЦР-РВ является 70-нуклеотидная кДНК второй цепи микроРНК-Н1, формируемая при проведении обратной транскрипции.

ПЦР-РВ проводили с помощью набора реактивов AmpliSence (Хеликон, Россия) на приборе LightCycler 96 (Roche, Швейцария), используя в качестве референсного гена ген фактора элонгации *ef-1 α* (Nicot et al., 2005). Разработка праймеров для количественной оценки микроРНК775А осуществлялась на основании шести дополнительных нуклеотидов на 3'-конце последовательности микроРНК-Н1 и первых 12 нуклеотидов 5'-конца зрелой микроРНК775А, что формирует последовательность прямого праймера для проведения количественной ПЦР-РВ. Обратным праймером для проведения ПЦР-РВ являлась последовательность из 16 нуклеотидов последовательности на 5'-конце. Нуклеотидный состав праймеров микроРНК775А: прямой – 5'-CACTGATTTCGATGTCTAG-3'; обратный – 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'.

Параметры амплификации следующие: предварительная денатурация – 95°C – 5 мин, цикл – 95°C – 30 с, 58°C – 30 с, 72°C – 30 с (детекция), финальная элонгация – 72°C – 10 мин.

Применяли программное обеспечение Opticon Monitor™ Software (Bio-Rad, США) для установления относительного уровня транскриптов генов на основе 2- $\Delta\Delta C$ -метода (Livak, Schmittgen, 2001).

Анализ РНК-интерференции и РНК-зависимого метилирования ДНК проводили с применением флуоресцентного зонда ROX-микроРНК775А, представляющего собой нуклеотидную последовательность, комплементарную зрелой микроРНК775А с флуорофором ROX на 3'-конце. Результаты оценивали электрофоретическим методом в 1%-ном агарозном геле. Интеркалирующим красителем электрофореграмм нуклеиновых кислот выступал SybrGreen I. Фотовозбуждение SYBR Green I проводили облучением при 312 нм и определяли эмиссию ROX.

В работе все эксперименты проводились в трех биологических и трех аналитических повторностях. Данные ПЦР-РВ были подвергнуты двустороннему дисперсионному анализу (ANOVA) с использованием программного обе-

спечения для анализа данных STATISTICA версии 9 (Statsoft Wipro, East Brunswick, NJ, USA). Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений (*SD*). Обсуждаются статистически значимые различия при $p < 0.05$ (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки содержания микроРНК775А в образцах растений в условиях гипоксии был использован метод количественной ПЦР-РВ. По результатам ПЦР-РВ было показано, что под действием гипоксии в течение 24 ч наблюдается увеличение микроРНК775А. После 1 ч содержания опытной группы в гипоксических условиях было зафиксировано увеличение количества микроРНК775А в 0.3 раза по сравнению с контролем. После 3 ч содержания опытных образцов в среде азота отмечалось увеличение соответствующей микроРНК775А в 0.7 раз, а после 6 ч – в 1.2 раза. После 24 ч содержания опытной группы в среде азота наблюдалось максимальное количество микроРНК775А. По сравнению с нулевым часом, оно увеличилось в 2.5 раза (рис. 1).

Известно, что микроРНК могут осуществлять посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов путем РНК-интерференции (Jones-Rhoades et al., 2006). Для оценки образования РНК-интерферирующего комплекса с микроРНК775А применяли метод аналитического электрофореза со специфичным флуоресцентным зондом. Данный метод позволил выявить соотношение количества образовавшихся РНК-интерферирующих комплексов с микроРНК775А в образцах при различных по времени гипоксических условиях (рис. 2).

Результаты электрофоретического исследования комплекса мРНК–микроРНК775А-ROX указывают на то, что микроРНК775А действует по пути РНК-интерференции, связываясь с комплексом RISC, и посттранскрипционно взаимодействует с комплементарной ей мРНК. Об этом свидетельствуют образовавшиеся флуоресцентные структуры – триплексы, представляющие собой комплекс мРНК–микроРНК775А-зонд (см. рис. 2). Увеличение интенсивности свечения анализируемых флуоресцентных комплексов при развитии гипоксии может свидетельствовать об интенсификации образования РНК-интерферирующих комплексов, взаимодействующих с мРНК генов-мишеней.

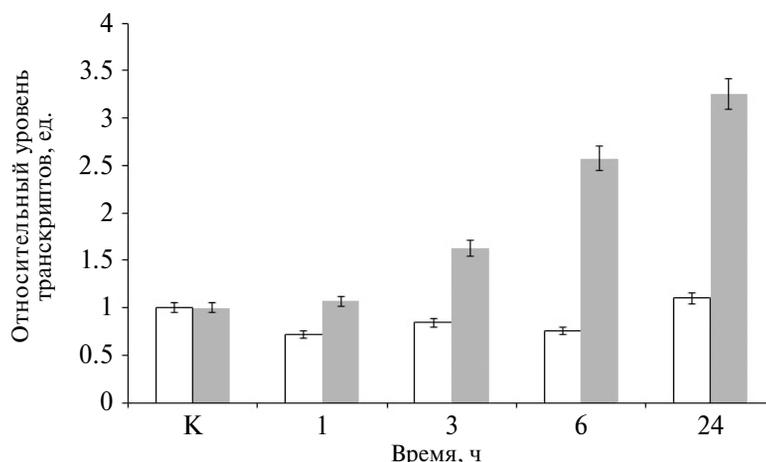


Рис. 1. Относительный уровень микроРНК775А в листьях кукурузы при гипоксии. Белые столбцы – контроль (воздух), серые – среда азота.

Кроме того, известно, что микроРНК принимают участие в РНК-зависимом метилировании ДНК посредством комплексов RITS (Bhattacharjee et al., 2019). Для оценки образования комплекса РНК-индуцированного транскрипционного сайленсинга с микроРНК775А также применяли метод аналитического электрофореза со специфичным флуоресцентным зондом микроРНК775А-ROX (рис. 3), однако значимых изменений в количестве образовавшихся комплексов с геномной ДНК листьев исследуемых растений не наблюдалось. Следовательно, анализируемая в нашей работе микроРНК775А обеспечивает регуляцию генов-мишеней в листьях кукурузы при гипоксическом стрессе на посттранскрипционном уровне.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружение и количественное определение микроРНК основано на клонировании, нозерн-блоттинге (Lagos-Quintana et al., 2001) или удлинении праймера (Zeng, Cullen, 2003), однако, современный метод ПЦР-РВ дает возможность количественно оценить их участие в регуляции экспрессии генов (He, Hannon, 2004; Chen et al., 2005). Анализ литературы свидетельствует, что микроРНК775А принимает участие в механизмах регуляции генов-мишеней при гипоксии (Moldovan et al., 2010; Mishra et al., 2022). Для возможности оценки количества микроРНК775А был разработан специфический зонд для количественной оценки зрелой микроРНК на основе 44 нуклеотидов, представляющей со-

бой вариант “стебель–петля”. 70-нуклеотидная кДНК второй цепи мкРНК-Н1, формируемая при проведении обратной транскрипции, позволяет провести количественную оценку свободной микроРНК775А методом ПЦР-РВ.

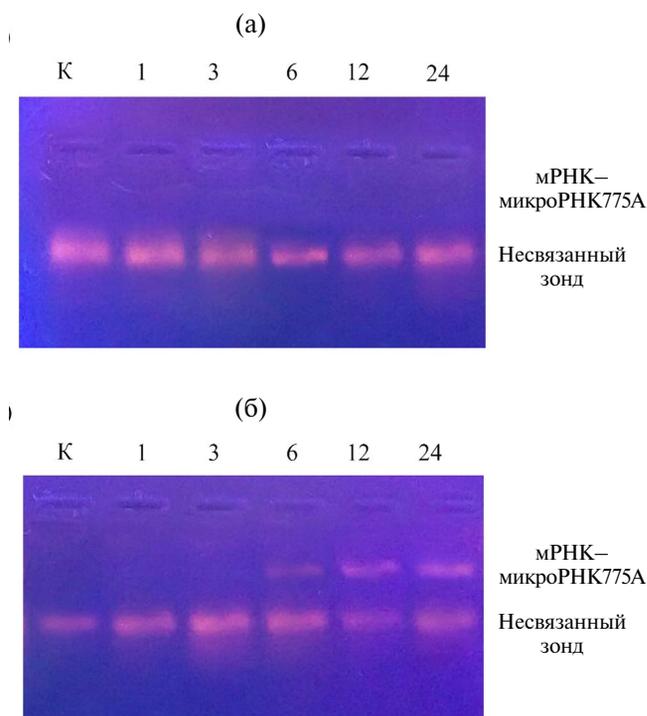


Рис. 2. Электрофореграмма образцов РНК-интерферирующего комплекса с микроРНК775А в листьях кукурузы при нормоксии (а) и гипоксии (б). 0, 1, 3, 6, 24 – время экспозиции растений в соответствующих экспериментальных условиях (здесь и на рис. 3).

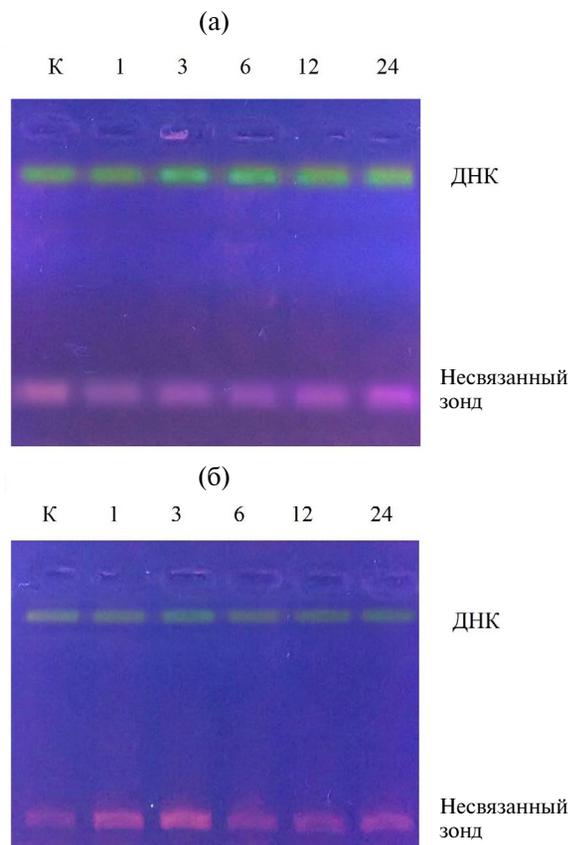


Рис. 3. Электрофореграмма образцов комплекса РНК-индуцированного транскрипционного сайленсинга с микроРНК775А в листьях кукурузы при нормоксии (а) и гипоксии (б).

В ходе нашего исследования было установлено, что содержание зрелой микроРНК775А увеличивается при гипоксии почти в 2.5 раза за 24 ч, что может говорить о ее участии в ответной реакции растительной клетки на гипоксический стресс. Ранее было установлено ингибирование митохондриального дыхания в условиях гипоксии растений (Bailey-Serres, Chang, 2005; Agarwal, Grover, 2006). Выявленное нами увеличение количества микроРНК775А в листьях кукурузы при гипоксии дает возможность предположить, что она может принимать участие в регуляции экспрессии генов ферментов дыхательного метаболизма растений по механизму РНК-интерференции.

Ранее было показано, что микроРНК775А может быть связана с транскрипционным фактором МУВ (myeloblastosis), участвующим в различных биологических функциях, в том числе в стрессовом ответе при гипоксии (Ambawat et al., 2013). Была доказана роль AtМУВ2 в ин-

дукции гена алкогольдегидрогеназы *Arabidopsis* (ADH1) при низком уровне кислорода (Hoegen et al., 1998). Можно предположить, что микроРНК775А участвует в регуляции ферментативных систем при переходе на альтернативное дыхание растительной клетки при гипоксическом стрессе посредством транскрипционных факторов семейства МУВ.

С применением метода аналитического электрофореза со специально разработанным для микроРНК775А флуоресцентным зондом удалось установить, что микроРНК775А может взаимодействовать со зрелой мРНК гена-мишени и действует по пути посттранскрипционного сайленсинга, акцептируясь комплексом RISC. Увеличение содержания микроРНК775А в листьях кукурузы при гипоксии соотносится с увеличением количества РНК-интерферирующего комплекса на основе микроРНК775А (см. рис. 2).

С применением флуоресцентного зонда микроРНК775А-ROX было показано отсутствие формирования соответствующего комплекса RITS и его взаимодействие с геномной ДНК листьев кукурузы при развитии гипоксии. Следовательно, микроРНК775А, по всей видимости, не принимает участия в РНК-зависимом метилировании ДНК, а регулирует экспрессию гена-мишени по типу РНК-интерференции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гипоксия изменяет транскрипцию генов, способствующих реализации клеточного ответа на стресс. Естественным инструментом клеточной регуляции служат микроРНК. Они влияют на ход метаболических процессов растительной клетки, что позволяет растениям адаптироваться к меняющимся условиям, в том числе к действию стрессовых факторов.

Анаэробный или низкокислородный стресс (гипоксия) нарушает митохондриальное дыхание. Под действием гипоксии происходят изменения в транскриптоме и переключение с аэробного на анаэробное дыхание. Участие микроРНК в реакции растений на гипоксию было подтверждено в экспериментах с ингибированием митохондриального дыхания. На примере микроРНК775А продемонстрировано количественное изменение микроРНК при низкокислородном стрессе. Кроме этого установлено, что данная микроРНК действует только по пути посттранскрипционного сайленсинга и не участвует в ремоделировании гетерохроматина.

Ранее проведенные исследования профиля экспрессии MYB кукурузы показали его зависимость от гипоксических условий (Du et al., 2012), что соотносится с полученными данными по изменению содержания микроРНК775А в листьях кукурузы в тех же экспериментальных условиях, что позволяет предположить роль данной микроРНК в посттранскрипционной регуляции гипоксически-зависимых генов-мишеней, регулируемых фактором транскрипции MYB.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023–2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Епринцев А.Т., Анохина Г.Б., Гатауллина М.О., Федорин Д.Н. Роль эпигенетических механизмов в регуляции активности 2-ОГДГ и МДГ в листьях кукурузы (*Zea mays* L.) при гипоксии // Физиол. раст. 2021. Т. 68 (2). С. 187–193.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 351 с.
- Силина М.В., Джалилова Д.Ш., Макарова О.В. Роль микроРНК в регуляции клеточного ответа на гипоксию // Биохимия. 2023. Т. 88 (6). С. 913–932.
- Agarwal S., Grover A. Molecular biology, biotechnology and genomics of flooding-associated low O₂ stress response in plants // Crit. Rev. Plant Sci. 2006. V. 25. P. 1–21.
- Ambawat S., Sharma P., Yadav N.R. et al. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2013. V. 3. P. 307–321.
- Bailey-Serres J., Chang R. Sensing and signalling in response to oxygen deprivation in plants and other organisms // Ann. Botan. 2005. V. 96. P. 507–518.
- Bhattacharjee S., Roche B., Martienssen R.A. RNA-induced initiation of transcriptional silencing (RITS) complex structure and function // RNA Biol. 2019. V. 9. P. 1133–1146.
- Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. P. e179.
- Du H., Feng B.R., Yang S.S. et al. The R2R3-MYB transcription factor gene family in maize // PLoS One. 2012. V. 6. P. e37463.
- He L., Hannon G.J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation // Nat. Rev. Genet. 2004. V. 5. P. 522–531.
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. Real time quantitative PCR // Genome Res. 1996. V. 6. P. 986–994.
- Hoeren F.U., Dolferus R., Wu Y., Peacock W.J., Dennis E.S. Evidence for a role for AtMYB2 in the induction of the *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase gene (ADH1) by low oxygen // Genetics. 1998. V. 149. P. 479–490.
- Iwakawa H.O., Tomari Y. Life of RISC: formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex // Mol. Cell. 2022. V. 82. P. 30–43.
- Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P., Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2006. V. 57. P. 19–53.
- Joshua-Tor L. The Argonautes // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2006. V. 71. P. 67–72.
- Kramer M.F. Stem-loop RT-qPCR for miRNAs // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2011. CHAPTER: Unit15.10.
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W. et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs // Science. 2001. V. 294. P. 853–858.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method // Methods. 2001. V. 25. P. 402.
- Mishra V., Singh A., Gandhi N. et al. A unique miR775-GALT9 module regulates leaf senescence in *Arabidopsis* during post-submergence recovery by modulating ethylene and the abscisic acid pathway // Development. 2022. V. 149 (4). P. dev199974.
- Moldovan D., Spriggs A., Yang J. et al. Hypoxia-responsive microRNAs and trans-acting small interfering RNAs in *Arabidopsis* // J. Exp. Bot. 2010. V. 6. P. 165–177.
- Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L. et al. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 2907–2914.
- Partridge J.F., Scott K.S., Bannister A.J. et al. cis-acting DNA from fission yeast centromeres mediates histone H3 methylation and recruitment of silencing factors and cohesin to an ectopic site // Curr. Biol. 2002. V. 12. P. 1652–1660.
- Sadaie M., Iida T., Urano T. et al. A chromodomain protein, Chp1, is required for the establishment of heterochromatin in fission yeast // EMBO J. 2004. V. 23. P. 3825–3835.
- Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J. et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity // Science. 2004. V. 305. P. 1434–1437.
- Vaucheret H. Plant ARGONAUTES // Trends Plant Sci. 2008. V. 13. P. 350–358.

- Vazquez F. *Arabidopsis* endogenous small RNAs: highways and byways // Trends Plant Sci. 2006. V. 11. P. 460–468.
- Verdel A., Jia S., Gerber S. et al. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex // Science. 2004. V. 303. P. 672–676.
- Vennapusa A.R., Somayanda I.M., Doherty C.J., Jagadish S.K. A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber // Sci. Rep. 2020. V. 10 (1). P. 1–13.
- Voinnet O. Origin biogenesis, and activity of plant microRNAs // Cell. 2009. V. 136. P. 669–687.
- Yanfei D., Yueliang T., Cheng Z. Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants // Experim. Bot. 2013. V. 64. P. 3077–3086.
- Zhang C., Fan L., Le B.H. et al. Regulation of ARGONAUTE10 expression enables temporal and spatial precision in axillary meristem initiation in *Arabidopsis* // Dev. Cell. 2020. V. 55. P. 603–616.
- Zeng Y., Cullen B.R. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells // RNA. 2003. V. 9. P. 112–123.
<https://doi.org/10.1261/rna.2780503>

Changes in the Content of microRNA775a and its Role in Post-Transcriptional Regulation of Targeted Genes in Corn Leaves under Hypoxia

D. N. Fedorin^a, A. E. Khomutova^a, A. T. Eprintsev^{a, *}

^aVoronezh State University, Voronezh, Russia

*e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Under the influence of hypoxia in the plant organism, the transcription of genes responsible for adaptation to stress caused by low oxygen levels changes. Changes in metabolic pathways under stress conditions may be regulated by microRNAs. It was found that the content of microRNA775A increases in corn leaves under the influence of hypoxia. The use of the fluorescent probe miR775A-ROX made it possible to establish an increase in the number of RNA-inducing silencing complexes (RISC), formed on the basis of microRNA775A, in maize leaves during the development of hypoxic stress. The results obtained indicate that microRNA775A is involved in the processes of adaptation of the body to hypoxic conditions by regulating the expression of target genes at the post-transcriptional level using the RNA interference mechanism.

Keywords: *Zea mays*, microRNA775A, RNA interference, RISC, RITS, hypoxia