



# УСПЕХИ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ



*Российская академия наук*

**УСПЕХИ  
СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ**

Том 144 № 4 2024 Июль—Август

Журнал основан в 1932 г.

Выходит 6 раз в год

ISSN 0042-1324

*Журнал издаётся под руководством  
Отделения биологических наук РАН*

*Главный редактор*  
А.М. Кудрявцев

Редакционная коллегия:

А.О. Алексеев, С.В. Бекетов (отв. секр.), Франко М. Буонагуро (Италия), А.Г. Викторov, М.И. Гладышев, Н.Б. Гусев, И.А. Захаров-Гезехус, В.М. Земсков, А.П. Козлов, Е.З. Кочиева, К.В. Крутовский (США, Германия), В.В. Кузнецов, А.М. Куликов, В.Ю. Макеев, Е.В. Поверенная, А.В. Родионов, А.Ю. Розанов, А.И. Слободкин

*Russian Academy of Sciences*

**ADVANCES IN CURRENT BIOLOGY**

Volume 144 № 4 July—August 2024

The journal is founded in 1932

A.M. Kudryavtsev — *Editor-in-Chief*

Editorial board:

A.O. Alekseev, S.V. Beketov, Franko M. Buonaguro (Italy), M.I. Gladyshev, N.B. Gusev, A.P. Kozlov, E.Z. Kochieva, K.V. Krutovsky (USA, Germany), V.V. Kuznetsov, A.M. Kulikov, V.Yu. Makeev, E.V. Poverennaya, A.V. Rodionov, A.Yu. Rozanov, A.I. Slobodkin, A.G. Viktorov, I.A. Zakharov-Gezekhus, V.M. Zemskov

“Advances in Current Biology” is a general biological journal publishing review, theoretical and experimental articles reflecting the latest achievements in biology as well as chronicles and reviews. Particular attention is given to the works performed at the interface between different disciplines and forming the basis of applied elaborations. Concepts of adaptive mechanisms and strategies, problems of genetics and molecular biology, evolution, current taxonomy, synecology, biogeography, ecology, biomedical problems and others received much consideration. Also much attention is given to discussing problems of biological diversity, its conservation and rational management. The journal is a source of exhaustive and reliable information on the state and achievements of current biology.

*Зав. редакцией Т.Ю. Павлова*

*Адрес редакции:* 119991, г. Москва, ГСП-1, ул. Губкина, д. 3

*E-mail:* usb@pleiadesonline.com

**Москва**

**ФГБУ «Издательство «Наука»»**

---

© Российская академия наук, 2024

© Редакция журнала “Успехи современной биологии” (составитель), 2024

# СОДЕРЖАНИЕ

---

Том 144, номер 4, 2024

---

|                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Памяти Л.В. Топоровой<br><i>Редакционная коллегия</i>                                                                                                                                                                                                           | 363 |
| Теория эволюционной роли наследуемых опухолей ( <i>carcino-evo-devo</i> ): история развития и современное состояние. Часть 2. Становление теории в книге “Evolution by tumor neofunctionalization”<br><i>А. П. Козлов</i>                                       | 364 |
| Теория эволюционной роли наследуемых опухолей ( <i>carcino-evo-devo</i> ): история развития и современное состояние. Часть 3. Современное состояние теории <i>carcino-evo-devo</i> и ее взаимоотношения с другими биологическими науками<br><i>А. П. Козлов</i> | 374 |
| Аффинные якоря: сравнение популярных тегов в современной молекулярной биологии<br><i>П. А. Крюкова, О. И. Киселева, И. Ю. Курбатов, Е. В. Поверенная</i>                                                                                                        | 402 |
| Молекулярно-генетические методы в обнаружении и генотипировании саповирусов человека (обзор литературы)<br><i>А. Ю. Кашиников, Н. В. Епифанова, Н. А. Новикова</i>                                                                                              | 414 |
| Морфофункциональные изменения легких в динамике ингаляционного отравления дихлорангидридом угольной кислоты<br><i>П. А. Торкунов, С. В. Чепур, П. Д. Шабанов, А. В. Земляной, О. В. Торкунова</i>                                                               | 424 |
| Эффективность респираторной поддержки в раннем периоде интоксикации кроликов продуктами термодеструкции фторопласта-4<br><i>П. Г. Толкач, Д. М. Ярошенко, А. А. Ховпачев, Д. Т. Сизова, Ю. Д. Илатовская, Г. Ю. Грачева, В. А. Башарин</i>                      | 435 |
| Восстановление нормальной свертываемости крови хитозаном при моделировании гипокоагуляции аспирином<br><i>М. Е. Григорьева, Т. Ю. Оберган, Л. А. Ляпина, Т. А. Шубина</i>                                                                                       | 442 |
| Изменчивость поведения фермерских соболей разного возраста<br><i>Е. Г. Сергеев</i>                                                                                                                                                                              | 450 |
| Влияние низкомолекулярного миметика NGF дипептида ГК-2 на поведение мышей аутбредных линий, различающихся по весу мозга<br><i>О. В. Перепелкина, И. И. Полетаева, П. Ю. Поварнина, Т. А. Гудашева</i>                                                           | 461 |
| Рецензия на книгу: С. В. Островских, О. Н. Быхалова. Земноводные и пресмыкающиеся заповедника “Утриш”. Определитель. Новороссийск: Вариант, 2022. 160 с. ISSN 978-5-6048605-1-9<br><i>В. В. Бобров</i>                                                          | 472 |

---

# Contents

---

**Vol. 144, No. 4, 2024**

---

|                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| In memory of L.V. Toporova<br><i>Editorial Board</i>                                                                                                                                                                                                                        | 363 |
| A Theory of the Evolutionary Role of Hereditary Tumors ( <i>carcino-evo-devo</i> ): The History and the Current State.<br>Part 2. Formation of a Theory in the Monograph “Evolution by Tumor Neofunctionalization”<br><i>A. P. Kozlov</i>                                   | 364 |
| A Theory of the Evolutionary Role of Hereditary Tumors ( <i>carcino-evo-devo</i> ): The History and the Current State.<br>Part 3. The Current State of <i>carcino-evo-devo</i> Theory and Its Relationships with Other Biological Theories<br><i>A. P. Kozlov</i>           | 374 |
| Affinity Anchors: Overview of Popular Tags for Modern Molecular Biology<br><i>P. A. Kryukova, O. I. Kiseleva, I. Yu. Kurbatov, E. V. Poverennaya</i>                                                                                                                        | 402 |
| Molecular Genetic Methods for Detection and Genotyping of Human Sapoviruses (Review)<br><i>A. Yu. Kashnikov, N. V. Epifanova, N. A. Novikova</i>                                                                                                                            | 414 |
| Structural Changes of Lung Tissues in the Dynamics of Inhalation Poisoning with Carbonic Acid Dichlorohydride<br><i>P. A. Torkunov, S. V. Chepur, P. D. Shabanov, A. V. Zemlyanoy, O. V. Torkunova</i>                                                                      | 424 |
| The Effectiveness of Respiratory Support in the Early Period of Intoxication of Rabbits with Products of Thermal Degradation of Fluoroplast-4<br><i>P. G. Tolkach, D. M. Yaroshenko, A. A. Khovpachev, D. T. Sizova, Yu. D. Ilatovskaya, G. U. Gracheva, V. A. Basharin</i> | 435 |
| Restoration of Normal Blood Coagulation with Chitosan in the Simulation of Hypocoagulation with Aspirin<br><i>M. E. Grigorjeva, T. Y. Obergan, L. A. Lyapina, T. A. Shubina</i>                                                                                             | 442 |
| The Variability of the Behavior of Farm Sables of Different Ages<br><i>E. G. Sergeev</i>                                                                                                                                                                                    | 450 |
| The Influence of Low-Molecular NGF Mimetic Dipeptide GK-2 Behavior of Mice from Two Outbred Strains Differing by Brain Weight<br><i>O. V. Perepelkina, I. I. Poletaeva, P. Iu. Povarnina, T. A. Gudasheva</i>                                                               | 461 |
| Book Review: S. V. Ostrovskih, O. N. Byhalova. Amphibians and Reptiles of Nature Reserve “Utrish”. Key. Novorossiysk: Variant, 2022. 160 p. ISSN 978-5-6048605-1-9<br><i>V. V. Bobrov</i>                                                                                   | 472 |

---



**ПАМЯТИ Л.В. ТОПОРОВОЙ**  
**02.07.1939–19.11.2024**

19 ноября 2024 г. ушел из жизни замечательный человек, патриот, талантливый педагог и ученый, лауреат премии Совета Министров СССР, почетный работник высшей школы, почетный профессор академии, доктор сельскохозяйственных наук, гордость Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина Лидия Викторовна Топорова.

Лидия Викторовна родилась 2 июля 1939 г., в 1964 г. успешно окончила зооинженерный факультет Московской ветеринарной академии по специальности “Зоотехния”, ей была присвоена квалификация “Ученый-зоотехник”, в 1967 г. поступила в аспирантуру при кафедре кормления сельскохозяйственных животных. В 1971 г. ей присуждают ученую степень кандидата сельскохозяйственных наук. С этого времени Лидия Викторовна работает старшим научным сотрудником проблемной НИЛ белково-витаминного питания сельскохозяйственных животных, а с 1983 г. она является доцентом кафедры кормления сельскохозяйственных животных.

В 1992 г. Л.В. Топоровой присуждена ученая степень доктора наук, а в 1995 году — ученое звание профессора. Двадцать лет, начиная с 1994 г., Лидия Викторовна возглавляла коллектив кафедры кормления и кормопроизводства, сохраняя и продолжая традиции уникальной научной школы кормления животных, созданной в 1921 г. профессором И.С. Поповым.

Для актуализации последних достижений отечественных и зарубежных ученых были освоены новые подходы в оценке питательной ценности кормов и потребностей высокопродуктивных животных в энергии, питательных и биологически активных веществах, которые нашли отражение в учебных пособиях. Под руководством Л.В. Топоровой разработано более 50 учебно-методических комплексов и программ по дисциплинам, преподаваемым на кафедре, с учетом изменяющихся требований ФГОС Министерства образования и науки РФ.

Лидия Викторовна внесла неоценимый вклад в развитие науки и практики по актуальным вопросам кормления высокопродуктивных сельскохозяйственных животных и

птицы, а также по совершенствованию норм, типов и технологий кормления в целях повышения продуктивности, качества продукции, воспроизводительных функций животных и сроков их использования. Работа с высокопродуктивными животными, импортируемыми из-за рубежа, потребовала принципиально новых подходов к нормированному кормлению. На кафедре с начала двухтысячных годов в комплексе мер по оптимизации кормления животных была разработана новая технология получения отечественных металлопротеиновых соединений.

Л.В. Топорова является автором 349 публикаций, в числе которых научные статьи, учебники и 6 патентов.

Лидия Викторовна длительное время была председателем диссертационного совета по защите докторских диссертаций Д 220.042.03 в Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина, членом диссертационного совета по защите докторских диссертаций Д 006.006.01 ФНЦ “ВНИТИП”, членом диссертационного совета ВНИИ-ПЗиК Д.006.047.01.

Профессор Л.В. Топорова состояла в редакционном совете научных журналов ВАК “Главный зоотехник” и “Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство”, а также с 2004 по 2008 г. была главным редактором журнала “Птицеферма” ИД “Панорама”.

Большое внимание Лидия Викторовна уделяла организации научно-исследовательской деятельности студентов и молодых ученых, являющейся основой формирования и развития кадрового потенциала страны. Ею подготовлены 33 кандидата наук и 2 доктора наук.

*Коллеги, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина, кафедра кормления и кормопроизводства, научная общественность и молодые ученые скорбят о невосполнимой утрате.*

Светлая память о профессоре Л.В. Топоровой, замечательном человеке, руководителе, научном работнике, педагоге и наставнике навсегда сохранится в наших сердцах.

*Редакционная коллегия*

УДК 616-006-056

## ТЕОРИЯ ЭВОЛЮЦИОННОЙ РОЛИ НАСЛЕДУЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ (*CARCINO-EVO-DEVO*): ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ. ЧАСТЬ 2. СТАНОВЛЕНИЕ ТЕОРИИ В КНИГЕ “EVOLUTION BY TUMOR NEOFUNCTIONALIZATION”

© 2024 г. А. П. Козлов<sup>1, 2, 3, \*</sup>

<sup>1</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Биомедицинский центр, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: [contact@biomed.spb.ru](mailto:contact@biomed.spb.ru)

Поступила в редакцию 06.06.2024 г.

После доработки 06.06.2024 г.

Принята к публикации 09.06.2024 г.

В этой части статьи рассматривается становление теории эволюционной роли наследуемых опухолей в книге “Evolution by Tumor Neofunctionalization”. В 2014 г. вышла в свет наша монография “Evolution by Tumor Neofunctionalization”. В монографии обобщены результаты более чем тридцатилетней работы. Она состоит из двенадцати глав и содержит более тысячи ссылок — на порядок больше, чем содержали предыдущие теоретические статьи. Появились новые разделы, которых не было в предыдущих теоретических статьях. Структура книги в основном соответствует современной структуре теории *carcino-evo-devo*. Таким образом, в монографии концепция возможной эволюционной роли опухолей приобретает структуру теории. Книга издана также на русском и китайском языках.

**Ключевые слова:** наследуемые опухоли, *evo-devo*, эволюция путем неофункционализации опухолей

**DOI:** 10.31857/S0042132424040011, **EDN:** PQBKEN

### ВВЕДЕНИЕ

После формулировки основной гипотезы в 1979 г. ее развитие осуществлялось в рамках широкой и целостной концепции возможной эволюционной роли наследуемых опухолей, объединявшей несколько направлений исследования. Результаты этого развития обобщены в монографии “Evolution by Tumor Neofunctionalization” (Kozlov, 2014).

В монографии обобщены результаты более чем тридцатилетней работы. Она содержит двенадцать глав и более тысячи ссылок — на порядок больше, чем содержали предыдущие теоретические статьи. Появились новые разделы, которых не было в предыдущих теоретических статьях. В монографии концепция возможной эволюционной роли опухолей приобрела структуру теории.

Сформировавшаяся структура книги в значительной мере определила современную структуру теории *carcino-evo-devo*.

Книга издана также на русском (Козлов, 2016) и китайском (Kozlov, 2019a) языках.

### СТРУКТУРА И СОДЕРЖАНИЕ МОНОГРАФИИ “EVOLUTION BY TUMOR NEOFUNCTIONALIZATION” (KOZLOV, 2014)

Монография “Evolution by Tumor Neofunctionalization” (Kozlov, 2014) содержит двенадцать глав, обзор книги и заключение.

В главе 1 рассматривается современный подход, синтезирующий идеи эволюционной биологии и наук о здоровье, который дал начало новым направлениям науки — Дарвиновской медицине, эволюционной эпидемиологии и эволюционной онкологии. Важный вывод этой главы: наша теория не находится в силу своей оригинальности в некоторой изоляции, а является частью тенденции развития эволюционной медицины, которая начала реализовываться в конце XX в.

В главе 2 анализируются отношения эволюции и патологии. Приводятся примеры патогенов и патологий, которые могли иметь адаптивную и/или эволюционную значимость.

На примере мутационного процесса формулируется парадокс “эволюция против патологии”, который в дальнейшем будет использован для понимания парадокса эволюционной роли опухолей.

В главе 3 представлены данные о широкой распространенности опухолей среди многоклеточных организмов. В разделе 3.1 обсуждаются особенности опухолей беспозвоночных и рыб, псевдонеоплазмы, пограничные опухолеподобные процессы и истинные злокачественные неоплазмы у беспозвоночных и холоднокровных позвоночных. Делается вывод, что “неоплазия может быть свойством, присущим всем или почти всем многоклеточным”. В разделе 3.2 обсуждаются данные о древнем происхождении и консерватизме клеточных онкогенов и генов — супрессоров опухолевого роста, поддерживающие представление о том, что наличие опухолей характерно для всех многоклеточных организмов. В разделе 3.3 делается вывод, что широкая распространенность опухолей позволяет предполагать их эволюционную значимость.

Глава 4 посвящена свойствам опухолей, которые могли быть использованы в эволюции. К ним отнесены: экспрессия в опухолях большого числа необычных генов; способность опухолевых клеток к дифференцировке с потерей злокачественности; избыточность опухолевых клеточных масс, не являющихся функционально необходимыми организму; структура опухолей как атипичических органов или тканей; морфогенетический потенциал опухолей.

В главе 5 нами впервые рассматривается коэволюция опухолевых процессов и процессов нормального развития — тема, которая является важнейшей составляющей теории *carcino-evo-devo*. Поэтому рассмотрим главу 5 более подробно.

В этой главе шесть разделов.

В разделе 5.1 рассматриваются история вопроса, классическая теория эмбриональных остатков Конгейма и ее варианты; современная теория раковых стволовых клеток; конвергенция опухолевых сигнальных путей и сигнальных путей, связанных с нормальным развитием. Делается вывод о фундаментальной связи опухолей и эмбрионального развития и возможном участии опухолей в эволюции онтогенеза.

В разделе 5.2 анализируются концепции опухолей как болезней дифференцировки. Итогом этого анализа является вывод о динамическом характере взаимосвязи между опухолями и дифференцировкой. Роль функциональной обратной связи оказывается определяющей в дифференцировке опухолей, если этот процесс

происходит, и это могло использоваться в эволюционном происхождении новых клеточных типов, тканей и органов.

Раздел 5.3 посвящен эпителиально-мезенхимальной транзиции (ЭМТ) при нормальном и неопластическом развитии. Собранные вместе представления о раковых стволовых клетках, о раке как болезни дифференцировки, о конвергенции онкогенных и эмбриональных сигнальных путей и об ЭМТ указывают на фундаментальный характер связи между неопластическим и эмбриональным развитием. Эта связь существовала на протяжении всей эволюции многоклеточных и могла играть роль в эволюции онтогенеза.

В разделе 5.4 обсуждаются взаимоотношения между филогенезом и онтогенезом, теория *evo-devo* и примеры возможного участия опухолей в эволюции развития. Метаморфоз морского ежа с участием резервных клеток, имеющих признаки опухолей, в формировании взрослого организма рассматривается как пример девиации по А.Н. Северцову. В настоящее время автор склоняется к интерпретации этого примера как ароморфоза, поскольку имеет место полная перестройка регуляторных сетей.

Относительно поздняя инициация опухолей у взрослых организмов может быть связана с изменениями в онтогенезе путем добавления конечных стадий развития, т. е. с анаболией.

В разделе 5.4 делается следующий вывод: если опухоли действительно участвуют в анаболии, мы можем искать рекапитуляцию некоторых свойств опухолей в эволюционно молодых органах. Таким образом, впервые выдвинута гипотеза о существовании эволюционно новых опухолеподобных органов.

В разделе 5.5 в качестве примера опухолеподобного органа представлен человеческий мозг, у которого имеются многие опухолевые черты. К ним относятся: непропорциональное увеличение в размерах; производство избыточного числа нейронов; опухолеподобная форма некоторых частей мозга; пролонгирование высокой пренатальной скорости роста до периода раннего детства; миграция промежуточных клеток-предшественников; анеуплоидия нейробластов и нейронов. Мобильные генетические элементы L1 перемещаются в развивающихся клетках мозга подобно тому, как они ведут себя в раковых клетках. Для мозга характерен наиболее высокий уровень экспрессии генов. В мозге экспрессируются гены раково-тестикулярных антигенов — СТВ (*cancer/testis/brain*)-гены.

Увеличение размеров мозга в ходе эволюции млекопитающих и приматов связано с действи-

ем многих онкогенов и генов — супрессоров опухолевого роста. Так, делеция у человека тканеспецифического энхансера субвентрикулярной зоны переднего мозга, находящегося вблизи опухолевого супрессорного гена *GADD45G*, коррелирует с увеличением специфических отделов мозга.

Таким образом, человеческий мозг, недавно эволюционировавший орган, обладает многими свойствами опухолей.

В разделе 5.6 собрано значительное число данных об опухолевых свойствах плаценты, которая также является относительно новым органом у млекопитающих. Плацента имеет свойства локальной инвазии и метастазирования; при трансплантации растет как злокачественная опухоль; характеризуется аэробным гликолизом; ДНК плаценты гипометилирована; некоторые раково-тестикулярные антигены экспрессируются в плаценте; плацентарный трофобласт способен создавать большие плоидности.

Опухолевые маркеры включают плацентарные белки. Клетки на инвазивном фронте плаценты претерпевают ЭМТ. Плацента продуцирует ангиогенные факторы.

Таким образом, предсказание об опухолевых свойствах эволюционно молодых органов находит подтверждение на примерах мозга человека и плаценты млекопитающих.

В главе 6 обсуждается вопрос о том, какие опухоли могли играть роль в эволюции. В первую очередь, это наследуемые опухоли. Рассматривается двухударная гипотеза Альфреда Кнадсена, в которой сформулировано представление об опухолевых генах-супрессорах, — одно из первых умозаключений такого рода. Проанализированы мутации гена предрасположенности к раку молочной железы *BRCA1*, а также гены *APC*, *PTEN*, *LKB1* и гены репарации, мутации в которых приводят к различным типам опухолей. При этом некоторые опухоли являются доброкачественными, что представляет особый интерес для нашей теории. Обсуждается генетическая предрасположенность к опухолям у рыб и в инбредных линиях лабораторных животных. Делается вывод о возможности участия популяций животных-опухоленосителей в эволюции.

Далее разбираются эмбриональные и детские опухоли, особенности которых могут использоваться в эволюции онтогенеза, в частности путем добавления конечных стадий развития (анаболии); доброкачественные опухоли, карциномы *in situ* и так называемые псевдоболести — опухоли, выявляемые при скрининге; опухоли на ранних и промежуточных стадиях прогрессии; опу-

холи, подвергающиеся спонтанной регрессии; опухоли с устойчивой массой. Все эти типы опухолей могли предоставлять дополнительный клеточный материал для эволюции многоклеточных организмов.

В этой главе также обсуждаются механизмы, способные поддерживать избыточную опухолевую клеточную массу в состоянии равновесия до тех пор, пока она, согласно основной гипотезе, не дифференцируется и не приобретет функцию в организме.

В главе 7 представлены примеры опухолей, которые уже сыграли определенную роль в эволюции. К ним автор отнес азотфиксирующие клубеньки бобовых растений; меланоматозные клетки и макромеланофоры меченосцев *Xiphophorus*; так называемые шапочки у золотых рыбок; злокачественный папилломатоз и симбиотические ворсинки в желудке полевок. Во всех этих примерах возникновение новых органов или типов клеток из опухолей связано с приобретением новых функций.

Особенно подробно разбирается плацента млекопитающих как эволюционно молодой орган. Обсуждается происхождение плаценты в результате ретровирусной инфекции у предков млекопитающих. Приводится большое число опухолевых признаков плаценты, в том числе способность к инвазии и метастазированию. Возникает вопрос: чем плацента отличается от опухоли? Ответом на этот вопрос является мощная негативная регуляция пролиферации, миграции и инвазии клеток плаценты со стороны децидуальной оболочки матки, в которой участвует трансформирующий фактор роста TGF- $\beta$ . Таким образом, плацента является регулируемой опухолью.

Все приведенные примеры — эволюционно молодые образования. Примечательно, что в трех из обсуждающихся в главе случаях: клубеньков бобовых, макромеланофор меченосцев и плаценты — неофункционализация опухолей связана с эволюционно новыми генами.

В заключении главы 7 парадокс “эволюция против патологии”, сформулированный ранее в главе 2 для мутаций, распространяется на опухоли. С одной стороны, опухолевые процессы могут приводить к злокачественным новообразованиям. С другой стороны, опухолевые процессы дают дополнительные клеточные массы с высоким биосинтетическим потенциалом, которые могут быть использованы в прогрессивной эволюции для происхождения новых типов клеток, тканей и органов, если организмы-опухоленосители живут достаточно долго, чтобы оставить потомство.

Поскольку в основной гипотезе эволюционной роли наследуемых опухолей используется

представление об эволюционно новых генах, в главе 8 рассматриваются общие принципы и молекулярные механизмы их происхождения. При этом подразумевается, что эволюционно новые гены происходят в ДНК зародышевых клеток, а не в клетках опухолей, что определяет их передачу потомству.

Эволюционно новые гены могут происходить из предсуществующих генов или *de novo*. Дупликация генов, перестановка экзонов и происхождение *de novo* — наиболее фундаментальные способы происхождения новых генов. Транспозоны и эндогенные ретровирусы также участвуют в происхождении генов и в эволюции генома. На каждый из основных способов происхождения генов приходится по несколько молекулярных механизмов, участвующих в этом процессе. Считается, что дупликация генов, особенно дупликация полных геномов, являлась основным фактором, определившим эволюцию сложности и происхождение эволюционных инноваций. В этой главе также рассматривается происхождение семейств генов и генов некодирующих РНК. В заключение делается вывод: происхождение эволюционно новых генов — частый, широко распространенный и продолжающийся эволюционный процесс.

В главе 9 обсуждается эволюция новых функций и структурной сложности у многоклеточных организмов и связь этих процессов с возникновением эволюционно новых генов. Глава состоит из двух разделов.

Раздел 9.1 рассказывает о приобретении эволюционно новыми генами новых и измененных функций. Различные механизмы образования генов: дупликация генов, перетасовка экзонов и возникновение *de novo* — соотносятся с несколько отличными путями приобретения новых функций.

Эволюция дублированных генов может быть связана с неофункционализацией — возникновением абсолютно новых функций, а также с субфункционализацией, когда каждый из двух генов сохраняет лишь часть своих изначальных функций. Термином “субнеофункционализация” обозначают ситуации, когда вслед за субфункционализацией идет процесс неофункционализации.

Очевидно, что перетасовка экзонов приводит к образованию новых комбинаций уже существующих функций. Это сыграло важную роль в эволюции модулярных белков, участвующих в клеточных коммуникациях у многоклеточных организмов. У многоклеточных к новым можно отнести функции, связанные с межклеточным взаимодействием и адгезией. Существуют гены

и белки, участвующие в адгезии клеток и в клеточных взаимодействиях, которые происходят в линии вторичноротых/хордовых и у позвоночных.

Химерные или слитые (*fusion*) гены обретают новые функции вследствие наличия у них значительных структурных различий в сравнении с предковыми генами. В эволюции химерных генов быстрый отход от предковых функций (неофункционализация) может рассматриваться как наиболее значимый феномен.

Гены, возникшие *de novo*, должны иметь некоторые новые, ранее не существовавшие функции. Эти функции предположительно могут быть связаны с развитием или конечной дифференцировкой. Это заключение согласуется с результатами, которые показывают, что более поздние стадии онтогенеза характеризуются экспрессией эволюционно новых генов.

Таким образом, возникновение и эволюция новых генов связаны с возникновением и эволюцией новых молекулярных и организменных функций. Если новые функции выгодны организму, естественный отбор будет поддерживать и усиливать такие новые функции.

Раздел 9.2 дает представление об эволюционно новых генах, о появлении эволюционных инноваций и морфологических новшеств у многоклеточных организмов.

В ходе эволюции число клеточных типов у многоклеточных организмов непрерывно возрастает. Число типов дифференцированных клеток в многоклеточном организме — один из важнейших показателей его сложности. Например, человеческий организм имеет 411 различных типов специализированных клеток. Насчитывается до 479 морфологических признаков, которые могут служить показателями морфологической сложности позвоночных. Первые инновации такого рода произошли у хордовых. Другие прогрессивные признаки приобретены позднее в ходе эволюции челюстноротых позвоночных.

Многие авторы связывают эволюционные новшества и увеличение морфологической сложности у позвоночных с увеличением размеров генома и числа генов за счет их дупликации. Семейства генов, увеличивающиеся вследствие генной дупликации у позвоночных, кодируют факторы транскрипции, сигнальные молекулы, структурные белки и ферменты. Развитие различных органов и общего строения организмов (*body plan*) сопряжено с возникновением и расширением соответствующих семейств генов. Так, большее число генов *Notch* и их кластеров, увеличение сложности организации кластеров и усиление регуляции были важными

факторами для увеличения сложности и адаптивной эволюции позвоночных.

Многие гены, экспрессирующиеся в нервном валике (neural crest) зародыша, являются инновационными для позвоночных. Эти новые гены возникли либо вследствие дивергенции генов после дупликации, либо путем эволюции *de novo*. Они ассоциированы с появлением новых молекулярных и клеточных функций и с тканями, которые считаются инновациями позвоночных.

Дупликации всего генома (whole genome duplications, WGDs) могут быть связаны с увеличением морфологической сложности. Два цикла геномной дупликации у предшественников позвоночных сопровождалась появлением важных морфологических инноваций, таких как усовершенствованные нервная, эндокринная и кровеносная системы и органы чувств; более сложный мозг; череп, позвоночник, эндоскелет и зубы; у челюстноротых позвоночных — парные конечности, шарнирно-сочлененные челюсти и адаптивная иммунная система. Многие авторы считают, что дупликации всего генома, хотя они и являются достаточно редкими в эволюции, привели к увеличению биологической сложности и появлению эволюционных инноваций.

Корреляция появления филогенетических различий на поздних стадиях онтогенеза с экспрессией эволюционно новых генов и другие данные, обсужденные выше, подтверждают роль новых генов в возникновении эволюционных морфологических инноваций.

Ученые, изучающие возникновение новых генов, обычно не задаются вопросом, где эти гены могут быть экспрессированы. Предполагается, что новые гены вполне могут экспрессироваться в предсуществующих клетках или что в организме автоматически образуются дополнительные клетки в количествах, достаточных для экспрессии новых генов и для их новых функций. Однако существуют отношения конкуренции и несовместимости между генами, что нарушает вышеупомянутый сценарий. Экспрессия новых генов в той же клетке может вызвать энергетические трудности и быть селективно невыгодной.

Трудно представить, что процесс возникновения эволюционно новых генов сопровождался адекватным увеличением числа клеток, и имеются экспериментальные данные против этого. Скорее, некие автономные клеточные пролиферативные процессы (опухоли) были использованы в качестве резервуара для экспрессии новых генов. Возможно, возникновение новых клеточных типов является результатом совпадения относительно независимых процессов на различных структурных уровнях (на уровне

генов, клеток и клеточных масс) и дальнейшего замораживания значимых совпадений посредством отбора. Таким образом, опухоли, подобно процессам дупликации и ретротранспозиции генов, участвующим в эволюции генома, могут поставлять исходный материал для возникновения эволюционных инноваций и новых морфологических структур.

Глава 10 целиком посвящена концепции эволюционной роли наследуемых опухолей. В этой главе четко обособилась основная гипотеза — гипотеза эволюции путем неофункционализации опухолей: она сформулирована в компактном виде в самом начале — в разделе 10.1:

“Tumors are the source of extra cell masses, which may be used in the evolution of multicellular organisms for the expression of evolutionarily new genes, for the origin of new differentiated cell types with novel functions and for building new structures, which constitute evolutionary innovations and morphological novelties.

Hereditary tumors may play an evolutionary role by providing conditions (space and resources) for the expression of genes newly evolving in the DNA of germ cells. As a result of expression of novel genes, tumor cells may acquire new functions and differentiate in new directions, which may lead to the origin of new cell types, tissues and organs. The new cell type is inherited in progeny generations due to genetic and epigenetic mechanisms similar to those for pre-existing cell types” (Kozlov, 2014, p. 109).

Для правильного понимания основной гипотезы существенно отметить, что в книге обсуждается также экспрессия в опухолях эволюционно новых сочетаний генов.

Так, в разделе 9.1 пишется следующее: “Novel combinations of interacting genes may participate in the origin of new functions, which may arise in multidimensional networks of functional interactions, such as the protein-protein interactions” (p. 92).

А в разделе 10.13 отмечено: “...Tumors could be regarded as unstable transitory search organs for innovations and expression of evolutionarily novel genes and new combinations of expressed genes, which are not possible in established organs...” (p. 128).

Таким образом, в книге достигается компромисс между генетической теорией морфологической эволюции (King, Wilson, 1975) и теорией эволюции путем дупликации генов (Ohno, 1970).

Другие аспекты концепции эволюционной роли наследуемых опухолей проанализированы в последующих разделах главы (разделы 10.2–10.13).

Детально рассматриваются следующие вопросы: конкуренция генов и возможная эволюционная роль опухолей (10.2); возможная эволюционная роль клеточных онкогенов (10.3); происхождение обратных связей, регулирующих новые функции, экспрессию новых генов и пролиферацию новых типов клеток (10.4); наследование новых клеточных типов у потомства (10.5); популяции организмов-опухоленосителей с наследуемыми опухолями как переходные формы между видами организмов на разных ступенях прогрессивной эволюции (10.6); теория “замороженного случая” и происхождение новых клеточных типов/тканей/органов (10.7); экспрессия эволюционно новых генов в опухолях и возникновение новых организменных функций генов (10.8); опухоли и ранняя эволюция многоклеточных (10.9); необходимость для эволюции многоклеточных организмов постоянного снабжения дополнительными клеточными массами (10.10); неадаптивное происхождение сложности (10.11); опухоли и сложность (10.12); опухоли как поисковый механизм для инноваций и новых молекулярных комбинаций (10.13).

Рассмотрение всех этих аспектов показало, что сценарий, описываемый концепцией эволюционной роли наследуемых опухолей, осуществим в плане возможных механизмов его реализации и не противоречит существующим биологическим теориям.

Среди различных аспектов концепции эволюционной роли наследуемых опухолей одним из наиболее важных вопросов является наследуемость новых клеточных типов в поколениях организмов. Наследуемость новых клеточных типов обусловлена возникновением эволюционно новых генов в ДНК зародышевой плазмы; наследуемой природой опухолей, в которых экспрессируются эволюционно новые гены; эпигенетическим наследованием паттернов экспрессии генов. Таким образом, новые клеточные типы наследуются благодаря генетическим и эпигенетическим механизмам, сходным с механизмами наследования уже существующих клеточных типов.

Глава 11 посвящена анализу экспериментальных подтверждений нетривиальных предсказаний. Поскольку соответствующие работы подробно рассматривались в первой части статьи, мы не будем здесь на них останавливаться. Важно отметить, что в этой главе впервые сделано обобщение о существовании феномена опухолеспецифической экспрессии эволюционно новых генов. Впервые эти гены были названы *TSEEN*-генами (tumor specifically expressed, evolutionarily novel genes).

Глава 11 намечает пути дальнейших экспериментальных исследований.

В главе 12 представлены дополнительные свидетельства в пользу концепции положительной эволюционной роли опухолей и гипотезы эволюции путем неофункционализации опухолей.

Эти свидетельства включают:

- позитивный отбор многих генов, экспрессирующихся преимущественно в опухолях человека, в линии приматов;

- дополнительные сведения об эволюционно новых генах человека, экспрессирующихся преимущественно в опухолях, включая данные о дифференциальной экспрессии эндогенных ретровирусов человека;

- данные об экспрессии эволюционно новых генов в плаценте, опухолеподобном органе.

Отдельный раздел этой главы посвящен отбору, направленному против опухолей (anti-cancer selection), который может быть связан с ограничениями развития и эволюционными ограничениями.

Делается вывод, что все содержание этой книги, включая результаты наших собственных экспериментов, поддерживает концепцию позитивной роли опухолей в эволюции и гипотезу эволюции путем неофункционализации опухолей.

В главе 13 содержится краткий обзор книги.

В Заключении книги концепция положительной эволюционной роли опухолей впервые названа теорией: “Теория положительной эволюционной роли опухолей в качестве новой научной парадигмы может значительно расширить наши представления о природе опухолей и о возможностях влияния на опухолевые процессы”. Таким образом, в монографии (Kozlov, 2014) концепция эволюционной роли наследуемых опухолей превратилась в новую биологическую теорию.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ: РОЛЬ МОНОГРАФИИ “EVOLUTION BY TUMOR NEOFUNCTIONALIZATION” В СТАНОВЛЕНИИ НОВОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕОРИИ

Содержание и структура монографии “Evolution by Tumor Neofunctionalization” (Kozlov, 2014) соответствуют существующим представлениям о научной теории, поэтому выход в свет монографии ознаменовал переход концепции эволюционной роли опухолей в ранг теории.

В монографии обобщены результаты более чем тридцатилетней работы. Появились новые разделы, которых не было в предыдущих теоретических статьях (разделы, посвященные коэволюции опухолей и нормального развития; раздел, содержащий анализ принципов и ме-

ханизмов возникновения эволюционно новых генов; раздел, освещающий происхождение эволюционно новых функций; раздел, посвященный подтверждению нетривиальных предсказаний; некоторые нетривиальные объяснения).

Как показано в первой части статьи, основная гипотеза сформулирована, исходя из более общих принципов. Затем она развивалась в составе более общей концепции на основе имеющихся биологических данных. В книге основная гипотеза получила название “эволюция путем неофункционализации опухолей”, чтобы подчеркнуть преемственность с книгой “Эволюция путем дупликации генов” (Ohno, 1970).

В книге произошел переход от концепции к теории. Она содержит более тысячи ссылок — на порядок больше, чем наши предшествовавшие теоретические статьи, т. е. объем систематизированных данных значительно увеличился. Структура книги очень усложнилась по сравнению со структурой предшествовавших теоретических статей. Это очевидно из оглавления книги (см. Приложение). В книге содержатся доказательства нетривиальных предсказаний и нетривиальные объяснения некоторых необъясненных ранее биологических феноменов.

Таким образом, в монографии концепция эволюционной роли наследуемых опухолей впервые приобрела структуру и другие признаки теории. В заглавии нашей следующей теоретической статьи (Kozlov, 2019b) твердо стоят слова “новая теория”.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность эволюционной школе Санкт-Петербургского государственного университета, онкологической школе НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, Национальному онкологическому институту США (National Cancer Institute, National Institutes of Health, USA), Санкт-Петербургскому Биомедицинско-

му центру, Санкт-Петербургскому политехническому университету Петра Великого и Институту общей генетики им. Н.И. Вавилова.

### 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

- Kozlov A.P. Эволюция путем неофункционализации опухолей. Новообразования как фактор прогрессивной эволюции. СПб.: Изд-во Политехнического университета, 2016. 263 с.
- King M.C., Wilson A.C. Evolution at two levels in humans and chimpanzees // Science. 1975. V. 188. P. 107–116.
- Kozlov A.P. Evolution by tumor neofunctionalization: the role of tumors in the origin of new cell types, tissues and organs. Boston: Elsevier–Acad. Press, 2014. 248 p.
- Kozlov A.P. Evolution by tumor neofunctionalization: the role of tumors in the origin of new cell types, tissues and organs. Beijing, China: China Sci. Publ. & Media Ltd., 2019a. 200 p.
- Kozlov A.P. The role of heritable tumors in evolution of development: a new theory of *carcino-evo-devo* // Acta Naturae. 2019b. V. 11 (4). P. 65–72.
- Ohno S. Evolution by gene duplication. N.Y.: Springer-Verlag, 1970. 150 p.

### ПРИЛОЖЕНИЕ

#### ОГЛАВЛЕНИЕ

Благодарность

Вступление

1. Современный синтез эволюционной биологии и наук о здоровье

2. Эволюция и патология

2.1. Патогены и патологии могут иметь адаптивную и/или эволюционную значимость

2.2. Парадокс “эволюция против патологии”

3. Широкая распространенность опухолей у многоклеточных организмов

3.1. Сравнительные данные по распространенности опухолей у различных групп многоклеточных организмов

3.2. Древнее происхождение и консерватизм клеточных онкогенов и опухолевых генов-супрессоров

3.3. Широкая распространенность опухолей позволяет предполагать их эволюционную значимость

4. Свойства опухолей, которые могли быть использованы в эволюции

4.1. Необычные гены и группы генов активируются в опухолях и могут участвовать в происхождении новых клеточных типов

4.2. Опухолевые клетки могут дифференцироваться с потерей злокачественности, что может приводить к образованию новых клеточных типов

4.3. Опухоли предоставляют избыточные клеточные массы, не являющиеся функционально необходимыми для организма, которые могли быть использованы в эволюции для образования новых клеточных типов, тканей и органов

4.4. Опухоли как атипичные органы/ткани, которые с течением времени могут преобразоваться в нормальные структуры

4.4.1. Морфогенетический потенциал опухолей мог использоваться в эволюции для возникновения морфологических инноваций

5. Опухоли могли участвовать в эволюции онтогенеза

5.1. Опухоли и нормальный эмбриогенез

5.2. Опухоли как болезни дифференцировки клеток

5.3. Эпителиально-мезенхимальная транзикация происходит при нормальном и неопластическом развитии

5.4. Опухоли, *evo-devo* и добавление конечных стадий в эволюции онтогенеза

5.5. Человеческий мозг как недавно эволюционировавший орган обладает многими свойствами, напоминающими свойства опухолей

5.5.1. Увеличение размера мозга в ходе эволюции млекопитающих и приматов вызвано действием многих протоонкогенов и генов — опухолевых супрессоров

5.5.2. Кора головного мозга человека как результат отбора по опухолевому росту

5.5.3. Увеличение мозга, гены микроцефалии и опухоли

5.5.3.1. *MCPH1* — это ген — супрессор опухолевого роста, взаимосвязанный с другим опухолевым геном-супрессором — *BRCA1*

5.5.3.2. Ген *ASPM* является основной детерминантой размеров коры головного мозга человека и обладает повышенной экспрессией в опухолях и семенниках

5.5.4. Длительная экспансия нервных стволовых клеток ведет к образованию опухолей мозга

5.6. Плацента является эволюционной инновацией и повторяет многие свойства опухолей

6. Опухоли, которые могли играть роль в эволюции

6.1. Наследуемые опухоли

6.2. Эмбриональные и детские опухоли

6.3. Доброкачественные опухоли, карциномы *in situ* и псевдоболести

6.4. Опухоли на ранних и промежуточных стадиях прогрессии

6.5. Спонтанно регрессирующие опухоли

6.6. Опухоли с устойчивой массой

7. Опухоли, которые сыграли роль в эволюции

7.1. Азотфиксирующие клубеньки бобовых растений

7.2. Меланоматозные клетки и макромеланофоры рыб *Xiphophorus*

7.3. Шапочка золотой рыбки — искусственно отобранная опухоль

7.4. Злокачественный папилломатоз и симбиотические ворсинки в желудке полевок

7.5. Плацента — регулируемая опухоль

7.6. Парадокс “эволюция против патологии” может также существовать для опухолей

8. Общие принципы и молекулярные механизмы происхождения новых генов

- 8.1. Дупликация генов
  - 8.1.1. Молекулярные механизмы дупликации генов
- 8.2. Перестановка экзонов
  - 8.2.1. Молекулярные механизмы перестановки экзонов
- 8.3. Происхождение генов *de novo*
  - 8.3.1. Молекулярные механизмы происхождения генов *de novo*
- 8.4. Роль транспозонов в возникновении генов
- 8.5. Возникновение мультигенных семейств
- 8.6. Возникновение генов некодирующих РНК
- 8.7. Возникновение эволюционно новых генов является широко распространенным и продолжающимся процессом
- 9. Происхождение эволюционно новых генов и эволюция новых функций и структурной сложности у многоклеточных организмов
  - 9.1. Новые и измененные функции эволюционно новых генов
    - 9.1.1. Адаптивная эволюция и позитивная селекция новых генов
    - 9.1.2. Гены-сироты или таксономически ограниченные гены
    - 9.1.3. Роль экспрессии в происхождении и эволюции новых генов и их функций
  - 9.2. Эволюционно новые гены и появление эволюционных инноваций и морфологических новшеств у многоклеточных организмов
    - 9.2.1. Где экспрессируются новые гены, и откуда берутся клетки, дающие начало эволюционным инновациям и морфологическим новшествам?
    - 9.2.2. Подобно генной дупликации и ретротранспозиции, опухоли могут давать исходный материал для эволюции сложности
- 10. Происхождение новых типов клеток, тканей и органов путем неофункционализации опухолей
  - 10.1. Гипотеза эволюции путем неофункционализации опухолей
  - 10.2. Конкуренция генов и возможная эволюционная роль опухолей
  - 10.3. Возможная эволюционная роль клеточных онкогенов
  - 10.4. Происхождение обратных связей, регулирующих новые функции, экспрессию новых генов и пролиферацию новых типов клеток
  - 10.5. Как новые типы клеток наследуются в поколениях потомков?
  - 10.6. Организмы-опухоленосители как переходные формы в эволюции
    - 10.6.1. Морфологические новшества, ограничения развития и опухоли
  - 10.7. Теорию замороженного случая можно применить к происхождению новых типов клеток/тканей/органов
  - 10.8. Обеспечивая возможность экспрессии возникающих эволюционно новых генов, опухоли также способствуют появлению новых организменных функций генов
  - 10.9. Опухоли и ранняя эволюция многоклеточных
  - 10.10. Необходимость непрерывного снабжения дополнительными клеточными массами в процессе эволюции
  - 10.11. Неадаптивное происхождение организменной сложности
  - 10.12. Опухоли и сложность: что раньше?
  - 10.13. Опухоли как поисковый механизм инноваций и новых молекулярных комбинаций
- 11. Экспериментальное подтверждение нетривиальных предсказаний гипотезы эволюции путем неофункционализации опухолей
  - 11.1. Эволюционно молодые и новые гены экспрессируются в опухолях
    - 11.1.1. Анализ эволюционной новизны опухолеспецифически экспрессирующихся последовательностей EST
    - 11.1.2. *ELFNI-ASI*, новый ген приматов с возможной функцией микроРНК, экспрессируется преимущественно в опухолях

- 11.1.3. *PBOV1*: недавно возникший *de novo* ген человека с высокой опухолевой специфичностью экспрессии
- 11.1.4. Эволюционная новизна генов раково-тестикулярных антигенов человека
  - 11.1.4.1. Класс генов раково-тестикулярных антигенов
  - 11.1.4.2. Результаты изучения *in silico* эволюционной новизны генов раково-тестикулярных антигенов
- 11.1.5. Феномен опухолеспецифической экспрессии эволюционно новых (*TSEEN*) генов, или *carcino-evo-devo*
- 11.2. Искусственный отбор опухолей
  - 11.2.1. Шапочка золотых рыбок является доброкачественной опухолью
  - 11.2.2. Шапочка золотых рыбок является искусственно отобранной доброкачественной опухолью
- 12. Дополнительные свидетельства в пользу положительной эволюционной роли опухолей и гипотезы эволюции путем неофункционализации опухолей
  - 12.1. Позитивный отбор многих генов, экспрессирующихся преимущественно в опухолях, в линии приматов
  - 12.2. Еще об эволюционно новых генах, экспрессирующихся в опухолях
  - 12.3. Экспрессия множества эволюционно новых генов в плаценте — опухолеподобном органе
  - 12.4. Отбор, направленный против опухолей (*anti-cancer selection*), может быть связан с ограничениями развития и эволюционными ограничениями
- 13. Обзор книги
- 14. Заключение
- 15. Список литературы

## **A Theory of the Evolutionary Role of Hereditary Tumors (*carcino-evo-devo*): The History and the Current State. Part 2. Formation of a Theory in the Monograph “Evolution by Tumor Neofunctionalization”**

**A. P. Kozlov** <sup>a, b, c, \*</sup>

<sup>a</sup>*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

<sup>b</sup>*Biomedical Center, St. Petersburg, Russia*

<sup>c</sup>*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: contact@biomed.spb.ru*

In this part of the article, the formation of a theory of the evolutionary role of hereditary tumors (*carcino-evo-devo*) in the monograph “Evolution by Tumor Neofunctionalization” is discussed. In 2014 our monograph “Evolution by Tumor Neofunctionalization” Elsevier Academic Press. The monograph generalized the results of thirty years of work. It contained twelve chapters and over one thousand references — an order of magnitude more than in previous theoretical papers. New chapters appeared as compared to previous papers. The structure of the book corresponds to the current structure of the *carcino-evo-devo* theory. Thus, in the monograph the concept of the possible evolutionary role of hereditary tumors acquired the structure of the theory. The monograph was later published in Russian and Chinese.

**Keywords:** hereditary tumors, *evo-devo*, evolution by tumor neofunctionalization

УДК 616-006-056

## ТЕОРИЯ ЭВОЛЮЦИОННОЙ РОЛИ НАСЛЕДУЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ (CARCINO-EVO-DEVO): ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ. ЧАСТЬ 3. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ТЕОРИИ CARCINO-EVO-DEVO И ЕЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ С ДРУГИМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ НАУКАМИ

© 2024 г. А. П. Козлов<sup>1, 2, 3, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Биомедицинский центр, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: [contact@biomed.spb.ru](mailto:contact@biomed.spb.ru)

Поступила в редакцию 06.06.2024 г.

После доработки 06.06.2024 г.

Принята к публикации 09.06.2024 г.

После выхода в свет монографии “Evolution by Tumor Neofunctionalization” теория эволюционной роли наследуемых опухолей продолжала развиваться в наших последующих работах, в которых приобрела свой современный вид. В этой части статьи рассматривается современное состояние теории эволюционной роли наследуемых опухолей (*carcino-evo-devo*) и ее взаимоотношения с другими биологическими науками.

**Ключевые слова:** наследуемые опухоли, прогрессивная эволюция, *carcinoembryonic*, *evo-devo*, теория *carcino-evo-devo*

DOI: 10.31857/S0042132424040024, EDN: PPYMQT

### ВВЕДЕНИЕ

Годы после выхода книги (Kozlov, 2014) были посвящены дальнейшей разработке теории. В статье (Kozlov, 2019a) впервые проанализированы нетривиальные объяснения нашей теории и ее отношения с другими биологическими теориями. В этой статье теория эволюционной роли наследуемых опухолей названа теорией *carcino-evo-devo*.

Мы занимались дальнейшим описанием предсказанного нами нового класса *TSEEN*-генов (Круковская и др., 2016; Козлов и др., 2021; Kozlov, 2016) и подтверждением других нетривиальных предсказаний теории (Makashov et al., 2019; Matyunina et al., 2019). Данные, полученные в статье (Matyunina et al., 2019), можно рассматривать как прямое доказательство основной гипотезы. В статье (Kozlov, 2022d) обобщены результаты экспериментального подтверждения нескольких нетривиальных предсказаний теории.

Нами разработано учение об эволюционно молодых опухолеподобных органах (Kozlov, 2019a, 2022a, 2022b, 2023a). Мы сформулиро-

вали нетривиальное предсказание об опухолеподобии процесса ожирения (Kozlov, 2022b) и получили подтверждающие это предсказание результаты об экспрессии *TSEEN*-генов в образцах висцеральной жировой ткани пациентов с крайними формами ожирения (Акулова и др., 2023a, 2023b). Обобщение нетривиальных объяснений теории содержится в статье (Kozlov, 2023a).

В выступлениях автора на многих конференциях совершенствовалась структура теории *carcino-evo-devo*. Теория *carcino-evo-devo* приобрела все более завершённый вид.

Ниже мы рассмотрим современное состояние теории и ее взаимоотношения с другими биологическими теориями более подробно.

### СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ТЕОРИИ ЭВОЛЮЦИОННОЙ РОЛИ НАСЛЕДУЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ, ИЛИ ТЕОРИИ CARCINO-EVO-DEVO

Теория эволюционной роли наследуемых опухолей, или теория *carcino-evo-devo*, разработана автором в серии публикаций (Козлов, 1976,

1983, 1987, 1988, 2008, 2011, 2022, 2023; Kozlov, 1979, 1996, 2010, 2014, 2019a, 2022a–d, 2023a, 2023b) и в монографии, изданной на английском (Kozlov, 2014), русском (Козлов, 2016) и китайском (Kozlov, 2019b) языках академическими научными издательствами. Опубликована также серия статей, посвященных подтверждению нетривиальных предсказаний теории. Их мы будем рассматривать ниже.

Мы используем следующую терминологию.

Основную гипотезу нашей теории мы назвали гипотезой эволюции путем неофункционализации опухолей (Kozlov, 2014), а саму теорию мы назвали теорией эволюционной роли наследуемых опухолей, или теорией *carcino-evo-devo* (Козлов, 2023; Kozlov, 2019a, 2023a).

Теория *carcino-evo-devo* состоит из нескольких взаимосвязанных разделов (табл. 1).

Ниже мы рассмотрим разделы теории *carcino-evo-devo* в последовательности, представленной в табл. 1, — с первого по девятый разделы. Новые разделы теории будут рассмотрены в следующей части статьи.

#### *1. Истоки и предшественники теории эволюционной роли опухолей*

Понятие *carcino-evo-devo* происходит из понятий *carcinoembryonic* и *evo-devo*, уже имеющих распространение в научной литературе. Термин *carcino-evo-devo* впервые появился в нашей монографии (Kozlov, 2014), а для обозначения те-

рии эволюционной роли опухолей впервые использован в статье (Kozlov, 2019a).

Термин *carcinoembryonic* используется для обозначения эмбриональных белков, продуцируемых опухолевыми клетками. Первые примеры таких белков — альфа-фетопротеин (Абелев и др., 1963; Татаринцев, 1964a–в; Abelev et al., 1963) и раково-эмбриональный антиген (Gold, Freedman, 1965). Представления о раково-эмбриональных белках получили свое дальнейшее развитие в представлениях о конвергенции эмбриональных и опухолевых сигнальных путей (Topczewska et al., 2006; Hendrix, Lurie, 2007; Hendrix et al., 2007; Hnisz et al., 2015). Обе концепции указывают на взаимосвязь эмбриональных и опухолевых процессов.

Сокращение *evo-devo* обозначает эволюционную биологию развития, которая изучает взаимосвязь индивидуального развития и эволюции (Gould, 1977a; Hall, 2003). Представления о закономерностях эволюции онтогенеза восходят к работам выдающегося отечественного ученого А.Н. Северцова, разработавшего теорию филэмбриогенезов (Северцов, 1939).

Теория *carcino-evo-devo* описывает взаимосвязи эволюционного, индивидуального и неопластического развития в рамках единого подхода. Эта теория рассматривает роль наследуемых опухолей в эволюции развития. Другими подходящими названиями теории могли бы также быть *onco-evo-devo* или *tumor-evo-devo*.

**Таблица 1.** Структура теории *carcino-evo-devo*

| Структура теории <i>carcino-evo-devo</i> |                                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I                                        | Истоки и предшественники теории эволюционной роли опухолей                                                                                                           |
| II                                       | Эволюционный подход к наукам о здоровье и болезнях                                                                                                                   |
| III                                      | Биологические предпосылки теории эволюционной роли опухолей                                                                                                          |
| IV                                       | Гипотеза эволюции путем неофункционализации наследуемых опухолей (основная гипотеза)                                                                                 |
| V                                        | Нетривиальные предсказания теории и результаты их экспериментального подтверждения                                                                                   |
| VI                                       | Нетривиальные объяснения необъясненных ранее биологических феноменов, которые предлагает новая теория, и анализ ее взаимоотношений с другими биологическими теориями |
| VII                                      | Основные положения теории <i>carcino-evo-devo</i>                                                                                                                    |
| VIII                                     | Перспективы новых технологий на основе теории <i>carcino-evo-devo</i>                                                                                                |
| IX                                       | Значение теории <i>carcino-evo-devo</i> для медицины и здравоохранения                                                                                               |
| Новые разделы теории                     |                                                                                                                                                                      |
| X                                        | Роль опухолей как поисковиков в пространстве биологических возможностей, участие опухолей в биологических компьютерных процессах                                     |
| XI                                       | Принцип увеличения сложности                                                                                                                                         |
| XII                                      | Диаграммы <i>carcino-evo-devo</i> . Формула увеличения сложности                                                                                                     |

Доказательства участия опухолей в эволюции онтогенеза подробно анализируются в работах (Kozlov, 2014, 2019a). Они являются важной составной частью нашей теории.

Теориями, предшествовавшими теории *carcino-evo-devo*, являются теория эмбриональных остатков (“embryonal rest” or “embryonal remnants” theory of cancer) (Durante, 1874; Cohnheim, 1877, 1889); морфологические законы эволюции онтогенеза, открытые А.Н. Северцовым (Северцов, 1939); представление об опухолях как болезни дифференцировки (Markert, 1968).

К предшественникам нашей теории можно отнести представления о роли в прогрессивной эволюции “перспективных монстров” (Шимкевич, 1909; Goldschmidt, 1940; Gould, 1977b, 1980) и о роли вирусов в эволюции (Anderson, 1970). Сравнительная онкология существует с XIX в. (Kozlov, 2014). Ее также следует отнести к предшественникам нашей теории.

Важнейшим предшественником нашей теории является теория С. Оно о генетических механизмах прогрессивной эволюции, или эволюция путем дупликации генов (Ohno, 1970). Наша теория начинается там, где заканчивается теория С. Оно, которая не объясняет, в каких именно клетках экспрессируются эволюционно новые гены, определяющие эволюционные инновации и морфологические новшества. Объясняя, откуда берутся дополнительные клеточные массы для экспрессии эволюционно новых генов и сочетаний генов, наша теория вступает в complementary отношения с теорией С. Оно.

В свое время сильное влияние на автора оказала книга “Предмет и взаимосвязь естественных наук” (Кедров, 1967). Учение об уровнях организации материи, изложенное в этой книге, использовалось автором для формулировки принципа генной конкуренции в ранних работах (Козлов, 1976, 1983; Kozlov, 1979) и в последних работах, посвященных принципу увеличения сложности (Kozlov, 2022c, 2023b, 2024).

## II. Эволюционный подход к наукам о здоровье и болезнях

Эволюционный подход к наукам о здоровье и болезнях в основном сформировался в конце XX в. и подробно рассматривался в монографии автора (Kozlov, 2014). Теория *carcino-evo-devo* развивалась параллельно с Дарвиновской медициной (Williams, Nesse, 1991), эволюционной эпидемиологией (Ewald, 1994) и несколькими направлениями эволюционной онкологии (Cairns, 1975; Nowell, 1976, 1986; Graham, 1992; Gatenby, 2009).

Научные направления эволюционной онкологии включают сравнительную онкологию (XIX–XX вв.); соматическую эволюцию опухолевых клеток и отбор в популяциях опухолевых клеток (Cairns, 1975; Nowell, 1976, 1986); противораковую селекцию (Graham, 1992); “экологическую” гипотезу (Gatenby, 2009); нашу теорию, которая описывает роль наследуемых опухолей в прогрессивной эволюции (Козлов, 1983, 1987, 2008, 2016; Kozlov, 1979, 1996, 2010, 2014, 2016, 2019a). Таким образом, при всей оригинальности нашей теории она не изолирована от основных направлений науки и глубоко укоренена в современной экспериментальной и теоретической биологии и онкологии.

## III. Биологические предпосылки теории эволюционной роли опухолей

У опухолей есть особенности, которые предполагают их роль в эволюции организмов. Многие из этих особенностей подробно обсуждались в предыдущих работах автора (Kozlov, 2014, 2023a), поэтому рассмотрим их здесь только кратко.

1) На первое место мы поставим обстоятельство, что большинство опухолей не убивают своих хозяев, как наименее известное научному сообществу. У млекопитающих до 80% опухолей — доброкачественные (Boddy et al., 2020; Boutry et al., 2022), и о них мы знаем значительно меньше, чем о злокачественных опухолях, которыми в основном занимается онкология.

На ранних и промежуточных стадиях прогрессии опухоли не убивают своих хозяев. На ранних стадиях прогрессии опухоли могут отбираться на новые функции (Воронцов, 2003).

Опухоли, которые не убивают своих хозяев, обсуждаются нами в монографии (Kozlov, 2014). В их список входят эмбриональные и детские опухоли; доброкачественные опухоли, карциномы *in situ* и так называемые псевдоболести; опухоли на ранних и промежуточных стадиях прогрессии; опухоли, подвергающиеся спонтанной регрессии; опухоли с устойчивой массой (Kozlov, 2014).

Когда мы говорим об эволюционной роли опухолей, мы имеем в виду обсуждавшиеся выше опухоли, не убивающие своих хозяев, а не злокачественные опухоли на поздних стадиях прогрессии, которые убивают своих хозяев.

2) Многие опухоли наследуются (Kozlov, 2014, 2023a). Наследственные опухолевые синдромы встречаются намного чаще, чем неопухолевые наследственные синдромы — классические генетические заболевания (Sokolenko, Imyanitov, 2018).

Любой наследуемый признак может отбираться естественным отбором и быть потенциально эволюционно значимым. Тот факт, что многие опухоли наследуются, предполагает, что они могут участвовать в эволюции организмов. Когда мы говорим об эволюционной роли опухолей, мы подразумеваем наследуемые опухоли. Более подробно наследуемые опухоли обсуждаются в наших работах (Kozlov, 2014, 2023a).

3) Участие опухолевых процессов в эволюции онтогенеза подтверждается многочисленными доказательствами (Kozlov, 2014, p. 35–55; Kozlov, 2019a, 2022a, 2022b).

4) Широкая распространенность опухолей у многоклеточных организмов (Kozlov, 2014, p. 9–17), подтвержденная в более поздних обзорах на эту тему (Aktipis et al., 2015; Albuquerque et al., 2018), позволяет предположить их возможную эволюционную значимость.

5) Древнее происхождение и консерватизм клеточных онкогенов и генов — супрессоров опухолевого роста также предполагает эволюционную значимость опухолей. Этому вопросу посвящена наша статья (Makashov et al., 2019), которую мы будем обсуждать ниже.

6) Некоторые свойства опухолей (избыточные клеточные массы, экспрессия множества необычных генов, возможность дифференцировки с потерей злокачественности, морфогенетический потенциал опухолей) могли быть использованы в эволюции, согласно максиме Добжанского “Nothing in biology makes sense except in the light of evolution” (Dobzhansky, 1973).

#### IV. Гипотеза эволюции путем неофункционализации наследуемых опухолей (основная гипотеза)

Выше мы анализировали модификации формулировки основной гипотезы, которая уточнялась и совершенствовалась вместе с развитием теории. В нашей последней работе (Козлов, 2023, с. 11) использовалось следующее определение: “Наследуемые опухоли на ранних стадиях прогрессии могли играть роль в эволюции многоклеточных организмов, предоставляя дополнительные клеточные массы для экспрессии эволюционно новых генов (возникающих в ДНК зародышевых клеток) и новых сочетаний генов, участвуя таким образом в происхождении новых типов клеток, тканей и органов”.

В этой формулировке присутствуют все существенные элементы основной гипотезы, которые уточнялись на всем протяжении развития теории: наследуемость опухолей необходима для участия в эволюционном процессе; только опухоли на ранних стадиях прогрессии или доброка-

чественные опухоли используются в эволюции; эволюционно новые гены возникают в ДНК зародышевых клеток, а не в ДНК опухолевых клеток; экспрессия эволюционно новых генов и новых сочетаний генов в опухолях приводит к возникновению новых типов клеток, тканей и органов в прогрессивной эволюции.

Гипотеза эволюции путем неофункционализации наследуемых опухолей может быть представлена в виде диаграммы (рис. 1).

На представленной диаграмме разобран случай возникновения эволюционно нового гена *de novo*. Как обсуждалось выше, в части 2 этой статьи, есть и другие способы происхождения эволюционно новых генов, которые совместимы с диаграммой на рис. 1. Кроме того, очевидно, что для возникновения нового клеточного типа требуется более чем один эволюционно новый ген, а также новые сочетания генов. т. е. на диаграмме представлен идеализированный случай происхождения нового клеточного типа с участием одного эволюционно нового гена.

Диаграмма на рис. 1 хорошо иллюстрирует роль организмов-опухоленосителей как переходных форм в прогрессивной эволюции.

#### V. Нетривиальные предсказания теории и результаты их экспериментального подтверждения

Способность делать нетривиальные (неочевидные) предсказания, которые можно проверить экспериментально, является одним из основных требований, предъявляемых к научной теории. Число подтвержденных нетривиальных предсказаний нашей теории увеличивалось и продолжает увеличиваться по мере ее развития. Недавно мы опубликовали специальную статью, посвященную нетривиальным предсказаниям теории *carcino-evo-devo* (Kozlov, 2022d).

Здесь мы проанализируем девять таких предсказаний, которые мы подтвердили или получили данные в их поддержку.

1. Число онкогенов должно соответствовать числу специализированных клеточных типов в организме.

2. Эволюция классов онкогенов, генов — супрессоров опухолевого роста и дифференцировочных генов должна проходить параллельно.

3. Эволюционно новые и эволюционно молодые гены должны экспрессироваться специфически или преимущественно в опухолях (*tumor specifically expressed, evolutionarily novel (TSEEN) genes*).

4. Ортологи *TSEEN*-генов рыб у человека должны приобретать прогрессивные функции.

5. Наследуемые опухоли могут отбираться на новые функции в эволюционирующих организмах.



означало существование на порядок большего числа онкогенов, что было достаточно смелым.

Предсказание числа онкогенов связано с возможной эволюционной ролью клеточных онкогенов, предполагаемой основной гипотезой. В свете основной гипотезы эволюционная роль клеточных онкогенов может состоять в поддержании определенного уровня автономных пролиферативных процессов в эволюционирующих популяциях многоклеточных организмов: “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 нового типа 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, с. 138).

Со времени, когда было сделано это предсказание, число описанных онкогенов и типов клеток постоянно увеличивалось. В нашей статье (Makashov et al., 2019) мы проанализировали число описанных к этому времени онкогенов и клеточных типов.

В базе данных TAG, которую мы использовали в своей работе, содержалось 245 онкогенов человека, из которых 224 обнаруживались с помощью Protein Historian. При использовании других баз данных (Sanger Cosmic, NCBI Entrez section in Cancer Genes, the Cancer Genes and the Network of Cancer Genes (NCG)) обнаружено 380 онкогенов (Domazet-Lošo, Tautz, 2010).

Число описанных типов клеток также возрастало. Если в известной книге “Молекулярная биология клетки” специальный перечень клеток взрослого человеческого организма содержит 210 типов клеток (в том числе стволовых) (Альбертс и др., 1994, с. 204–210), то к 2006 г. число клеточных типов, обнаруженных у человека, достигло 411 (Vickaryous, Hall, 2006). Таким образом, общее соответствие между числом клеточных типов и числом онкогенов действительно существует для человека (245–380 онкогенов против 210–411 типов клеток), как это было предсказано в наших статьях (Козлов, 1987; Kozlov, 1996). Аналогичное соответствие показано нами и для других многоклеточных организмов, для которых имелись данные о числе типов клеток и онкогенов (Makashov et al., 2019).

Следует подчеркнуть, что наше предсказание (Козлов, 1987; Kozlov, 1996) было не о точном числе онкогенов и типов клеток, а о порядке величин. Очевидно, что число описанных онкогенов и типов клеток будет увеличиваться и далее по мере развития науки. Так, согласно последним оценкам, в базах данных Cosmic и CGC на сегодня содержится 383 онкогена (Sinkala, 2023). Мы говорили об увеличении числа онкогенов на порядок и об общем соответствии чисел онкогенов и типов клеток, что и подтверждено в результате усилий многих лабораторий в течение более чем тридцати лет работы. Подтверждение этого предсказания свидетельствует о предсказательной силе нашей теории.

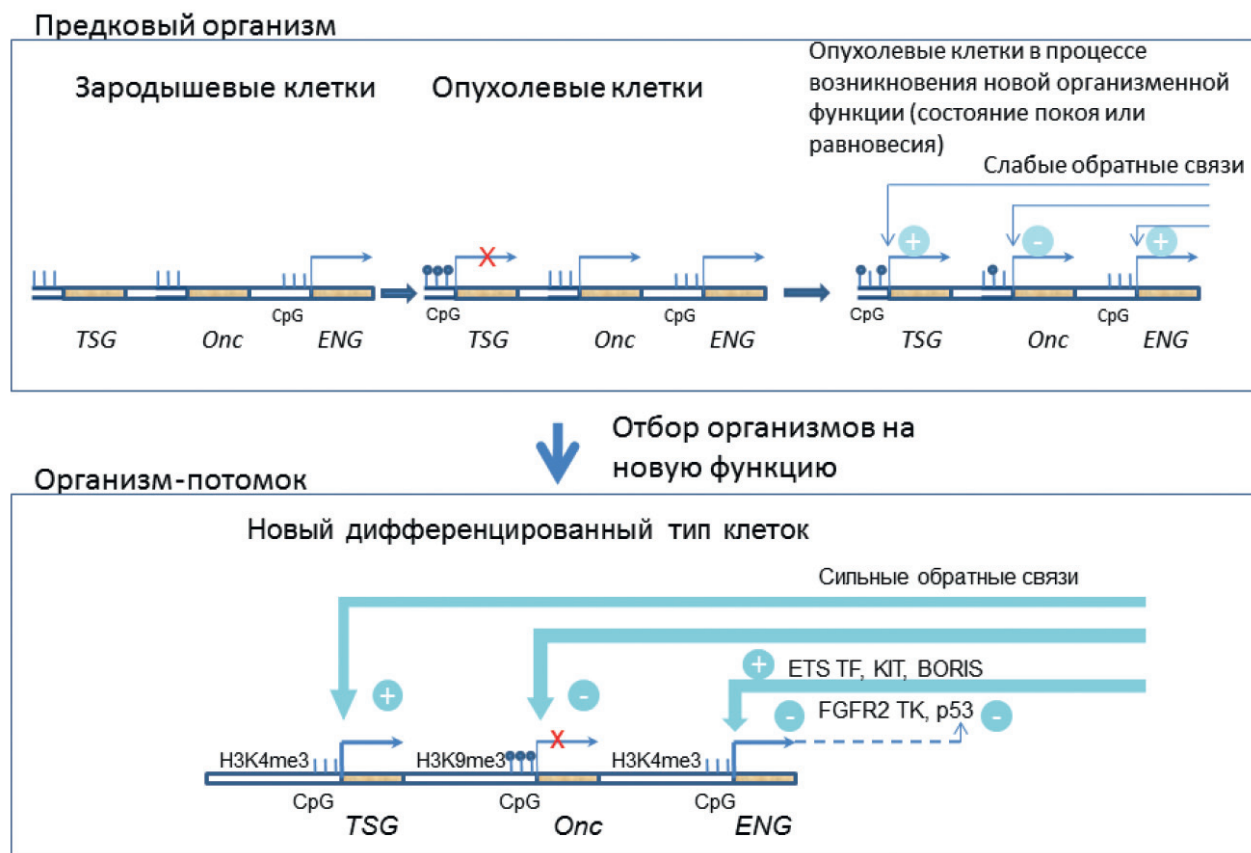
## **2. Эволюция классов онкогенов, генов — супрессоров опухолевого роста и дифференцировочных генов должна проходить параллельно**

Далее автор предположил, что по крайней мере три класса генов необходимы для возникновения нового типа дифференцированных клеток в процессе эволюции — онкогены, гены — супрессоры опухолевого роста и эволюционно новые гены, определяющие новые функции (рис. 2) (Kozlov, 2014). Т.е. три класса генов: онкогены, гены — супрессоры опухолевого роста и эволюционно новые дифференцировочные гены — должны эволюционировать параллельно друг с другом и с увеличением числа типов клеток в многоклеточном организме.

Для подтверждения этого предсказания мы предприняли изучение филогенетического распределения ортологов онкогенов, генов — супрессоров опухолевого роста и дифференцировочных генов человека.

В нашей статье (Makashov et al., 2019) мы показали, что кривые распределения эволюционных возрастов ортологов онкогенов, генов — супрессоров опухолевого роста и дифференцировочных генов практически совпадают. Распределения эволюционных возрастов генов образуют кластер, подтвержденный результатами иерархического кластерного анализа с высокой надежностью, проверенной методом бутстрепа.

Эволюционный возраст гена определяли по наиболее близкому предку в эволюционной линии человека, содержащему сходные последовательности. Тот факт, что кривые распределения эволюционных возрастов генов совпадают, означает, что онкогены, гены — супрессоры опухолевого роста и дифференцировочные гены



**Рис. 2.** Три класса генов необходимы для происхождения новых типов дифференцированных клеток в эволюции — онкогены (*Onc*), гены — супрессоры опухолевого роста (*TSG*) и эволюционно новые гены, определяющие новые функции и новые дифференцированные типы клеток (*ENG*) (по: Kozlov, 2014, p. 114, с разрешением).

эволюционируют параллельно, как и предсказывалось нашей теорией.

Это предсказание связано с первым предсказанием, поскольку связано с происхождением специализированных клеточных типов у многоклеточных животных, только здесь речь идет о процессе, а не о результате.

Полученные в этой статье результаты подтверждены другими авторами (Tollis et al., 2020).

### 3. Эволюционно новые и эволюционно молодые гены должны экспрессироваться специфически или преимущественно в опухолях

Важным нетривиальным предсказанием, вытекающим непосредственно из основной гипотезы, является предсказание о специфической или преимущественной экспрессии в опухолях эволюционно новых и эволюционно молодых

генов, которое в явном виде впервые сформулировано в 1996 г. (Kozlov, 1996).

Подтверждению этого предсказания посвящена серия наших статей (Самусик и др., 2009; Полев и др., 2009, 2011; Круковская и др., 2010, 2016; Карнаухова и др., 2017; Козлов и др., 2017, 2021; Kozlov et al., 2006; Kozlov, 2016, 2022d; Samusik et al., 2011, 2013; Dobrynin et al., 2013; Polev et al., 2014; Makashov et al., 2019; Matyunina et al., 2019; Karnaukhova et al., 2024, in press), в том числе три обзора (Kozlov, 2014, 2016, 2022d). В этих статьях мы получили и проанализировали данные в пользу специфической или преимущественной экспрессии эволюционно новых и эволюционно молодых генов в опухолях. Автор предложил термин для обозначения таких генов — *TSEEN*-гены, от tumor specifically expressed, evolutionarily new genes (Kozlov, 2014).

Мы описали индивидуальные *TSEEN*-гены: *PBOV1* (Круковская и др., 2010; Samusik et al., 2011, 2013), *ELFN1-AS1* (Полев и др., 2009, 2011; Polev et al., 2014) и *OTP-AS1* (Карнаухова и др., 2017; Krukovskaja et al., 2005; Karnaukhova et al., 2024, in press). Мы также описали семейства *TSEEN*-генов: гены раково-тестикулярных антигенов (CT antigen genes) (Dobrynin et al., 2013; Makashov et al., 2019) и *TSEEN*-гены некодирующих РНК (Kozlov, 2016; Makashov et al., 2019).

Мы впервые описали ген *ELFN1-AS1* (Polev et al., 2014) и *de novo* происхождение *TSEEN*-генов человека *PBOV1* и *ELFN1-AS1* (Samusik et al., 2013; Polev et al., 2014). Это одни из первых описаний *de novo* возникших генов человека в мировой литературе. Происхождение генов *de novo* является наиболее трудно доказуемым. В последовавших статьях других авторов подтверждено *de novo* происхождение *PBOV1* и *ELFN1-AS1* (McLysaght, Hurst, 2016; Weisman, 2022).

Мы впервые описали экспрессию генов *PBOV1*, *ELFN1-AS1* и *OTP-AS1* в широком круге опухолей (вместе они экспрессируются в опухолях 23 типов) (Krukovskaja et al., 2005; Samusik et al., 2013; Polev et al., 2014). Наши данные об опухолеспецифичности экспрессии генов *PBOV1* и *ELFN1-AS1* подтверждены многими другими авторами с соответствующими ссылками на наш приоритет (Xue et al., 2018; Jie et al., 2020; Du et al., 2021; Ma et al., 2021, 2022; Li et al., 2022; HajiEsmailpoor et al., 2024). Это свидетельствует о правильности наших подходов к открытию *TSEEN*-генов.

Эволюционно новые гены характеризуются относительно низкой экспрессией (см. обсуждение в Kozlov, 2014). Тем более интересно, что экспрессия *TSEEN*-генов *PBOV1* и *ELFN1-AS1* увеличивается с прогрессией опухолей (Xue et al., 2018; HajiEsmailpoor et al., 2024).

Наши данные об эволюционной новизне класса СТ-генов подтверждены другими авторами с соответствующими ссылками на наш приоритет (Zhang, Long, 2014).

Нами зарегистрирована база данных белок-кодирующих эволюционно новых и эволюционно молодых генов человека, экспрессирующихся в опухолях (Козлов и др., 2021). Эта база данных содержит гены человека с опухолеспецифической экспрессией, или с преимущественной экспрессией в опухолях, возникшие у человека, у приматов или у млекопитающих.

1015 генов определены программой ProteinHistorian как эволюционно новые, т. е. возникшие у человека, и 1392 как эволюционно молодые, т. е. возникшие у приматов. В результате анализа данных базы GTEx нами по-

казано, что из 1015 эволюционно новых генов человека и 1392 эволюционно молодых генов человека, 309 генов и 592 гена соответственно не экспрессируются ни в одной из 53 нормальных тканей, содержащихся в GTEx. Среди генов, не экспрессирующихся в нормальных тканях, уровень экспрессии 100 эволюционно новых генов человека и 234 эволюционно молодых генов человека в опухолях (в 1 и более типах опухолей у 10–100% пациентов TCGA) является значимым, согласно транскриптомным данным из базы данных TCGA (fpkm > 2). т. е. они являются *TSEEN*-генами, согласно нашему определению.

Также в нашей базе данных имеются 898 генов, появившихся у млекопитающих, из которых 119 с опухолеспецифической экспрессией.

Кроме полученных нами собственных результатов, проведенный нами анализ литературных данных также свидетельствует о преимущественной экспрессии в опухолях эволюционно новых генов, независимо от механизмов их происхождения (путем генной дупликации, из ретротранспозонов или эндогенных вирусов, путем перестановки экзонов или *de novo*) (Kozlov, 2016).

Таким образом, существование *TSEEN*-генов можно считать установленным фактом.

Автор рассматривает феномен *TSEEN*-генов как новый биологический феномен, являющийся частью более широкого биологического феномена неофункционализации опухолей в прогрессивной эволюции (Kozlov, 2014, 2016, 2022d).

Автор также рассматривает *TSEEN*-гены как новый суперкласс эволюционно новых, эволюционно молодых и эволюционирующих генов, с опухолеспецифической или преимущественно опухолевой экспрессией. В этот суперкласс генов входят *TSEEN*-гены различных типов живых организмов (Kozlov, 2022d).

Новый суперкласс *TSEEN*-генов имеет особенности по сравнению с другими классами генов.

Во-первых, он объединяет *TSEEN*-гены разных типов организмов. Ортологи *TSEEN*-генов предковых групп организмов могут приобретать прогрессивные функции у потомков, находящихся на более высоких ступенях прогрессивной эволюции, т. е. они участвуют в прогрессивной эволюции (Matyunina et al., 2019). Число *TSEEN*-генов значительно и только у человека может достигать десятков и сотен генов.

Во-вторых, это класс генов, объединенных не по функциональному признаку, как, напри-

мер, класс онкогенов или генов домашнего хозяйства. *TSEEN*-гены могут еще не иметь функций (Kozlov, 2014) или иметь в основном молекулярные функции. Функции разных *TSEEN*-генов отличаются. Ортологи разных *TSEEN*-генов приобретают в эволюции разные прогрессивные функции (Matyunina et al., 2019). Общими свойствами *TSEEN*-генов являются: опухолеспецифичность их экспрессии, их относительная эволюционная новизна, продолжающаяся эволюция в направлении приобретения новых прогрессивных функций (Matyunina et al., 2019).

В-третьих, это класс генов с двойной специфичностью — эволюционной и опухолевой. Двойная специфичность *TSEEN*-генов определяет два комплементарных пути их изучения, как уже обсуждалось выше. Сначала может изучаться опухолеспецифичность экспрессии, а затем эволюционная новизна, и наоборот — сначала эволюционная новизна, а затем опухолеспецифичность экспрессии (Kozlov, 2016).

Опухолеспецифичность экспрессии изучена нами с помощью глобальных вычитаний.

Мы использовали глобальные вычитания суммарных последовательностей всех доступных нормальных органов из суммарных последовательностей всех доступных опухолей. Сначала это делалось с помощью насыщающей молекулярной гибридизации и суммарных препаратов РНК (Евтушенко и др., 1989), затем *in silico* с помощью суммарных библиотек кДНК EST (Baranova et al., 2001; Galachyants, Kozlov, 2009) и с использованием суммарных результатов глубокого секвенирования РНК из баз данных GTEx и TCGA (Козлов и др., 2021; Kozlov, 2022d).

Опухолеспецифичность экспрессии генов подтверждена экспериментально с использованием ПЦР на панелях кДНК из нормальных и опухолевых тканей (Kozlov, 2014, 2016, 2022d).

В работах (Евтушенко и др., 1989; Козлов, 2008; Круковская и др., 2008; Козлов и др., 2017, 2021; Evtushenko et al., 1989; Kozlov et al., 1992; Baranova et al., 2001; Krukovskaja et al., 2005; Galachyants, Kozlov, 2009; Kozlov, 2016, 2022d) мы с использованием разных методов показали, что гены, экспрессирующиеся только или преимущественно в опухолях и не экспрессирующиеся (или слабо экспрессирующиеся) в экспериментально доступных нормальных тканях, действительно существуют. В зависимости от использованных экспериментальных подходов число таких генов варьирует от сотен до тысяч.

Гены, полученные в результате глобальных вычитаний, экспрессируются в широком круге различных типов опухолей и поэтому могут быть названы общепуховыми генами (pan-cancer genes).

В наших работах возраст последовательностей генов человека определялся по возрасту наиболее близкого предка в эволюционной линии человека, который содержит гены со сходными последовательностями (with a significant BLAST score or HMMER E-value) (Koonin, 2005). Эволюционно новыми последовательностями считали последовательности, возникшие у человека и отсутствующие у приматов.

К эволюционно молодым генам человека отнесены гены, возникшие у предков человека и связанные с эволюционно новыми органами и функциями. Самыми эволюционно молодыми органами человека являются плацента, молочная железа и простата, возникшие у плацентарных. Гены, связанные с возникновением эволюционно новых органов плацентарных и млекопитающих, возникали несколько раньше (Domazet-Lošo et al., 2007; Makashov et al., 2019; Matyunina et al., 2019). Поэтому к *TSEEN*-генам человека, представленным на рис. 3, мы отнесли также гены, возникшие у приматов и млекопитающих. В то же время ген *PBOVI*, *de novo* происхождения которого у человека впервые описано нами (Samusik et al., 2013), экспрессируется в опухолях простаты и молочной железы (prostate and breast cancer overexpressed), т. е., с точки зрения нашей теории, участвует в продолжающейся эволюции этих эволюционно молодых органов.

Возраст класса генов описывается распределением возрастов генов, принадлежащих к этому классу генов. Мы определяли возраст класса генов человека по медиане распределения возрастов ортологов генов, принадлежащих к данному классу, т. е. по точке на эволюционной линии человека, соответствующей происхождению 50% ортологов генов, принадлежащих к данному классу генов (Makashov et al., 2019).

Даже эволюционно самые старые классы генов, например гены домашнего хозяйства, содержат небольшое число эволюционно новых генов, возникших у человека (Makashov et al., 2019). При этом различные классы *TSEEN*-генов, например гены раково-тестикулярных антигенов (CT antigen genes), содержат гены, возникшие у плацентарных и ранее (Dobrynin et al., 2013). Разумеется, *TSEEN*-гены содержат наибольшую пропорцию эволюционно новых и молодых генов и являются наиболее молодыми классами генов человека, например СТ-гены

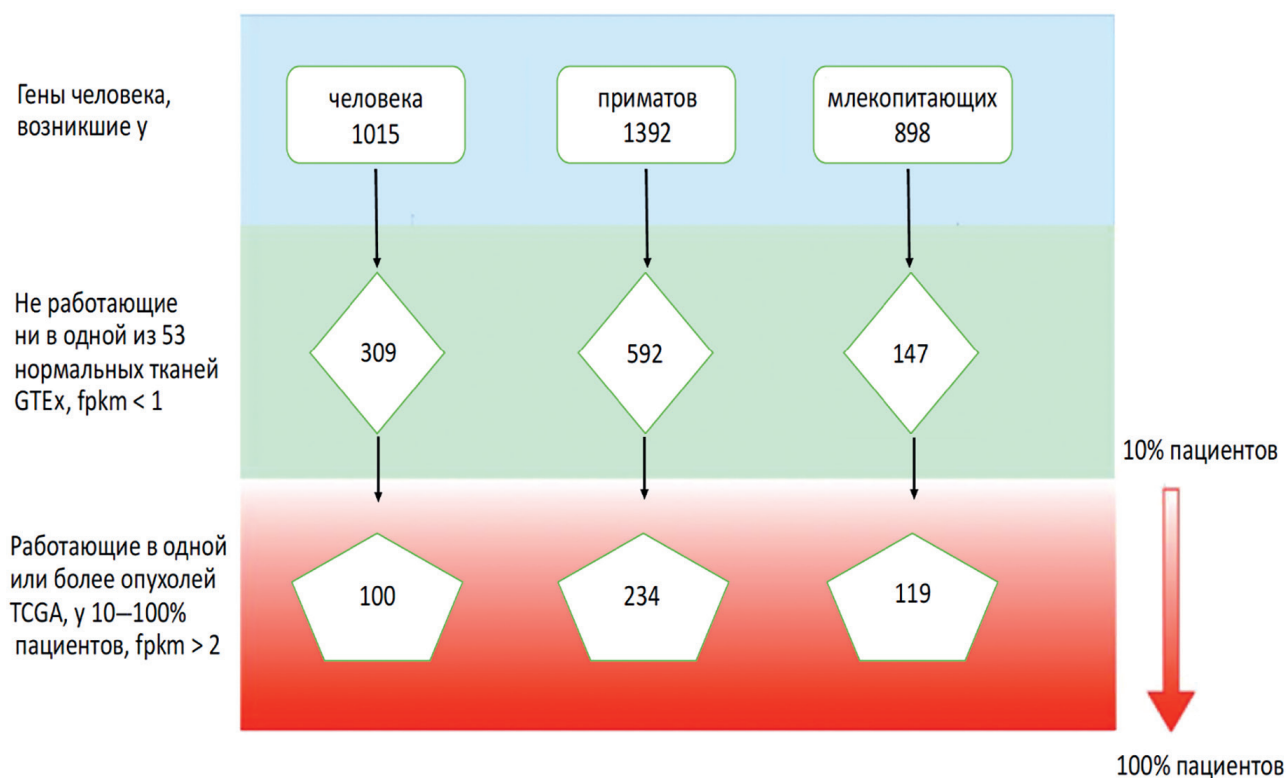


Рис. 3. Данные, представленные в базе данных белок-кодирующих *TSEEN*-генов человека.

или гены некодирующих РНК (Dobrynin et al., 2013; Makashov et al., 2019).

Более высокая представленность *TSEEN*-генов у приматов на рис. 3 предполагает их роль в эволюции человека. *TSEEN*-гены человека, представленные на рис. 3, еще не приобрели функций в нормальных тканях, поэтому их можно рассматривать как эволюционирующие в направлении приобретения новых функций.

Гены, представленные на рис. 3, демонстрируют градиент эволюционной новизны, который отражает континуум эволюционирующих генов. Экспрессия протогенов, эволюционно новых и эволюционно молодых генов в наследуемых опухолях может представлять ранние стадии в происхождении эволюционно новых функций генов. Это представление хорошо соотносится с концепцией протогена (Carvunis et al., 2012) и с моделями происхождения генов *de novo* (van Oss, Carvunis, 2019). *TSEEN*-гены, экспрессирующиеся в опухолях, могут являться резервуаром протогенов. Представляет интерес изучить процесс приобретения прогрессивных функций *TSEEN*-генами, у которых еще нет таких функций. Алгоритм таких исследований определен в наших работах (Matyunina et al., 2019; Kozlov, 2022d).

Другие авторы также заметили связь эволюционно новых генов с опухолями (McLysaght, Hurst, 2016; van Oss, Carvunis, 2019; Weisman, 2022). В своих обзорах они обсуждают *TSEEN*-гены, описанные нами и другими авторами.

#### 4. Ортологи *TSEEN*-генов рыб у человека должны приобретать прогрессивные функции

В исследовании (Matyunina et al., 2019) на модели трансгенных индуцибельных опухолей полосатого данио изучались *TSEEN*-гены рыб и их человеческие ортологи. Согласно предсказанию нашей теории, человеческие ортологи *TSEEN*-генов рыб должны приобретать прогрессивные функции, не встречающиеся у рыб. Используя ресурс геной онтологии (Gene Ontology), мы обнаружили много генов человека, которые участвуют в развитии прогрессивных признаков, отсутствующих у рыб (в развитии легких, молочной железы, плаценты, межжелудочковой перегородки и др.). Ортологи этих генов возникли у рыб и экспрессировались в опухолях рыб и опухолях рыб после регрессии. Опухоли после регрессии можно рассматривать как модели эволюционирующих органов. Поэтому полученные данные (Matyunina et al., 2019) можно рассматривать как прямое доказательство основной гипотезы.

### 5. Наследуемые опухоли могут отбираться на новые функции в эволюционирующих организмах

В статье (Козлов и др., 2012) мы показали, что так называемые шапочки на голове некоторых разновидностей золотых рыбок имеют признаки доброкачественных опухолей. Эти образования отбирались китайскими селекционерами в течение последних нескольких сотен лет. В результате образовался новый орган золотых рыбок — шапочка.

Шапочки золотых рыбок являются первым примером искусственного отбора опухолей, описанным в мировой литературе (Козлов и др., 2012; Kozlov, 2014, 2022a). При этом отбор осуществлялся по признаку красоты.

Существуют также примеры естественного отбора опухолей на новую функцию в организме. Примером такого отбора являются так называемые симбиовилли в желудке у некоторых грызунов, участвующие в сбраживании клетчатки. Симбиовилли возникли в результате естественного отбора папиллом на ранних стадиях прогрессии злокачественного папилломатоза (Воронцов, 2003).

Другим примером естественного отбора опухолей на новую функцию являются макромеланофоры у меченосцев, которые произошли в результате сексуального отбора из злокачественных меланом (Козлов, 2008; Fernandez, Morris, 2008; Kozlov, 2010, 2014).

Примеры позитивной селекции в линии приматов многих ортологов генов человека, связанных с опухолями (tumor-related genes), приведены в (Kozlov, 2014).

Все вышеизложенное свидетельствует, что наследуемые опухоли действительно могут отбираться на новые функции в эволюционирующих организмах.

Симметричная форма шапочки золотых рыбок, ее доброкачественные свойства и появление на определенной стадии развития являются признаками нормального органа. Способность к неограниченному росту и гистологические особенности являются опухолевыми признаками. Поскольку возраст шапочек около тысячи лет, это один из самых молодых органов, известных биологии. Все это говорит о том, что шапочка является опухолеподобным органом. Однако представление об опухолеподобных органах было нами развито несколько позднее.

### 6. Эволюционно молодые органы должны рекапитулировать опухолевые признаки в своем развитии (опухолеподобные органы)

Впервые предсказание о том, что эволюционно новые органы должны рекапитулировать опу-

холевые признаки в своем развитии, сформулировано в нашей книге (Kozlov, 2014, раздел 5.4). В ряде работ рассмотрены опухолеподобные свойства эволюционно молодых органов млекопитающих — плаценты, молочной железы, предстательной железы и детского головного мозга человека (Kozlov, 2014, 2019a, 2022a), жирового органа млекопитающих и процесса ожирения (Kozlov, 2022b).

Плацента является первым органом млекопитающих, опухолеподобные свойства которого были замечены, потому что она имеет много таких свойств, включая локальную инвазию и метастазирование (Kozlov, 2014, 2022a). Роль древней ретровирусной инфекции и доместикации гена *syncytin* в происхождении плаценты также осознаны относительно давно (Harris, 1991; Blond et al., 1999; Mi et al., 2000). Сходство плаценты с опухолями в настоящее время является общепризнанным (Kurlak et al., 2017). Автор рассматривает плаценту как регулируемую опухоль или как опухолеподобный орган (Kozlov, 2014). Другие авторы также используют термин “опухолеподобный орган” по отношению к плаценте (Lala et al., 2021).

Молочная железа и простата человека характеризуются наиболее частой заболеваемостью злокачественными опухолями. Показано, что высокая заболеваемость раком этих органов связана с их эволюционной новизной (Davies, 2004). Как и у плаценты, в органогенезе этих органов есть стадия регулируемого инвазивного роста. Обе железы имеют много других признаков опухолей, указывающих на опухолеподобие молочной железы и простаты. Подробно эти признаки разбираются в (Kozlov, 2022a).

Мозг человека рекапитулирует много признаков опухолей, часть из которых наиболее часто проявляется в детстве. Так, опухоли мозга являются наиболее частыми солидными опухолями у детей и наиболее частой причиной смерти от опухолей (Kozlov, 2014, 2022a).

Примером эволюционно новой опухолеподобной ткани является эпендимальный район спинного мозга человека, который отличается от аналогичного района у грызунов и приматов. Центральный канал спинного мозга человека зарастает тканью, имеющей признаки эпендимомы, находящейся в латентном состоянии (low grade or quiescent ependymoma) (Garcia-Ovejero et al., 2015). Эпендимомы — наиболее частые нейроэпителиальные неоплазмы, которые составляют более половины спинномозговых глиом у взрослых. Примечательно, что авторы, получившие столь интересные результаты, затрудняются их интерпретировать, но это воз-

можно с помощью нашей теории и ее предсказания об опухолеподобных органах.

В работах (Козлов и др., 2012; Kozlov, 2014, 2022a) разбираются также так называемые псевдоболезни, псевдораки, пограничные опухоли и опухолеподобные состояния, провести границу которых с опухолями бывает трудно. Создается впечатление, что нормальные органы, особенно эволюционно молодые, не являются абсолютно фиксированными и стабильными в отношении их клеточного состава и пролиферативных процессов, иногда напоминающих опухолевые.

**7. Жировой орган млекопитающих является опухолеподобным органом, а ожирение является опухолеподобным процессом. *TSEEN*-гены должны экспрессироваться в жировых тканях при ожирении**

Мы сформулировали нетривиальное предсказание об опухолеподобии процесса ожирения (Kozlov, 2022b, 2022d, 2022e, 2023a), исходя из современных представлений об эволюционной новизне жирового органа млекопитающих. Согласно этим представлениям, совокупность жировых тканей млекопитающих рассматривается как жировой орган, который у млекопитающих приобрел эволюционно новую функцию участия в терморегуляции (Kozlov, 2022b). Из этого, в частности, следует, что жировой орган млекопитающих должен обладать признаками опухолей, поиск которых увенчался обнаружением около десятка таких признаков, в том числе принадлежащих к так называемым основным признакам опухолей (hallmarks of cancer). Из них важнейшими в нашем рассмотрении являются способность к безграничной экспансии (в том числе за счет гиперплазии адипоцитов) и способность преадипоцитов к разрушительной инфильтрации других органов с использованием тех же сигнальных путей, которые используются при метастазировании опухолевых клеток (Kozlov, 2022b). В статье (Kozlov, 2022b) сделан вывод, что жировой орган млекопитающих является опухолеподобным органом, а ожирение является опухолеподобным процессом, к которому могут быть применимы соответствующие онкологические технологии. Значение этого вывода для медицины может оказаться очень важным.

Мы предсказали, что *TSEEN*-гены должны экспрессироваться в жировых тканях при ожирении, и получили подтверждающие это предсказание экспериментальные результаты об экспрессии *TSEEN*-генов в образцах висцеральной жировой ткани пациентов с крайними формами ожирения (Акулова и др., 2023а, 2023б).

Продолжив изучение ортологов человека, произошедших из *TSEEN*-генов рыб, исследованных нами ранее (Matyunina et al., 2019), мы описали сеть генов человека, участвующих в развитии жирового органа у человека (Kozlov, 2022b, 2022d, 2022e).

Ортологи *TSEEN*-генов рыб, описанные в работе (Matyunina et al., 2019): *LEP*, *SPRY1*, *PPARG*, *ID2*, *CIDEA*, *NOTCH1* и *ZAG* — участвуют в развитии и функционировании жирового органа млекопитающих, образуя сеть генов со взаимными влияниями (рис. 4).

В зависимости от контекста гены — участники сети, представленной на рис. 4, могут играть роль онкогенов или опухолевых супрессоров, демонстрируя так называемый антагонистический дуализм (Kozlov, 2022b, 2022d, 2022e). Эти данные свидетельствуют в пользу опухолеподобной природы ожирения.

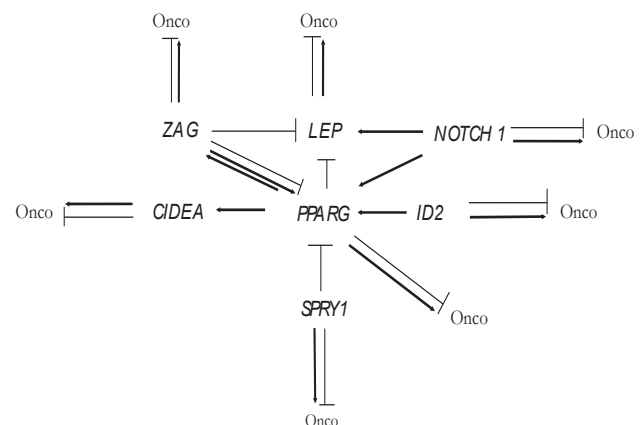
Итак, жировой орган млекопитающих можно отнести к опухолеподобным органам, а ожирение — к опухолеподобным процессам, что является подтверждением одного из нетривиальных предсказаний теории *carcino-evo-devo*.

*TSEEN*-гены человека экспрессируются в жировой ткани при ожирении, что свидетельствует об опухолевой природе процесса ожирения.

Антагонистический дуализм открытой нами сети генов — ортологов *TSEEN*-генов рыб может оказаться ключом для решения онкологической проблемы и проблемы эпидемии ожирения.

**8. Должны быть примеры типов клеток, тканей и органов, произошедших из опухолей**

Это предсказание содержится в основной гипотезе. Сначала мы помещали его в раздел биологических предпосылок нашей теории, что



**Рис. 4.** Сеть генов — ортологов *TSEEN*-генов рыб, описанных в работе (Matyunina et al., 2019), участвующая в развитии жирового органа млекопитающих.

говорит о внутренней взаимосвязи различных разделов. В процессе развития теории число примеров типов клеток, тканей и органов, возможно, произошедших из опухолей, увеличилось в результате целенаправленного поиска. т. е. постоянно осуществлялась работа по подтверждению этого нетривиального предсказания.

В порядке опубликования нами первым примером такого рода были азотфиксирующие клубеньки бобовых растений (Kozlov, 1996). Так называемые кожные рога, возникающие в ответ на различные воздействия у млекопитающих и птиц, были упомянуты нами еще раньше (Козлов, 1987), но они представляют собой ороговевающие папилломы, т. е. являются скорее атипическими опухолевыми органами (см. ниже).

Два новых примера: макромеланофоры и шапочки у рыб — опубликованы в статье (Козлов, 2008).

Глава 7 нашей монографии “Опухоли, которые сыграли роль в эволюции” (Kozlov, 2014) целиком посвящена примерам опухолей, которые уже сыграли роль в эволюции. Кроме клубеньков бобовых, макромеланофоров и шапочек рыб в качестве очень ярких примеров происхождения из опухолей впервые рассмотрены симбиотические ворсинки в желудке полевок и плацента млекопитающих.

В главе 5 в разделе 5.5 приведены основательные свидетельства участия опухолевых процессов в формировании мозга человека.

В других разделах монографии также содержатся примеры органов, которые, возможно, произошли из опухолей, но менее охарактеризованы с этой точки зрения:

- в разделе 4.4.1 — уникальные выросты, сформировавшиеся у некоторых видов и, вероятно, имеющие папилломатозную или опухолеподобную природу: бородавки на рыле бородавочника *Phacocoerus aethiopicus*, считающиеся его систематическим признаком; гребешок и бородака петуха; бородака индюка; рост рогов у оленей, крупного рогатого скота и носорога, подобный опухолевому росту; торакальные выросты у рогатых жуков; предкуольные зачатки рогов у разных видов жуков *Onthophagus*, сходные с папилломами; “шлем” горбатов *Membracidae*, для которого характерно высокое морфологическое разнообразие;
- в разделе 10.9 — метаморфоз морских ежей и других иглокожих, у которых развитие взрослого организма происходит из специальной популяции эмбриональных резервных клеток, похожих на опухолевые клетки;

— в разделе 10.10 — имагинальные диски насекомых, которые также содержат резервные клетки, не гомологичные резервным клеткам реснитчатых питающихся личинок морских животных;

— в разделе 10.10 — нервный гребень, ключевое новшество в эволюции позвоночных, связанное с развитием основных фенотипических признаков позвоночных, особенно производных эктомезенхимы, включая кости, хрящи и дентин. Нервный гребень представляет собой популяцию эмбриональных клеток, обладающих двумя основными свойствами — это мигрирующие и мультипотентные клетки. Перед миграцией они претерпевают эпителиально-мезенхимальную транзицию. т. е. нервный гребень имеет признаки опухолеподобной структуры;

— в разделе 9.2.1 — правый желудочек сердца позвоночных, для которого необходима дополнительная клеточная масса — пример эволюционного новшества.

Для происхождения правого желудочка сердца позвоночных потребовалось рекрутировать новую популяцию клеток-предшественников (вместо простой экспансии предсуществовавших клеток-предшественников). Два эмбриональных поля с клетками-предшественниками участвуют в построении сердца у млекопитающих. Сигнальный путь TGFβ—Smad определяет переднее поле, которое образует правый желудочек сердца. Интересно, что TGFβ опосредует опухолевую супрессию в нормальных клетках и обеспечивает раковую прогрессию в злокачественных клетках (см. подробный разбор этого примера в разделе 9.2.1 (Kozlov, 2014)).

Ссылки на первоисточники упомянутых выше примеров можно найти в монографии и в соответствующих наших статьях.

Уже после выхода книги во время докладов автора в Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского во Владивостоке и на Неаполитанской биологической станции “Антон Дорн” наши и итальянские зоологи независимо предложили следующий пример происхождения из опухоли и подсказали соответствующую ссылку: при метаморфозе морского ежа взрослые особи развиваются из асимметричной опухолеподобной структуры, расположенной с левой стороны кишечника личинки (left coelomic pouch of the larvae) (Warner et al., 2012). Эти данные согласуются с упомянутыми выше представлениями о роли в развитии взрослого организма эмбриональных резервных клеток, похожих на опухоли.

В статье (Kozlov, 2022a) обсуждались новые данные об опухолевых признаках плаценты и го-

ловного мозга человека, а также был приведен анализ опухолевых признаков молочной железы и простаты. Предстательная железа по сути является доброкачественной опухолью, которая продолжает расти у мужчин на протяжении всей жизни (Kozlov, 2022a).

В работах (Kozlov, 2022b, 2022d, 2022e) проанализированы опухолевые признаки жирового органа млекопитающих и данные в пользу его происхождения из наследуемых опухолей.

Ярким примером эволюционно новой опухолеподобной ткани у человека является эпендимальный район спинного мозга человека, который зарастает у взрослых людей доброкачественной эпендимомой. Этот пример впервые был приведен в нашей работе (Kozlov, 2023a). Автор благодарен В.П. Коржу, предложившему этот пример.

В работах (Kozlov, 2022a, 2022b) нами сделан вывод, что опухолевые черты эволюционно новых органов предполагают их происхождение из наследуемых опухолей. Этот вывод опирается в том числе на концепцию атипических опухолевых органов, уже распространенную среди онкологов. Согласно концепции атипических опухолевых органов, солидные опухоли имеют сложную структуру, которая состоит из паренхимы с иерархией клеточных типов и стромы с соединительной тканью, кровеносными сосудами и вспомогательными клетками (Egeblad et al., 2010). В соответствии с нашей теорией, нормальные эволюционно молодые опухолеподобные органы могли эволюционировать из наследуемых атипических опухолевых органов после приобретения ими функции в организме. Взаимоотношения между опухолеподобными органами и атипическими опухолевыми органами могут представлять существенную часть взаимоотношений *carcino-evo-devo*, т. е. коэволюции нормального и неопластического развития (Kozlov, 2022a).

Иногда задают вопрос, как часто в эволюции новые типы клеток, ткани, органы могли происходить из опухолей, не является ли это очень редким явлением? Приведенные выше примеры эволюционно новых и молодых органов, которые могли произойти из опухолей, свидетельствуют, что это был достаточно частый процесс, особенно у млекопитающих. Напомним, что опухоли у млекопитающих встречаются чаще, чем у других позвоночных (Kozlov, 2014).

По оценке А.Н. Островского и его соавторов, матротрофия и, в частности, плацентотрофия возникали у животных — беспозвоночных, туникат и позвоночных — 140–145 раз, включая тесные контакты родительского организма с эмбрионом, обеспечивающие физиологический

обмен между ними (Ostrovsky et al., 2016). Более того, аналоги плаценты высших млекопитающих в некоторых группах беспозвоночных (например, некоторых насекомых и мшанок) представляют собой опухолеподобные клеточные массы, образующиеся за счет родительского организма (Ostrovsky et al., 2016; Nekliudova et al., 2021). Этот пример участия опухолеподобных процессов в эволюции приводится нами в настоящей статье впервые. Автор признателен А.Н. Островскому за детальное обсуждение этого вопроса с автором.

Многokrратно повторявшиеся у беспозвоночных, хордовых и позвоночных матротрофия и плацентотрофия с участием опухолевых и опухолеподобных процессов свидетельствуют о достаточно высокой частоте таких процессов в эволюции.

В 2014 г. автор писал: “Мы можем предположить, что частые, продолжающиеся и широко распространенные опухолеподобные процессы предоставляли дополнительные массы клеток для экспрессии новых генов, возникновение которых также частое, продолжающееся и широко распространенное явление в эволюции. Содержательные совпадения этих относительно самостоятельных процессов на различных структурных уровнях могли “замораживаться” естественным отбором и приводить к возникновению эволюционных морфологических инноваций. Такие совпадения должны были сотни раз происходить в эволюции позвоночных. Они могут по-прежнему продолжаться и в наше время, так как происхождение новых генов и опухолевые процессы по-прежнему частые, продолжающиеся и широко распространенные явления” (Kozlov, 2014, раздел 10.10).

Как упоминалось, некоторые из обсуждавшихся выше примеров предложены во время многих выступлений автора слушателями или биологами, знакомыми с нашей теорией по публикациям (симбиотические макроворсинки, метаморфоз морского ежа и эпендимальный район спинного мозга человека). Это свидетельствует о том, что биологическая аудитория мгновенно схватывает суть основной гипотезы и что наша теория не противоречит совокупному профессиональному опыту этой аудитории. Аналогичную ситуацию автор наблюдал (и продолжает наблюдать) в медицинских аудиториях.

Часть примеров этого раздела перекрывается примерами предыдущего раздела (6), но используется с разными акцентами. Все вместе, содержание разделов 6–8 свидетельствует в пользу происхождения эволюционно молодых органов из наследуемых опухолей.

### 9. Должны существовать ископаемые остатки организмов-опухоленосителей, являющихся переходными формами между ступенями прогрессивной эволюции

Палеонтологические находки не дают нам непрерывных цепочек промежуточных морфологических форм, связывающих современные типы организмов с их общими предками или типы организмов с различными уровнями сложности. Организмы-опухоленосители с наследуемыми опухолями могут представлять собой такие переходные формы между видами организмов, находящихся на разных стадиях прогрессивной эволюции (Kozlov, 2014).

В этой связи интересны различные виды гадрозавров, рассмотренные нами (Козлов, 2008; Kozlov, 2014). Гадрозавры известны в связи с частой встречаемостью опухолей в их ископаемых остатках (Rothschild et al., 2003), а также из-за своеобразных костных наростов на головах, которые имеют форму гребней и, возможно, участвовали в генерировании звуков (Alexander, 2006). Гадрозавры — одна из наиболее успешных групп среди динозавров, поскольку семейство Hadrosauridae является наиболее многочисленным, по сравнению с другими группами динозавров, и включает наибольшее количество видов.

В работе (Козлов, 2008, с. 700) автор писал: “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”.

Данные по распространенности опухолей у гадрозавров подтверждают связь между повышенной подверженностью опухолеобразованию, образованием эволюционно новых органов и эволюционным успехом. Они могут стать ориентиром в поиске палеонтологических переходных форм в прогрессивной эволюции.

### ВЫВОД О НЕТРИВИАЛЬНЫХ ПРЕДСКАЗАНИЯХ

В табл. 2 представлены ссылки на первые публикации нетривиальных предсказаний теории *carcino-evo-devo* и на публикации, связанные с их подтверждением.

Как видно из таблицы, некоторые нетривиальные предсказания вытекают непосредственно из основной гипотезы, другие формулировались в процессе развития теории. Одни имеют более общий, другие — более частный ха-

рактер. Одни публиковались задолго до подтверждения, другие носились в уме и публиковались вместе с подтверждающими результатами. Как правило, на подтверждение предсказаний требовались многие годы работы.

Как мы видим, теория *carcino-evo-devo* сформулировала несколько нетривиальных предсказаний в различных областях биологии, часть из которых успешно подтверждена, а другие находятся в стадии активного изучения (например, предсказание 10 в табл. 2). Таким образом, теория *carcino-evo-devo* обладает предсказательной силой, что является фундаментальным требованием к новой теории. Формулируя все новые и новые нетривиальные предсказания, теория *carcino-evo-devo* уже определяет развитие биологической науки в нескольких новых направлениях.

### VI. Нетривиальные объяснения необъясненных биологических феноменов, которые предлагает новая теория, и анализ ее взаимоотношений с другими биологическими теориями

Этот раздел теории был впервые опубликован в нашей статье (Kozlov, 2019a), хотя некоторые составляющие его части обсуждались уже в работе (Kozlov, 2014).

Теория *carcino-evo-devo* не противоречит существующим биологическим теориям, но дополняет их: она объясняет целый ряд биологических феноменов, необъясненных существующими биологическими теориями (рис. 5).

Впервые этот рисунок представлен в работе (Kozlov, 2019a), но с меньшим числом объяснений.

Целью любой новой теории является генерация нового знания — объяснение необъясненных (или неполностью объясненных) явлений природы и создание новой научной картины мира. Создание новой теории означает, что предыдущие теории не решают какие-то вопросы и не удовлетворяют часть научного сообщества. Теория *carcino-evo-devo* дает новое объяснение механизмов прогрессивной эволюции, включая в рассмотрение наследуемые опухоли и опухолеподобные процессы как переходные формы в увеличении сложности эволюционирующих организмов. Теория *carcino-evo-devo* впервые вводит представление об относительно нестабильных переходных формах в прогрессивной эволюции — организмах-опухоленосителях, что объясняет механизмы происхождения сложных морфологических инноваций и мультигенных функций. Теория *carcino-evo-devo* добавляет коэволюцию неопластического и нормального развития к теории *evo-devo*, описывающей только эволюцию нормального развития.

Таблица 2. Публикации нетривиальных предсказаний теории *carcino-evo-devo* и их подтверждений

| Предсказание                                                                                                                                                                                                                       | Первые публикации предсказаний | Публикации подтверждений                                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 1. Число онкогенов должно соответствовать числу специализированных клеточных типов в организме                                                                                                                                     | Козлов, 1987                   | Makashov et al., 2019                                   |
| 2. Эволюция классов онкогенов, генов — супрессоров опухолевого роста и дифференцировочных генов должна проходить параллельно                                                                                                       | Kozlov, 2014                   | Makashov et al., 2019                                   |
| 3. Эволюционно новые и эволюционно молодые гены должны экспрессироваться специфически или преимущественно в опухолях                                                                                                               | Kozlov, 1996                   | Kozlov et al., 2006 +17 ссылок                          |
| 4. Ортологи <i>TSEEN</i> -генов рыб у человека должны приобретать прогрессивные функции                                                                                                                                            | Matyunina et al., 2019         | Matyunina et al., 2019; Kozlov, 2022b, 2022d, 2022e     |
| 5. Наследуемые опухоли могут отбираться на новые функции в эволюционирующих организмах                                                                                                                                             | Основная гипотеза              | Козлов и др., 2012                                      |
| 6. Эволюционно молодые органы должны рекапитулировать опухолевые признаки в своем развитии (опухолеподобные органы)                                                                                                                | Kozlov, 2014                   | Kozlov 2014, 2019a, 2022a, 2022b                        |
| 7. Жировой орган млекопитающих является опухолеподобным органом, а ожирение является опухолеподобным процессом. <i>TSEEN</i> -гены должны экспрессироваться в жировых тканях при ожирении                                          | Kozlov, 2022b                  | Акулова и др., 2023a, 2023б; Kozlov 2022b, 2022d, 2022e |
| 8. Должны быть примеры типов клеток, тканей и органов, произошедших из опухолей                                                                                                                                                    | Основная гипотеза              | Козлов, 2008; Kozlov, 1996, 2014, 2019a, 2022a, 2022b   |
| 9. Должны существовать ископаемые остатки организмов-опухоленосителей, являющихся переходными формами между ступенями прогрессивной эволюции                                                                                       | Козлов, 2008                   | Козлов, 2008; Kozlov, 2014                              |
| 10. Мы можем определить эволюционно будущие функции <i>TSEEN</i> -генов человека, изучая закономерности приобретения новых функций ортологами <i>TSEEN</i> -генов рыб с помощью компьютерного обучения и <i>in silico</i> эволюции | Kozlov, 2022c                  | В работе                                                |

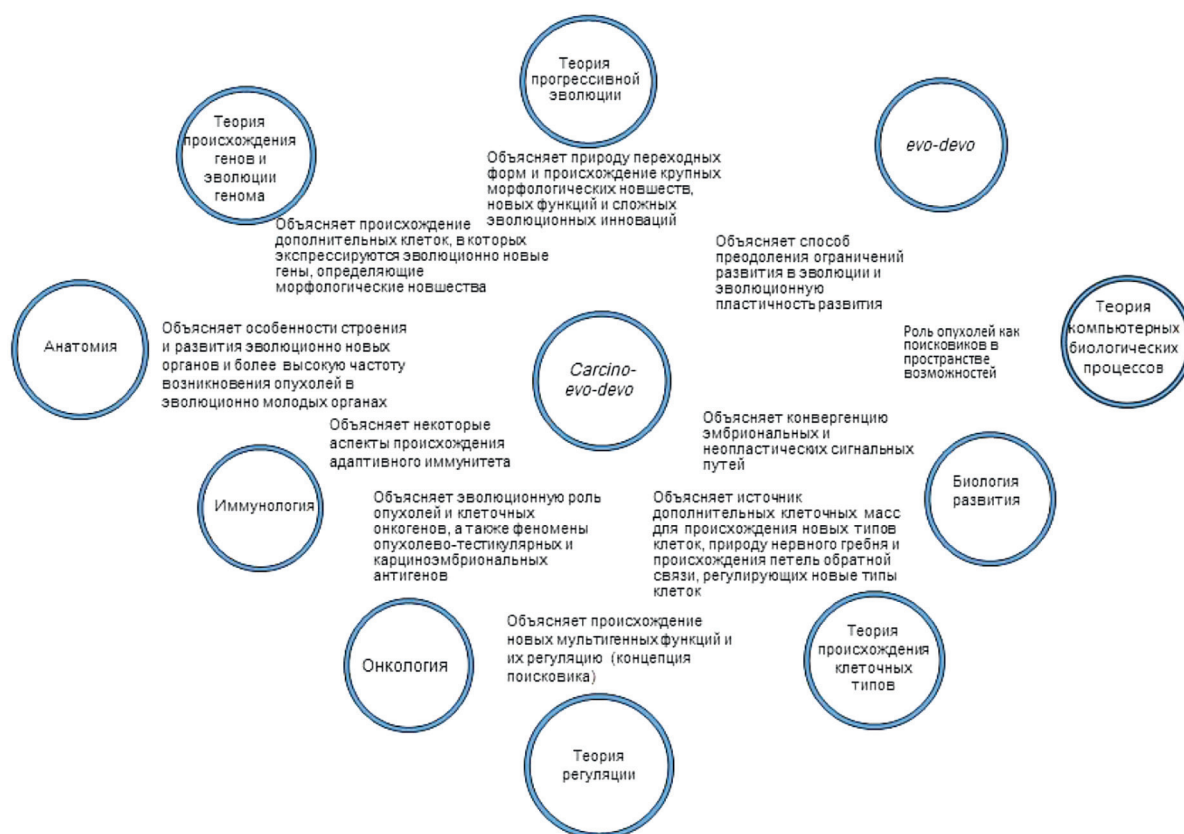
Теория *carcino-evo-devo* также объясняет целый ряд более частных проблем теории прогрессивной эволюции, *evo-devo* и других отраслей биологической науки с новой точки зрения. Эти объяснения представлены в кратком виде в табл. 3. Более подробно они обсуждаются в наших работах (Kozlov, 2014, 2019a, 2022a–d, 2023a).

Как следует из табл. 3, теория *carcino-evo-devo* во многих случаях дает более глубокое объяснение непонятных (или не до конца понятных) биологических феноменов.

Формулируя новые объяснения многих явлений, теория *carcino-evo-devo* вступает в синергичные взаимоотношения с другими биологическими теориями: наша теория заполняет лакуны внутри существующих теорий и между теориями (рис. 5) (Kozlov, 2019a).

Теория *carcino-evo-devo* хорошо воспринимается представителями различных направлений в биологии во время выступлений автора в многочисленных биологических аудиториях. Как уже говорилось выше, некоторые биологические примеры были предложены из аудитории во время таких выступлений. В настоящее время автор активно обсуждает с представителями разных наук (медицины, палеонтологии, физики, компьютерных наук и теории категорий) нетривиальные предсказания, касающиеся опухолеподобных свойств ожирения, палеонтологических переходных форм, увеличения сложности в различных областях действительности и формализации многоуровневых процессов биологического развития.

Позитивное взаимодействие со многими биологическими теориями (рис. 5, табл. 3) свиде-



**Рис. 5.** Взаимоотношения теории *carcino-evo-devo* с другими биологическими теориями: теория *carcino-evo-devo* объединяет существующие биологические теории и объясняет необъясненные биологические феномены.

тельствует о фундаментальном характере теории *carcino-evo-devo*. Теория *carcino-evo-devo* охватывает в едином рассмотрении три основных типа биологического развития — эволюционное, индивидуальное и опухолевое — и поэтому имеет потенциал объединяющей биологической теории.

Теория *carcino-evo-devo* создает новую биологическую картину мира, частью которой являются относительно нестабильные переходные формы — организмы-опухоленосители, эволюционирующие в направлении приобретения новых функций. Новая биологическая картина мира связана с новыми предсказаниями, новыми экспериментальными подходами и новыми технологиями.

### VIII. Основные положения теории *carcino-evo-devo*

Все вышеизложенное можно обобщить в виде следующих основных утверждений или основных положений теории *carcino-evo-devo*:

1. Опухолевые процессы участвуют в эволюции онтогенеза.

2. Эволюционная роль наследуемых опухолей, находящихся на ранних стадиях прогрессии, состоит в предоставлении эволюционирующим организмам дополнительных клеточных масс для экспрессии эволюционно новых генов (возникающих в ДНК клеток зародышевого пути) и новых сочетаний генов и в участии таким образом в происхождении эволюционно новых типов клеток, тканей и органов.

3. Эволюционно молодые органы рекапитулируют некоторые опухолевые признаки в своем развитии, в том числе более частое развитие опухолей, что указывает на их происхождение из наследуемых опухолей.

4. Популяции относительно нестабильных организмов-опухоленосителей являются переходными формами, участвующими в прогрессивной эволюции в тех случаях, когда они успевают оставить потомство.

5. Опухоли являются поисковиками (search engines) новых сочетаний генов, морфологических новшеств и эволюционных инноваций в пространстве биологических возможностей.

**Таблица 3.** Нетривиальные объяснения теории *carcino-evo-devo* (по: Kozlov, 2023a, с изменениями и дополнениями)

| Что объясняется                                                                                                                                        | Объяснение теории <i>carcino-evo-devo</i>                                                                                                                                                                                                                             | Объяснения других биологических теорий                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Природа переходных форм, происхождение крупных морфологических новшеств и сложных эволюционных инноваций в прогрессивной эволюции                      | Популяции организмов-опухоленосителей могут быть переходными формами в прогрессивной эволюции. Морфологические новшества и эволюционные инновации происходят путем неофункционализации опухолей (Kozlov, 2014, 2019a, 2022a, 2022b, 2023a)                            | Палеонтологическая летопись неполна, так как периоды роста сложности были редкими и непродолжительными (Северцов, 1925). Переходные формы отсутствуют, как ископаемые, так и воображаемые функциональные промежуточные состояния. Необходима новая теория (Gould, 1977b, 1980). Палеонтологи не рассчитывают найти отсутствующие звенья, это неправильное представление (Mead, 2009)                                                                |
| Пути преодоления ограничений, связанных с развитием (developmental constraints) в эволюции. Природа эволюционной пластичности индивидуального развития | Ограничения, связанные с развитием, преодолеваются благодаря увеличенной пластичности опухолевых клеток и переходной природе организмов-опухоленосителей и опухолеподобных органов (Kozlov, 2014, 2019a, 2022a, 2022b, 2023a)                                         | Морфологические новшества возникают в прогрессивной эволюции, несмотря на существование ограничений, связанных с развитием (Maynard Smith et al., 1985). Преодоление ограничений может быть связано с ослабленным отбором (Galis et al., 2018). Механизмы переходов неясны, как пластичность развития способствует инновациям, неясно (Moczek et al., 2011), но эволюционные объяснения включают понятие пластичности развития (Uller et al., 2020) |
| Общие черты нормального и опухолевого развития. Конвергенция эмбриональных и неопластических сигнальных путей                                          | Общие черты нормального развития и опухолей, а также конвергенция эмбриональных и опухолевых сигнальных путей, включая карциноэмбриональные антигены, являются результатом участия наследуемых опухолей в эволюции развития (Kozlov, 2014, 2019a, 2023a)              | Это сходство обычно объясняется aberrантной реактивацией или дерегуляцией эмбриональных сигнальных путей в опухолях (Ma et al., 2010; Micalizzi et al., 2010; Aiello, Stanger, 2016)                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Источник дополнительных клеточных масс для происхождения новых типов клеток, тканей и органов. Происхождение нервного валика и его производных         | Наша теория объясняет происхождение новых типов клеток, тканей и органов из избыточных опухолевых клеточных масс, которые функционально не необходимы организму (Kozlov, 2014, 2019a). Нервный валик мог возникнуть из предковой эмбриональной опухоли (Kozlov, 2014) | Существующие теории происхождения новых типов клеток (например, sister-cell-type model (Arendt, 2008) или serial sister cell type (Arendt et al., 2016)) не объясняют, откуда берутся дополнительные клеточные массы для происхождения новых типов клеток                                                                                                                                                                                           |
| Происхождение новых мультигенных функций и органов                                                                                                     | Опухоли как поисковики новых комбинаций генов являются частью биокomпьютерных процессов в пространстве биологических возможностей, что приводит к происхождению новых мультигенных функций и органов (Kozlov, 2014, 2022d)                                            | Существующая теория регуляторных генных сетей (the theory of gene regulatory networks (Davidson, 2006)) объясняет регуляцию развития уже существующих органов и функций, но не происхождение новых мультигенных функций и органов                                                                                                                                                                                                                   |

| Что объясняется                                                                                                                                      | Объяснение теории <i>carcino-evo-devo</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Объяснения других биологических теорий                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Эволюционная роль наследуемых опухолей и клеточных онкогенов, феномены генов раково-тестикулярных антигенов (CT antigen genes) и <i>TSEEN</i> -генов | Эволюционная роль опухолей и клеточных онкогенов состоит в поддержании определенного уровня автономных пролиферативных процессов, которые обеспечивают эволюционирующие многоклеточные организмы дополнительными клеточными массами для экспрессии эволюционно новых генов и комбинаций генов и для происхождения новых типов клеток, тканей и органов (Козлов, 1987; Kozlov, 1996, 2014; Makashov et al., 2019). Гены раково-тестикулярных антигенов являются эволюционно новыми или эволюционно молодыми, поэтому они экспрессируются в яичках и в опухолях (Dobrynin et al., 2013). <i>TSEEN</i> -гены предсказаны основной гипотезой (Kozlov, 1979, 2014, 2016) | Теория <i>carcino-evo-devo</i> впервые утверждает положительную эволюционную роль наследуемых опухолей. Лаборатория автора впервые получила данные в поддержку эволюционной роли клеточных онкогенов (Makashov et al., 2019), первой показала эволюционную новизну генов раково-тестикулярных антигенов (Dobrynin et al., 2013) и впервые описала суперкласс <i>TSEEN</i> -генов (Kozlov, 2014, 2016, 2022d) |
| Эволюционное происхождение адаптивной иммунной системы                                                                                               | Представления об эволюционной роли опухолей помогают объяснить происхождение клональной экспансии и клональной селекции лимфоцитов, а также различных типов иммунных клеток и органов. Предковая опухоль в качестве поисковика в пространстве возможностей могла участвовать в происхождении комбинаторного соединения V, D и J элементов (Kozlov, 2019a, 2022c)                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Существующие теории эволюционного происхождения адаптивного иммунитета фокусируются в основном на молекулярных событиях, например на роли RAG-транспозонов и на дупликациях всего генома (whole-genome duplications) (Flajnik, Kasahara, 2010)                                                                                                                                                               |
| Источник клеточных масс, в которых экспрессируются эволюционно новые гены с прогрессивными функциями                                                 | Наследуемые опухоли могли быть источником дополнительных клеточных масс, в которых экспрессировались эволюционно новые гены и комбинации генов с прогрессивными функциями (Kozlov, 2014, 2016; Matyunina et al., 2019)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Теория эволюции путем дупликации генов (Ohno, 1970), как и другие теории происхождения генов и эволюции генома, не занимаются клеточными и многоклеточными аспектами проблемы, а концентрируются только на молекулярных механизмах                                                                                                                                                                           |
| Особенности структуры и развития эволюционно молодых органов, более высокая заболеваемость опухолями таких органов                                   | Эволюционно молодые органы произошли из наследуемых предковых опухолей и поэтому рекапитулируют некоторые опухолевые признаки в своем развитии (концепция опухолеподобных органов (Kozlov, 2022a, 2022b))                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Дж. Дэвис (J. Davies), который впервые описал более высокую заболеваемость опухолями эволюционно молодых органов: молочной железы и простаты, не объяснил этот феномен (Davies, 2004)                                                                                                                                                                                                                        |
| Биологические компьютерные процессы                                                                                                                  | Теория <i>carcino-evo-devo</i> объясняет роль опухолей в качестве поисковиков новых сочетаний генов, определяющих эволюционно новые структуры и функции многоклеточных организмов, в пространстве биологических возможностей (Kozlov, 2022c)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Теория биологических компьютерных процессов оперирует в основном на молекулярном и клеточном уровнях (Adleman, 1994; Paun et al., 1998; Grozinger et al., 2019)                                                                                                                                                                                                                                              |

Очевидно, что при этом основная гипотеза становится основным утверждением (п. 2). Утверждение (5) сформулировано нами в разделе 10.13 нашей монографии и обсуждалось во второй части настоящей статьи. Обсуждение этого положения будет продолжено в следующей, четвертой части статьи в связи с биологическими компьютерными процессами.

Новые главы теории будут обсуждаться в завершающей части статьи. Они образуют более общую теорию увеличения биологической сложности, связанную с теорией *carcino-evo-devo*.

#### *VIII. Перспективы новых технологий на основе теории carcino-evo-devo*

Существенным требованием к новым теориям является необходимость разработки новых технологий на их основе. Наша теория уже определила несколько таких разработок.

##### **Ген *Brachyury***

Мы описали повышенную экспрессию человеческого гомолога гена *Brachyury* в широком спектре опухолей человека (Круковская и др., 2008; Palena et al., 2007). Этот ген участвует в эпителиально-мезенхимальном переходе, и поэтому противоопухолевые вакцины на его основе направлены против метастазирования (Hamilton et al., 2017). В настоящее время противоопухолевые вакцины с использованием гена *Brachyury* находятся среди мировых лидеров по числу клинических испытаний (около 30 клинических испытаний (ClinicalTrials.gov)) (Kozlov, 2022d), причем в одном из клинических испытаний (ТАЕК-VAC-HerBy) одновременно участвуют пациенты с десятью различными типами опухолей. Автор является участником патента США на использование гена *Brachyury* (Schlom et al., 2012).

Мы полагаем, что целесообразно начать клинические испытания противоопухолевых вакцин с использованием гена *Brachyury* в России. В нашей лаборатории разработана платформа ДНК-вакцин, которая может быть использована в этих целях (Akulova et al., 2019).

##### **Создание платформы новых онкологических технологий на основе универсальной онкологической реagenтики с использованием *TSEEN*-генов**

Наша лаборатория описала новый суперкласс *TSEEN*-генов, предсказанный теорией *carcino-evo-devo* (Kozlov, 2022a). Отличительной особенностью *TSEEN*-генов является экспрессия каждого из них в широком спектре различных типов опухолей. База данных *TSEEN*-генов человека

содержит 100 эволюционно новых генов, возникших у человека, и 234 эволюционно молодых генов, возникших у приматов (Козлов и др., 2021).

Потенциальные возможности этой базы данных демонстрирует впервые описанный нами (Polev et al., 2014) *TSEEN*-ген *ELFN1-AS1*, который является lncRNA-онкогеном в большом числе различных типов опухолей (HajiEsmailpoor et al., 2024). Гены *ELFN1-AS1*, *PBOV1* и *OTP-AS1* вместе экспрессируются в 23 типах опухолей человека (Козлов, 2023).

Нам представляется целесообразным разработать универсальную онкологическую реagenтику с использованием *TSEEN*-генов. Первыми участниками универсальной онкологической панели могут стать гены *ELFN1-AS1*, *PBOV1* и *OTP-AS1*.

##### ***TSEEN*-ген *ELFN1-AS1* как диагностический маркер, терапевтическая мишень и прогностический маркер**

В статьях (Самусик и др., 2007, 2009; Krukovskaja et al., 2005) нами впервые описана эволюционно новая последовательность Hs.633957, экспрессирующаяся преимущественно в опухолях. Эта последовательность подробно изучена в работах (Полев и др., 2009, 2011; Polev et al., 2014). Доказано, что соответствующий ген возник *de novo* из интронной области гена *ELFN1*, и подробно описаны детали его структуры и экспрессии. Это один из впервые описанных *de novo* возникших генов человека. Ген получил название *ELFN1-AS1*, утвержденное Комитетом по номенклатуре генов человека (HUGO Gene Nomenclature Committee). Повышенная экспрессия этого гена показана нами в 17 типах опухолей человека.

В настоящее время этот ген интенсивно изучается в мире (Jie et al., 2020; Ma et al., 2021; Zhai et al., 2021; Li et al., 2022; Huang et al., 2023). Недавно опубликован обзор, посвященный роли *ELFN1-AS1* в канцерогенезе (HajiEsmailpoor et al., 2024). Выяснены механизмы его действия. На основе анализа гена *ELFN1-AS1* в одиннадцати типах опухолей авторы делают вывод о возможности использования гена *ELFN1-AS1* в качестве диагностического маркера, терапевтической мишени и прогностического маркера.

Общий механизм действия длинной некодирующей РНК *ELFN1-AS1* в большинстве изученных опухолей — конкурентное связывание различных регуляторных микроРНК (molecular sponge), что приводит к усилению злокачественности *in vivo* и *in vitro* (HajiEsmailpoor et al., 2024).

т.е. в принципе возможна терапия с помощью олигонуклеотидов, взаимодействующих с длинной некодирующей РНК *ELFN1-AS1*.

Длинная некодирующая РНК *ELFN1-AS1* кодирует микробелок SMIMP (62 аминокислотных остатка), который также стимулирует опухолевый рост *in vivo* и *in vitro* (Zheng et al., 2023). Очевидно, что данный полипептид также является потенциальной терапевтической мишенью.

Поскольку рак поджелудочной железы является серьезной нерешаемой пока проблемой, а *ELFN1-AS1* участвует в патогенезе рака поджелудочной железы (Ma et al., 2021), целесообразно соответствующие терапевтические средства разрабатывать в первую очередь на модели рака поджелудочной железы.

Лиу с соавт. (Liu et al., 2021) показали, что пациенты из группы риска, определенной с помощью *ELFN1-AS1*, более чувствительны к наиболее распространенным химиопрепаратам — метотрексату, винорелбину и паклитакселу (methotrexate, vinorelbine, paclitaxel). Таким образом, *ELFN1-AS1* может рассматриваться в контексте совершенствования химиотерапии рака.

Во всех исследованиях повышенная экспрессия *ELFN1-AS1* связана с отрицательным клиническим прогнозом (HajiEsmailpoor et al., 2024). С использованием корреляционного анализа разработаны клинические рекомендации, связывающие уровень экспрессии *ELFN1-AS1* с прогнозом выживаемости при карциноме шейки матки (Liu et al., 2021). Эта методология *ELFN1-AS1* может быть распространена на другие типы рака.

Представляется целесообразным внедрить ген *ELFN1-AS1* в онкологическую практику в качестве диагностического маркера, терапевтической мишени и прогностического маркера для широкого круга опухолей.

#### ***TSEEN-ген PBOV1***

В нашей статье 2013 г. (Samusik et al., 2013) мы описали происхождение *de novo* белок-кодирующего гена *PBOV1*. Он стал одним из первых генов, происхождение которого *de novo* описано в литературе.

Ген *PBOV1* первоначально обнаружен An и соавторами, которые показали его гиперэкспрессию в раке предстательной железы, молочной железы и мочевого пузыря (An et al., 2000). Мы показали, что ген *PBOV1* экспрессируется в гораздо более широком диапазоне опухолей — в 20 различных типах опухолей (Samusik et al., 2013). При этом высокий уровень экспрессии *PBOV1* связан с благоприятным клиническим исходом

рака молочной железы и глиомы (Samusik et al., 2013). Мы предположили, что белок *PBOV1* может действовать как иммунологический супрессор опухоли (Samusik et al., 2013).

Аналогичные результаты получены и другими авторами на модели рака яичников (Wang et al., 2016).

Однако *PBOV1* способствует развитию рака простаты (Pan et al., 2016) и может служить биомаркером его более поздних стадий (Carleton et al., 2018). Высокий уровень экспрессии *PBOV1* также связан с плохим прогнозом у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК) и может являться терапевтической мишенью при ГЦК (Guo et al., 2018; Xue et al., 2018). Возможно, это связано с ролью *PBOV1* в эпителиально-мезенхимальном переходе (Guo et al., 2018; Kong et al., 2018).

Целесообразно внедрить ген *PBOV1* в онкологическую практику в качестве прогностического маркера рака молочной железы, глиомы, простаты и ГЦК.

#### ***TSEEN-ген OTP-AS1***

Мы впервые описали ген *OTP-AS1* и особенности его структуры и регуляции (Карнаухова и др., 2017; Козлов, 2023; Karnaukhova et al., 2024, in press).

Ген *OTP-AS1* экспрессируется в 17 типах опухолей. Ген *OTP* также экспрессируется в широком спектре опухолей. В наших экспериментах он экспрессировался в 23 из 29 образцов опухолей различного гистогенеза, а также в одном образце из нормального яичка (Карнаухова и др., 2017).

Ген *OTP-AS1* располагается на противоположной цепи по отношению к гену *OTP*, и у этих генов есть общая последовательность в одном из экзонов. Таким образом, гены *OTP-AS1* и *OTP* представляют сенс-антисенс пару генов, участвующих в регуляторных взаимодействиях.

Ген *OTP-AS1* экспрессируется в висцеральной жировой ткани пациентов с крайней формой ожирения. Самый сильный сайт инициации транскрипции этого гена chr5:77629658–77629659 демонстрирует эксклюзивную инициацию (4.15 tpm) в мезенхимальных стволовых клетках, полученных из жировой ткани, при индукции адипогенеза (Акулова и др., 2023а, 2023б; Karnaukhova et al., 2024, in press).

Можно использовать *TSEEN-ген OTP-AS1* для создания универсальной опухолевой реактивности и для изучения опухолеподобных свойств ожирения.

## IX. ЗНАЧЕНИЕ ТЕОРИИ *CARCINO-EVO-DEVO* ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

Влияние на медицину и здравоохранение трудно прогнозировать, учитывая их консервативный характер и различные виды воздействия со стороны фармакологических компаний и большого бизнеса. Поэтому диффузия инноваций, связанных с новой биологической теорией *carcino-evo-devo*, не будет происходить быстро. Вместе с тем, можно прогнозировать следующие направления, в которых теория будет оказывать свое влияние.

**Изменение отношения к опухолям.** Как следует из нашей теории, опухоли использовались в эволюции. Поэтому, с учетом наших знаний об эволюционных механизмах, следует научиться сдерживать опухолевые процессы.

Мы полагаем, что нужно научиться “договариваться” с опухолями, как это было в эволюции, а не стремиться их только убивать. С точки зрения теории *carcino-evo-devo*, опухолевые процессы являются сущностными процессами, и остановить их невозможно, но можно стабилизировать в равновесном состоянии. Из теории *carcino-evo-devo* следует, что это возможно на основе усиления эволюционно новых функций *TSEEN*-генов. В лаборатории автора в настоящее время эта возможность изучается с помощью искусственного интеллекта и компьютерного обучения.

Теория *carcino-evo-devo* указывает на то, что надо больше изучать опухоли, которые не убивают своих хозяев, а таких опухолей у млекопитающих большинство. Автор полагает, что надо больше изучать так называемые псевдоболести, псевдораки, карциномы *in situ*, пограничные опухоли, опухолеподобные состояния и доброкачественные опухоли, а также эволюционно молодые опухолеподобные органы, чтобы понять механизмы стабилизации опухолей.

К сходным представлениям о возможности сдерживания опухолей пришли также другие авторы. Примером может быть экологическая гипотеза Гатенби (Gatenby, 2009) и связанные с ней метромомная и адаптивная терапия (Gatenby et al., 2009).

**Изменение отношения к ранней диагностике опухолей.** Скрининг в целях ранней диагностики опухолей дает завышенные результаты и выявляет много опухолеподобных состояний, которые не убивают пациентов. Первыми на это обратили внимание исследователи, которые сами занимались ранней диагностикой (Yamamoto et al., 1995; Nonjo et al., 2003; Kramer, 2004; Kramer, Croswell,

2009). Авторы пришли к выводу, что опухоли, выявляемые при скрининге, фундаментально отличаются от симптоматических опухолей. Эти взгляды подробно обсуждались в нашей книге (Kozlov, 2014). Мы полагаем, что необходимо вести работу по созданию дифференциальной диагностики опухолеподобных состояний и псевдоболестей. В этом может оказаться полезным новое поколение универсальной онкологической реагентки на основе *TSEEN*-генов.

**Изменение взглядов на природу ожирения.** Жировой орган млекопитающих можно отнести к опухолеподобным органам, а ожирение — к опухолеподобным процессам (Kozlov, 2022b). Такое изменение взглядов на природу ожирения может привести к большим последствиям в здравоохранении.

Какие могут быть практические предложения, вытекающие из опухолеподобия процесса ожирения? Главный вывод заключается в том, что онкологические технологии могут использоваться для борьбы с ожирением, и наоборот, можно использовать подходы, разработанные для борьбы с ожирением, также и для борьбы с опухолями.

В частности, поскольку гиперплазия играет роль в ожирении, то можно ставить вопрос о применении цитостатиков для лечения крайних форм ожирения. Действительно, у мышей с крайней степенью ожирения применение цитостатиков (метотрексата и циклофосфамида) ведет к потере веса даже на фоне продолжающейся диеты с высоким содержанием жира (Myers et al., 2017). Механизм действия связан с ингибированием деления предшественников адипоцитов. Метотрексат и циклофосфамид уже используются для лечения некоторых неонкологических заболеваний, таких как ревматоидный артрит, псориаз и красная волчанка. Большое количество работ посвящено химиотерапии опухолей на фоне ожирения онкологических больных. В частности, рекомендуется пересчет лекарственных доз с поправкой на ожирение. Таким образом, пациенты с ожирением уже давно изучаются с точки зрения эффективности и безопасности химиотерапии.

Нами описана сеть генов, участвующих в развитии жирового органа человека. Мы также обнаружили явление антагонистического дуализма для всех участников этой сети генов. т. е. каждый из семи генов — участников сети в зависимости от контекста может выступать либо как онкоген, либо как супрессор опухолевого роста. Мы полагаем, этот феномен может оказаться ключевым для решения проблемы ожирения и проблемы опухолевого роста.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работах, посвященных философии науки, теорию определяют как целостную развивающуюся систему знаний, имеющую определенную структуру, способную делать предсказания и объяснять явления природы (Степин, 2006).

Как было показано выше, наша теория является целостной развивающейся системой знаний. Она имеет свою структуру, состоящую из нескольких взаимосвязанных разделов, делает экспериментально проверяемые предсказания и объясняет необъясненные явления природы.

Основные положения теории *carcino-evo-devo* следующие (Козлов, 2023; Kozlov, 2023a).

1. Опухолевые процессы участвуют в эволюции онтогенеза.

2. Эволюционная роль наследуемых опухолей, находящихся на ранних стадиях прогрессии, состоит в предоставлении эволюционирующим организмам дополнительных клеточных масс для экспрессии эволюционно новых генов (возникающих в ДНК клеток зародышевого пути) и новых сочетаний генов и в участии таким образом в происхождении эволюционно новых типов клеток, тканей и органов.

3. Эволюционно молодые органы рекапитулируют некоторые опухолевые признаки в своем развитии, в том числе более частое развитие опухолей, что указывает на их происхождение из наследуемых опухолей.

4. Популяции относительно нестабильных организмов-опухоленосителей являются переходными формами, участвующими в прогрессивной эволюции в тех случаях, когда они успевают оставить потомство.

5. Опухоли являются поисковиками (search engines) новых сочетаний генов, морфологических новшеств и эволюционных инноваций в пространстве биологических возможностей.

По словам А. Эйнштейна, приведенным в эпиграфе к части 1 настоящей статьи,

“...Теория преследует две цели:

1. Охватить по возможности все явления в их взаимосвязи (полнота).

2. Добиваться этого, взяв за основу как можно меньше логически взаимно связанных логических понятий и произвольно установленных соотношений между ними (основных законов и аксиом). Эту цель я буду называть ‘логической единственностью’” (Эйнштейн, 1965, с. 264).

Как было показано выше, наша теория охватывает в рамках единого рассмотрения три основных вида биологического развития (эво-

люционное, индивидуальное и неопластическое развитие) и поэтому претендует на роль единой и наиболее полной теории биологического развития. Кроме того, как показано в первой части статьи, основная гипотеза нашей теории выведена из двух более общих принципов — принципа генной конкуренции и принципа эволюции генома. т.е. наша теория соответствует требованиям, сформулированным А. Эйнштейном.

## БЛАГОДАРНОСТИ

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

## 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

- Абелев Г.И., Перова С.Д., Храмова Н.И. и др. Эмбриональный сывороточный  $\alpha$ -глобулин и его синтез перевиваемыми гепатомами мышей // Биохимия. 1963. Т. 28. С. 625–634.
- Акулова Е.Б., Карнаухова Ю.К., Круковская Л.Л. и др. *TSEEN*-гены человека экспрессируются в висцеральной жировой ткани при ожирении // Тез. XVII Всерос. науч.-практ. конф. им. А.Ю. Барышникова с междунар. участ. “Новые перспективные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы” (Москва, 20–21 апреля 2023 г.). М.: АБВ-пресс, 2023а. С. 3–4.
- Акулова Е.Б., Карнаухова Ю.К., Круковская Л.Л. и др. Экспрессия *TSEEN*-генов человека в опухолях и висцеральной жировой ткани при ожирении — свидетельство в пользу опухолеподобной природы ожирения // Успехи мол. онкол. Тез. VIII Всерос.

- Конф. по молекулярной онкологии. 2023б. Т. 10 (4). Приложение. С. 10.
- Альбертс Б., Брей В., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. Т. 3. М.: Мир, 1994. 504 с.
- Воронцов Н.Н. Макромутации и эволюция: фиксация гольдшмидтовских макромутаций как видовых и родовых признаков. Папилломатоз и возникновение макроворсинок в желудке грызунов // Генетика. 2003. Т. 39. С. 519–524.
- 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.
- Карнаухова Ю.К., Полев Д.Е., Круковская Л.Л., Козлов А.П. Изучение экспрессии гена *Orthopedia homeobox* в различных опухолевых и нормальных тканях человека // Вопр. онкол. 2017. Т. 63 (1). С. 128–134.
- Кедров Б.М. Предмет и взаимосвязь естественных наук. М.: Наука, 1962. 412 с.
- Козлов А.П. Регуляторные механизмы как выражение и результат эволюции конкурентных отношений между генами. Солёностные 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 биология: структурно-функциональный подход / Ред. С.Г. Инге-Вечтомов. 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. Эволюция путем неофункционализации опухолей: новообразования как фактор прогрессивной эволюции. СПб.: Изд-во Политех. ун-в., 2016. 263 с.
- Козлов А.П. Новая биологическая теория — теория *carsino-evo-devo*, ее нетривиальные предсказания и взаимоотношения с другими биологическими теориями // Мед. генет. 2022. Т. 21 (8). С. 4–8.
- Козлов А.П. Теория эволюционной роли опухолей, *carsino-evo-devo*. М.: Акварель, 2023. 72 с.
- 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., Круковская Л.Л., Самусик Н.А. и др. Эволюционно новые гены, специфически экспрессирующиеся в опухолях: новый класс мишеней? // Рос. биотер. журн. 2017. Т. 16 (S1). С. 42–43.
- Козлов А.П., Матюнина Е.А., Макашов А.А. База данных генов *TSEEN* Биомедицинского центра. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № RU2021621840. Дата рег.: 24.08.2021. Дата публ.: 01.09.2021.
- 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., Галачянц 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., Галачянц Ю.П., Козлов А.П. Анализ эволюционной новизны последовательностей, экспрессирующихся в опухолях // Экол. генетика. 2009. Т. 7. С. 26–37.
- Северцов А.Н. Главные направления эволюционного процесса. М.: Тов-во А.В. Думнов и К°, 1925. 84 с.
- Северцов А.Н. Морфологические закономерности эволюции. М., Л.: АН СССР, 1939. 610 с.
- Степин В.С. Философия науки. Общие проблемы. М.: Гардарики, 2006. 384 с.
- Татаринев Ю.С. Обнаружение эмбриоспецифического  $\alpha$ -глобулина в сыворотке крови больного первичным раком печени // Вопр. мед. химии. 1964а. Т. 10. С. 90–91.
- Татаринев Ю.С. Обнаружение эмбриоспецифического  $\alpha$ -глобулина в сыворотке крови при гепатоцеллюлярном раке и активной фазе цирроза печени // Вопр. мед. химии. 1964б. Т. 10. С. 218.
- Татаринев Ю.С. Новые данные об эмбриоспецифических антигенных компонентах сыворотки крови человека // Вопр. мед. химии. 1964в. Т. 10. С. 584–589.
- Шимкевич В.М. Уродства и происхождение видов. СПб., М.: Тов-во М.О. Вольф, 1909. 106 с.
- Эйнштейн А. Физика и реальность. М.: Наука, 1965. 359 с.
- Abelev G.I., Perova S., Kramkova N.I. et al. Embryonal serum alpha-globulin and its synthesis by transplantable mouse hepatomas // Transplant. Bull. 1963. V. 1. P. 174–180.
- Adleman L.M. Molecular computation of solutions to combinatorial problems // Science. 1994. V. 226. P. 1021–1024.

- Aiello N.M., Stanger B.Z.* Echoes of the embryo: using the developmental biology toolkit to study cancer // *Dis. Model. Mech.* 2016. V. 9. P. 105–114.
- Aktipis C.A., Boddy A.M., Jansen G. et al.* Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2015. V. 370. P. 20140219.
- Akulova E.B., Murashev B.V., Verevchkin S.V. et al.* The increase of the magnitude of spontaneous viral blips in some participants of phase II clinical trial of therapeutic optimized HIV DNA vaccine candidate // *Vaccines* (Basel). 2019. V. 7 (3). P. 92.
- Albuquerque T.A.F., Do Val L.D., Doherty A., De Magalhães J.P.* From humans to hydra: patterns of cancer across the tree of life // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2018. V. 93. P. 1715–1734.
- Alexander R.M.* Dinosaur biomechanics // *Proc. Biol. Sci.* 2006. V. 273 (1596). P. 1849–1855.
- An G., Ng A.Y., Meka C.S. et al.* Cloning and characterization *UROC28*, a novel gene overexpressed in prostate, breast and bladder cancer // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 7014–7020.
- Anderson N.G.* Evolutionary significance of viral infection // *Nature.* 1970. V. 227. P. 1346–1347.
- Arendt D.* The evolution of cell types in animals: emerging principles from molecular studies // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9 (11). P. 868–882.
- Arendt D., Musser J.M., Baker C.V.H. et al.* The origin and evolution of cell types // *Nat. Rev. Genet.* 2016. V. 17 (12). P. 744–757.
- 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.
- Blond J.L., Besème F., Duret L. et al.* Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family // *J. Virol.* 1999. V. 73. P. 1175–1185.
- Boddy A.M., Abegglen L.M., Pessier A.P. et al.* Lifetime cancer prevalence and lifetime history traits in mammals // *Evol. Med. Public Health.* 2020. V. 2020 (1). P. 187–195.
- Boutry J., Tissot S., Ujvari B. et al.* The evolution and ecology of benign tumors // *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2022. V. 1877 (1). P. 188643.
- Cairns J.* Mutation, selection and the natural history of cancer // *Nature.* 1975. V. 255. P. 197–200.
- Carleton N.M., Zhu G., Gorbunov M. et al.* *PBOV1* as a potential biomarker for more advanced prostate cancer based on protein and digital histomorphometric analysis // *Prostate.* 2018. V. 78 (7). P. 547–559.
- Carvunis A.R., Rolland T., Wapinski I. et al.* Proto-genes and de novo gene birth // *Nature.* 2012. V. 487. P. 370–374.
- Cohnheim J.* Vorlesungen uber allgemein Pathologie. Berlin: Hirschwald, 1877. 692 s.
- Cohnheim J.* Lectures on general pathology. V. 2. London: The New Sydenham Society, 1889. 1434 p.
- Davidson E.H.* The regulatory genome. Amsterdam, Boston, Heidelberg: Elsevier Inc., 2006. 304 p.
- Davies J.A.* Inverse correlation between an organ's cancer rate and its evolutionary antiquity // *Organogenesis.* 2004. V. 1 (2). P. 60–63.
- 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. P. 105108.
- Dobzhansky T.* Nothing in biology makes sense except in the light of evolution // *Am. Biol. Teacher.* 1973. V. 35 (3). P. 125–129.
- Domazet-Lošo T., Brajkovic J., Tautz D.* A phylostratigraphy approach to uncover the genomic history of major adaptations in metazoan lineages // *Trends Genet.* 2007. V. 23. P. 533–539.
- Domazet-Lošo T., Tautz D.* Phylostratigraphic tracking of cancer genes suggests a link to the emergence of multicellularity in metazoan // *BMC Biol.* 2010. V. 8. P. 66.
- Du Y., Hou Y., Shi Y. et al.* Long non-coding RNA *ELFN1-AS1* promoted colon cancer cell growth and migration via the miR-191-5p/special AT-rich sequence-binding protein axis // *Front. Oncol.* 2021. V. 10. P. 588360.
- Durante F.* Nesso fisio-patologico tra la struttura dei nei materni e la genesi di alcuni tumori maligni // *Arch. Memor. Observ. Chir. Prat.* 1874. V. 11. P. 217.
- Egeblad M., Nakasone E.S., Werb Z.* Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism // *Dev. Cell.* 2010. V. 18. P. 884–901.
- 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 // *Abs. First Int. Conf. on Gene Regulation, Oncogenesis, and AIDS* (Loutráki, Greece, September 15–21, 1989). Loutráki: 1990.
- Ewald P.W.* Evolution of infectious disease. Oxford, N.Y.: Oxford Univ. Press, 1994. 320 p.
- Fernandez A.A., Morris M.R.* Mate choice for more melanin as a mechanism to maintain functional oncogene // *PNAS USA.* 2008. V. 105. P. 13503–13507.
- Flajnik M.F., Kasahara M.* Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures // *Nat. Rev. Genet.* 2010. V. 11 (1). P. 47–59.
- 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.
- Galis F., Metz J.A.J., van Alphen J.J.M.* Development and evolutionary constraints in animals // *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2018. V. 49. P. 499–522.
- Garcia-Ovejero D., Arevalo-Martin A., Paniagua-Torija B. et al.* The ependymal region of the adult human spinal cord differs from other species and shows ependymoma-like features // *Brain.* 2015. V. 138. P. 1583–1597.
- Gatenby R.A.* A change of strategy in the war on cancer // *Nature.* 2009. V. 459. P. 508–509.
- Gatenby R.A., Silva A.S., Gillies R.J., Frieden B.R.* Adaptive therapy // *Cancer Res.* 2009. V. 69. P. 4894–4903.
- Gold P., Freedman S.O.* Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by

- immunological tolerance and absorption techniques // J. Exp. Med. 1965. V. 121 (3). P. 439–462.
- Goldschmidt R.* The material basis of evolution. New Haven: Yale Univ. Press, 1940. 436 p.
- Gould S.J.* Ontogeny and phylogeny. Cambridge: The Belknap Press of Harvard Univ. Press, 1977a. 520 p.
- Gould S.J.* The return of hopeful monsters // Nat. Hist. 1977b. V. 86. P. 22–30.
- Gould S.J.* Is a new and general theory of evolution emerging? // Paleobiology. 1980. V. 6 (1). P. 119–130.
- Graham J.* Cancer selection. The new theory of evolution. Lexington: Aculeus Press Inc., 1992. 226 p.
- Grozinger L., Amos M., Gorochowski T.E. et al.* Pathways to cellular supremacy in biocomputing // Nat. Commun. 2019. V. 10 (1). P. 5250.
- Guo Y., Wu Z., Shen S. et al.* Nanomedicines reveal how *PBOV1* promotes hepatocellular carcinoma for effective gene therapy // Nat. Commun. 2018. V. 9 (1). P. 3430.
- HajiEsmailpoor Z., Fayazi A., Teimouri M., Tabnak P.* Role of long non-coding RNA *ELFN1-AS1* in carcinogenesis // Discov. Oncol. 2024. V. 15. P. 74.
- Hall B.K.* Evo-Devo: evolutionary developmental mechanisms // Int. J. Dev. Biol. 2003. V. 47. P. 491–495.
- Hamilton D.H., David J.M., Dominguez C., Palena C.* Development of cancer vaccines targeting Brachyury, a transcription factor associated with tumor epithelial-mesenchymal transition // Cells Tissues Organs. 2017. V. 203 (2). P. 128–138.
- Harris J.R.* The evolution of placental mammals // FEBS Lett. 1991. V. 295. P. 3–4.
- Hendrix M.J.C., Lurie R.H.* The convergence of embryonic and cancer signaling pathways: role in tumor cell plasticity // FASEB J. 2007. V. 21 (5). P. A32.
- Hendrix M.J.C., Seftor E.A., Seftor R.E.B. et al.* Reprogramming metastatic tumor cells with embryonic microenvironment // Nat. Rev. Cancer. 2007. V. 7. P. 246–255.
- Hnisz D., Schuijers J., Lin C.Y. et al.* Convergence of developmental and oncogenic signaling pathways at transcriptional super-enhancers // Mol. Cell. 2015. V. 58. P. 1–9.
- Honjo S., Doran H.E., Stiller C.A. et al.* Neuroblastoma trends in Osaka, Japan, and Great Britain 1970–1994, in relation to screening // Int. J. Cancer. 2003. V. 103. P. 538–543.
- Huang J., Yuan W., Chen B. et al.* lncRNA *ELFN1-AS1* upregulates TRIM29 suppressing miR-211-3p to promote gastric cancer progression // Acta Biochim. Biophys. Sin. 2023. V. 55 (3). P. 484–497.
- Jie Y., Ye L., Chen H. et al.* *ELFN1-AS1* accelerates cell proliferation, invasion and migration via regulating miR-497-3p/CLDN4 axis in ovarian cancer // Bioengineered. 2020. V. 11 (1). P. 872–882.
- Karnaukhova I.K., Polev D.E., Krukovskaya L.L. et al.* A new cancer/testis long noncoding RNA, the *OTP-AS1* RNA // Sci. Rep. 2024. In press.
- Kong Q., Han J., Deng H. et al.* miR-431-5p alters the epithelial-to-mesenchymal transition markers targeting *URO28* in hepatoma cells // Onco Targets Ther. 2018. V. 11. P. 6489–6503.
- Koonin E.V.* Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics // Annu. Rev. Genet. 2005. V. 39. P. 309–338.
- 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 tumours // Med. Hypotheses. 1996. V. 46 (2). P. 81–84.
- Kozlov A.P.* The possible evolutionary role of tumors in the origin of new cell types // Med. Hypotheses. 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. Boston: Elsevier—Acad. Press, 2014. 248 p.
- Kozlov A.P.* Expression of evolutionarily novel genes in tumors // Infect. Agent Cancer. 2016. V. 11. P. 34.
- Kozlov A.P.* The role of heritable tumors in evolution of development: a new theory of *carcino-evo-devo* // Acta Naturae. 2019a. V. 11 (4). P. 65–72.
- Kozlov A.P.* Evolution by tumor neofunctionalization: the role of tumors in the origin of new cell types, tissues and organs. Beijing, China: China Sci. Publ. & Media Ltd., 2019b. 200 p.
- Kozlov A.P.* Mammalian tumor-like organs. 1. The role of tumor-like normal organs and atypical tumor organs in the evolution of development (*carcino-evo-devo*) // Infect. Agent Cancer. 2022a. V. 17. P. 2.
- Kozlov A.P.* Mammalian tumor-like organs. 2. Mammalian adipose has many tumor features and obesity is a tumor-like process // Infect. Agent Cancer. 2022b. V. 17. P. 15.
- Kozlov A.P.* Biological computation and compatibility search in the possibility space as the mechanism of complexity increase during progressive evolution // Evol. Bioinf. 2022c. V. 18. P. 1–5.
- Kozlov A.P.* The theory of *carcino-evo-devo* and its non-trivial predictions // Genes. 2022d. V. 13 (1). P. 2347.
- Kozlov A.P.* Mammalian adipose has many tumor features, which suggests the possible way of its evolutionary origin // Proc. Am. Ass. Cancer Res. Annu. Meet. (New Orleans, April 8–13, 2022) / Cancer Res. 2022e. V. 82 (12\_Suppl.). № 6077.
- Kozlov A.P.* *Carcino-evo-devo*, a theory of the evolutionary role of hereditary tumors // Int. J. Mol. Sci. 2023a. V. 24 (10). P. 8611.
- Kozlov A.P.* Diagrams describing the evolution of gene expression, the emergence of novel cell types during evolution, and *evo-devo* // Gene Expression. 2023b. V. 22 (3). P. 262–269.
- Kozlov A.P.* Structural complexity growth as a fundamental law of nature. Multilevel increase in complexity, frozen accidents, and transitory forms in macroevolution // Палеонтол. журн. 2024. в печати.
- 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 // Abstr. Annu. Meet. Spons. Lab. Tumor Cell Biol. Bethesda, Maryland: National Cancer Institute (US), 1992.
- Kozlov A.P., Galachyants Y.P., Dukhovlinov I.V. *et al.* Evolutionarily new sequences expressed in tumors // Infect. Agent Cancer. 2006. V. 1. P. 8.
- Kramer B.S. The science of early detection // Urol. Oncol. 2004. V. 22. P. 344–347.
- Kramer B.S., Croswell J.M. Cancer screening: the clash of science and intuition // Annu. Rev. Med. 2009. V. 60. P. 125–137.
- Krukovskaja L.L., Baranova A., Tyezelova T. *et al.* Experimental study of human expressed sequences newly identified *in silico* as tumor specific // Tumour Biol. 2005. V. 26 (1). P. 17–24.
- Kurlak L.O., Knöfler M., Mistry H.D. Lumps & Bumps: common features between placental development and cancer growth // Placenta. 2017. V. 56. P. 2–4.
- Lala P.K., Nandi P., Hadi A., Halari C. A crossroad between placental and tumor biology: what have we learnt? // Placenta. 2021. V. 116. P. 12–30.
- Li Y., Gan Y., Liu J. *et al.* Downregulation of MEIS1 mediated by ELFN1-AS1/EZH2/DNMT3a axis promotes tumorigenesis and oxaliplatin resistance in colorectal cancer // Signal Transduct. Target. Ther. 2022. V. 7. P. 87.
- Liu J., Liu Y., Gao F. *et al.* Comprehensive study of a novel immune-related lncRNA for prognosis and drug treatment of cervical squamous cell carcinoma // Am. J. Transl. Res. 2021. V. 13 (10). P. 11771–11785.
- Ma Y., Zhang P., Wang F. *et al.* The relationship between early embryo development and tumorigenesis // J. Cell Mol. Med. 2010. V. 14. P. 2697–2701.
- Ma G., Li G., Gou A. *et al.* Long non-coding RNA ELFN1-AS1 in the pathogenesis of pancreatic cancer // Ann. Transl. Med. 2021. V. 9 (10). P. 877.
- Ma C., Li C., Ma H. *et al.* Pan-cancer surveys indicate cell cycle-related roles of primate-specific genes in tumors and embryonic cerebrum // Genome Biol. 2022. V. 23 (1). P. 251.
- 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. Rep. 2019. V. 9. P. 16410.
- Markert C.L. Neoplasia: a disease of cell differentiation // Cancer Res. 1968. V. 28. P. 1908–1914.
- Matyunina E.A., Emelyanov A.V., Kurbatova T.V. *et al.* Evolutionarily novel genes are expressed in transgenic fish tumors and their orthologs are involved in development of progressive traits in humans // Infect. Agent Cancer. 2019. V. 14 (46). P. 1–14.
- Maynard Smith J., Burian R., Kauffman S. *et al.* Developmental constraints and evolution // Quart. Rev. Biol. 1985. V. 60. P. 265–287.
- McLysaght A., Hurst L.D. Open questions in the study of de novo genes: what, how and why? // Nat. Rev. Genet. 2016. V. 17 (9). P. 567–578.
- Mead L.S. Transforming our thinking about transitional forms // Evol. Ed. Outreach. 2009. V. 2. P. 310–314.
- Mi S., Lee X., Li X. *et al.* Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis // Nature. 2000. V. 403. P. 785–789.
- Micalizzi D.S., Farabaugh S.M., Ford H.L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression // J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. 2010. V. 15. P. 117–134.
- Moczek A.P., Sultan S., Foster S. *et al.* The role of developmental plasticity in evolutionary innovation // Proc. Roy. Soc. B. 2011. V. 278. P. 2705–2713.
- Myers C.E., Hoelzinger D.B., Truong T.N. *et al.* Chemotherapy can induce weight normalization of morbidly obese mice despite undiminished ingestion of high fat diet // Oncotarget. 2017. V. 8 (3). P. 5426–5438.
- Nekliudova U.A., Schwaha T.F., Kotenko O.N. *et al.* Three in one: evolution of viviparity, coenocytic placenta and polyembryony in cyclostome bryozoans // BMC Ecol. Evol. 2021. V. 21. P. 54.
- Nowell P.C. The clonal evolution of tumor cell populations // Science. 1976. V. 194. P. 23–28.
- Nowell P.C. Mechanisms of tumor progression // Cancer Res. 1986. V. 46. P. 2203–2207.
- Ohno S. Evolution by gene duplication. N.Y.: Springer-Verlag, 1970. 150 p.
- Ostrovsky A.N., Lidgard S., Gordon D.P. *et al.* Matrotrophy and placentation in invertebrates: a new paradigm // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 2016. V. 91. P. 673–711.
- Palena C., Poley D.E., Tsang K.Y. *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.
- Paun G., Rozenberg G., Salomaa A. DNA computing: new computing paradigms. N.Y.: Springer-Verlag, 1998. 402 p.
- Pan T., Wu R., Liu B. *et al.* PBOV1 promotes prostate cancer proliferation by promoting G<sub>1</sub>/S transition // Onco Targets Ther. 2016. V. 9. P. 787–795.
- Poley D.E., Karnaukhova I.K., Krukovskaya L.L., Kozlov A.P. ELFN1-AS1: a novel primate gene with possible microRNA function expressed predominantly in human tumors // BioMed Res. Int. 2014. V. 2014. P. 398097.
- Rothschild B.M., Tanke D.H., Helbling I.M., Martin L.D. Epidemiologic study of tumors in dinosaurs // Naturwissenschaften. 2003. V. 90. P. 495–500.
- 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.
- Schlom J., Palena C.M., Kozlov A.P., Tsang K.-Y. Brachyury polypeptides and methods for use. Patent US8188214B2. USA, 2012.

- Sinkala M.* Mutational landscape of cancer-driver genes across human cancers // *Sci. Rep.* 2023. V. 13. Art. 12742.
- Sokolenko A.P., Imyanitov E.N.* Molecular diagnostics in clinical oncology // *Front. Mol. Biosci.* 2018. V. 5. P. 76.
- Tollis M., Schneider-Utaka A.K., Maley C.C.* The evolution of human cancer gene duplications across mammals // *Mol. Biol. Evol.* 2020. V. 37 (10). P. 2875–2886.
- Topczewska J.M., Postovit L.-M., Margaryan N.V. et al.* Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness // *Nat. Med.* 2006. V. 12 (8). P. 925–932.
- Uller T., Feiner N., Radesma R. et al.* Developmental plasticity and evolutionary explanations // *Evol. Dev.* 2020. V. 22 (1–2). P. 47–55.
- Valentine J.W.* The evolution of multicellular plants and animals // *Sci. Amer.* 1978. V. 239. P. 140–146, 148–149, 150–153, 156–158.
- van Oss S.B., Carvunis A.-R.* *De novo* gene birth // *PLoS Genet.* 2019. V. 15 (5). P. e1008160.
- Vickaryous M.K., Hall B.K.* Human cell type diversity, evolution, development, and classification with special reference to cells derived from neural crest // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2006. V. 81. P. 425–455.
- Wang L., Niu C.H., Wu S. et al.* PBOV1 correlates with progression of ovarian cancer and inhibits proliferation of ovarian cancer cells // *Oncol. Rep.* 2016. V. 35. P. 488–496.
- Warner J.F., Lyons D.C., McClay D.R.* Left-right asymmetry in the sea urchin embryo: BMP and the asymmetrical origins of the adult // *PLoS Biol.* 2012. V. 10. P. e1001404.
- Weisman C.M.* The origins and functions of *de novo* genes: against all odds? // *J. Mol. Evol.* 2022. V. 90. P. 244–257.
- Williams G.C., Nesse R.M.* The dawn of Darwinian medicine // *Q. Rev. Biol.* 1991. V. 66. P. 1–22.
- Xue C., Zhong Z., Ye S. et al.* Association between the overexpression of *PBOV1* and the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma // *Oncol. Lett.* 2018. V. 16. P. 3401–3407.
- Yamamoto K., Hayashi Y., Hanada R. et al.* Mass screening and age-specific incidence of neuroblastoma in Saitama Prefecture, Japan // *J. Clin. Oncol.* 1995. V. 13. P. 2033–2038.
- Zhai L.Q., Wang X.X., Qu C.X. et al.* A long non-coding RNA, *ELFN1-AS1*, sponges *miR-1250* to upregulate *MTA1* to promote cell proliferation, migration and invasion, and induce apoptosis in colorectal cancer // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2021. V. 25. P. 4655–4667.
- 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.
- Zheng C., Wei Y., Zhang P. et al.* CRICPR-Cas9-based functional interrogation of unconventional translatoome reveals human cancer dependency on cryptic non-canonical open reading frames // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2023. V. 30. P. 1878–1892.

## A Theory of the Evolutionary Role of Hereditary Tumors (*carcino-evo-devo*): The History and the Current State. Part 3. The Current State of *carcino-evo-devo* Theory and its Relationships with other Biological Theories

A. P. Kozlov <sup>a, b, c, \*</sup>

<sup>a</sup>*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

<sup>b</sup>*Biomedical Center, St. Petersburg, Russia*

<sup>c</sup>*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia*

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

After publishing the monograph “Evolution by Tumor Neofunctionalization”, the author continued developing a theory of the evolutionary role of tumors in subsequent publications, in which a theory assumed its current state. In this part of the article, the author reviews the current state of a theory of the evolutionary role of tumors (*carcino-evo-devo*) and its relationship with other biological theories.

**Keywords:** hereditary tumors, progressive evolution, carcinoembryonic, *evo-devo*, *carcino-evo-devo* theory

УДК 577.29

## АФФИННЫЕ ЯКОРЯ: СРАВНЕНИЕ ПОПУЛЯРНЫХ ТЕГОВ В СОВРЕМЕННОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

© 2024 г. П. А. Крюкова<sup>1</sup>, О. И. Киселева<sup>1</sup>, И. Ю. Курбатов<sup>1</sup>, Е. В. Поверенная<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

\*e-mail: inst@ibmc.msk.ru

Поступила в редакцию 14.05.2024 г.

После доработки 14.05.2024 г.

Принята к публикации 14.05.2024 г.

В функционировании живых систем ключевую роль играют межмолекулярные контакты, осуществляемые в том числе через белок-белковые взаимодействия. Одним из основных методов их изучения является аффинная очистка, сопряженная с масс-спектрометрией (AP-MS). Этот подход невозможен без совершенствования эпитопных меток, представляющих собой короткие генетические модификации белков, за которые впоследствии удастся “выловить” целевые молекулы. Обзор направлен на сравнение самых популярных эпитопных меток, а также на обсуждение традиционных и инновационных исследований, в которых они применяются. Основная задача данной работы — оценить, насколько близко научное сообщество к созданию “оптимальной” метки, удовлетворяющей потребностям большинства исследователей, применяющих теги для решения широкого спектра молекулярно-биологических задач.

**Ключевые слова:** аффинная очистка, теги, эпитопы, белок-белковые взаимодействия

DOI: 10.31857/S0042132424040037, EDN: PPQOLU

### ВВЕДЕНИЕ

Расшифровка биологических процессов основана на определении межмолекулярных контактов, которые осуществляются в том числе посредством белок-белковых взаимодействий. Базовым способом получения интерактомных данных являются методы на основе аффинной очистки, сопряженной с масс-спектрометрией AP-MS (affinity purification with mass spectrometry) (Dunham et al., 2012). Развитие данного подхода невозможно без усовершенствования меток — основных элементов в дизайне AP-MS-экспериментов. Метка представляет собой генетическую модификацию белка: это “пришитая” преимущественно (хотя и не обязательно) к его N- либо C-концу последовательность, кодирующая полипептид с необходимыми свойствами. Благодаря метке возможна идентификация белка, для которого недоступны специфические антитела. Главной характеристикой метки является ее высокая аффинность к лиганду — на этом и основана очистка целевого белка. Другое важное качество метки — ее компактность, которая позволяет максимально сохранить нативные свойства целевого белка. Широко используются метки и для выделения и очистки целевого белка с помощью методов иммунопреципита-

ции (Muñoz, Castellano, 2018), включая и тандемную аффинную очистку TAP (tandem affinity purification) (Low, Lee, 2023).

На данный момент разработано более 50 тегов (не считая флуоресцентных меток, обсуждение которых выходит за рамки данного обзора) (Kimple et al., 2013). Чтобы сориентировать исследователя во всем их многообразии, регулярно выходят исследования, рапортуящие о создании новых белковых тегов (Terpe, 2003; Kimple et al., 2013; Mahmoudi Gomari et al., 2020). При этом в лабораторной практике спектр используемых тегов зачастую сужен до десятка наиболее проверенных временем меток. Интуитивно выбор останавливается на теге, свойства которого известны и предсказуемы, в противном случае процесс подбора тега напоминает гибрид искусства и проверки на удачливость.

Цель данного обзора — сравнение самых популярных аффинных меток и обсуждение традиционных и необычных исследований с их применением. Работа призвана отразить тренды разработки и оценить, насколько профессиональное сообщество близко к созданию “оптимального” тега, который бы удовлетворил потребности большинства биологов, использующих молекулярные якоря в своих исследовани-

ях. Лаконичные паспорта тегов, упорядоченные в соответствии с результатами литературного поиска и учитывающие предпочтения специалистов, рутинно использующих теги, формируют дорожную карту, которая позволит извлечь максимальную пользу для омикс-исследований.

### КЛАССИФИКАЦИЯ ТЕГОВ

Среди меток выделяют эпитопы, которые представлены коротким пептидом, и крупные аффинные теги, которые являются частью белка (доменом) или непосредственно самим белком (Mishra, 2020). Несмотря на то что все теги по определению обладают высоким сродством к конкретным лигандам, крупные метки принято называть аффинными тегами (что, по сути, избыточно). Более точное название — белковый или доменный тег — для описания крупных меток (размер которых может достигать 20–120 кДа) используется реже.

Крупные белковые аффинные теги используются преимущественно для очистки целевого белка (Kimple et al., 2013). К крупным тегам относятся СВР (кальмодулин-связывающий белок), MBD (мальтозо-связывающий домен) и GST (глутатион-S-трансфераза). Все они обладают специальными сайтами связывания для низкомолекулярных лигандов, иммобилизованных на смолах.

Интересное свойство аффинных тегов состоит в том, что они могут увеличивать растворимость таргетного белка за счет привлечения шаперонов (в случае MBP и NusA), либо сами проявлять шаперон-подобную активность и защищать от электростатического отталкивания (Costa et al., 2014). Это свойство тегов особенно полезно, если в экспрессионной системе в связи со спецификой работы ферментов необходимый белок оказывается нерастворим. Например, в *E. coli* достаточного уровня экспрессии растворимой формы удается достичь лишь для 25–50% случаев (Pacheco et al., 2012).

Белковые теги не должны мешать правильному фолдингу итогового fusion-белка. Для сохранения функциональности целевой молекулы теги зачастую удаляют после очистки, однако это не гарантирует сохранения интактной структуры и, как следствие, функциональности и растворимости. Кроме того, массивные белковые теги создают значительную метаболическую нагрузку на экспрессионные системы, тем самым отдаляя их от нативных.

Популярность набирают компактные теги-эпитопы (His-, Myc-, FLAG-теги и пр.) с молекулярной массой около 1 кДа: они чаще

применяются в иммунохимических методах (вестерн-блот, иммунопреципитация и др.), а их лигандами являются антитела (Brizzard, Chubet, 2001). Из-за небольшой длины кодирующей последовательности эпитопы меньше влияют на структуру белка и его свойства, и в этом их большое преимущество. Пептидные метки более универсальны и меньше влияют на структуру и функции целевых белков. Кроме того, короткие теги в общем случае повышают растворимость тегируемых белков независимо от состояния сворачивания.

В силу большей универсальности дальнейшее повествование будет сфокусировано преимущественно на особенностях тегов-эпитопов, их зоне применения, а также сильных сторонах и ограничениях, которые только предстоит преодолеть.

### ХАРАКТЕРИСТИКИ НАИБОЛЕЕ ПОПУЛЯРНЫХ ТЕГОВ

Мы сопоставили описанные в литературе теги-эпитопы по востребованности (Kimple et al., 2013) и построили гистограмму, отображающую количество публикаций по данным PubMed, для часто упоминаемых меток (рис. 1). Хит-лист тегов включает в себя S-tag, Myc-tag, HA-tag, Strep-tags и FLAG-tag. Чемпионом по встречаемости является His-tag и его производные. Среди эпитопов-аутсайдеров можно выделить две категории: часть пептидных тегов разработана достаточно давно (как правило, в 1990-е гг.), но применялась лишь в единичных экспериментах, а, значит, не выдержала проверку временем (в частности, AU1 (Goldstein et al., 1992) и AU5 (Crespo et al., 1997)), другие разработаны не так давно, отчего могли попросту не успеть набрать достаточной популярности (например, RA-tag (Lee et al., 2020) или M-tag (Zhang et al., 2023)).

#### HIS-ТЕГ

Пожалуй, наиболее часто используемым является His-тег (или 6xHis) (Lilius et al., 1991): по данным PubMed на 6.05.2024, опубликовано более 2.5 тысяч работ с применением His-тега. Своей популярностью метка обязана способности гистидина координировать ионы металлов. Используемая для очистки целевого белка металлообменная хроматография значительно дешевле, чем подложки с антителами. Хотя антитела к His-тегу также коммерчески доступны и расширяют сферу его применения. Наибольшей аффинностью традиционно обладают ионы никеля, однако возможны варианты взаимодействия с другими металлами ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,

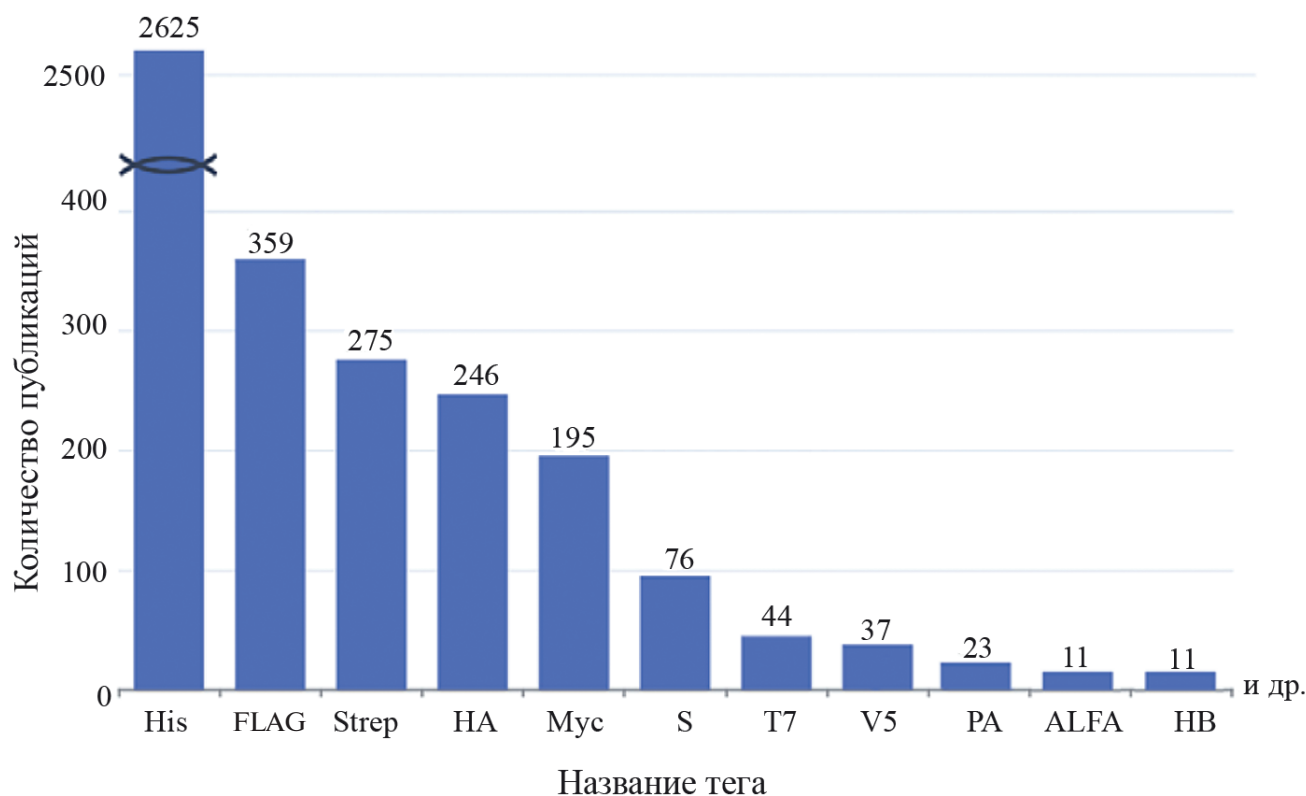


Рис. 1. Гистограмма распределения публикаций с упоминанием тегов-эпитопов по встречаемости в репозитории PubMed.

$\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ). Переход к альтернативному металлу может улучшить очистку целевого белка, и это один из вариантов оптимизации протокола наряду с изменением положения тега на С- либо N-конце белка (Liu et al., 2003; Krupka et al., 2016). Интересно, что размещение His-тега в С-конце последовательности защищает белок от убиквитинирования, чего не наблюдается при тегировании в N-конце (Park et al., 2015). В случае некоторых белков His-тег может негативно влиять на его растворимость (Woestenenk et al., 2004).

У животных и растений остатков гистидина в белках существенно больше, чем у бактерий, особенно в белках, хелатирующих металлы. Для того, чтобы избежать неспецифического связывания с другими белками, увеличивается число остатков гистидина в метке (в среднем используется от 6 до 10 а.к.о.). Однако такой подход следует применять с осторожностью, поскольку это может повлиять на активность белка, как было показано в эксперименте на цитохроме P450 (Aslantas, Surmeli, 2019), или на его конформацию, например, из-за образования белковых агрегатов (Ayoub et al., 2023).

Чтобы решить проблему влияния большого числа остатков гистидина на характеристики белка и увеличить специфичность связывания, можно использовать комбинацию из нескольких тегов, например Strep- и His-тега (Tsukamoto et al., 2024). Комбинирование пары тегов получило название тандемной аффинной очистки TAP. Этот подход часто применяется совместно с масс-спектрометрией — TAP-MS. Последовательная очистка на двух аффинных сорбентах выполняет роль дополнительного фильтра и позволяет добиться требуемой степени чистоты.

Другим недостатком метки является довольно низкая специфичность вестерн-блота (Pao et al., 2022).

Альтернативный вариант для снижения воздействия тега на конформацию белка использован в недавней работе (Ino et al., 2023), в рамках которой авторы модифицировали канонический His-тег, добавив к трем остаткам гистидина четыре другие аминокислоты (HiP4-тег). Тандемная методика очистки предполагала последовательное использование металлообменной хроматографии и иммунопреципитации со специально синтезированными к новому тегу анти-

телями. С новым тегом удалось открыть новые мишени взаимодействия целевого белка — это позволяет заявить о высокой специфичности метки.

### FLAG-ТЕГ

Искусственно сконструированная синтетическая последовательность FLAG-тега DYKDDDDK обладает наибольшей гидрофильностью среди всех эпитопов (Zhao et al., 2013). Благодаря этому, FLAG-тег минимально влияет на активность таргетного белка. Также считается, что FLAG-тег обладает наибольшей специфичностью (Gao et al., 2023). Еще одно полезное свойство — наличие на его N-конце сайта узнавания энтерокиназы (Einhauer, Jungbauer, 2001), что позволяет довольно просто убрать тег после очистки белка. Следует учитывать, что активность энтерокиназы зависит от аминокислотной последовательности после сайта узнавания, поэтому она может работать не со всеми белками (Zhao et al., 2013).

К недостаткам метки относится то, что в некоторых организмах, как показано на насекомых (Schmidt et al., 2012), ее последовательность может подвергаться посттранскрипционным модификациям, вследствие чего ухудшается качество узнавания тега антителами. Также FLAG-тег может давать не самые высокие показатели выхода очищенного белка (Kimple et al., 2013).

Аналогично His-тегу, популярная модификация в виде тройного FLAG-тега (3×FLAG) одновременно обеспечивает лучшую детекцию и очистку белка (Hernan et al., 2000), но может повлиять на его экспрессию. Именно эта модификация использовалась для изучения локализации серотониновых рецепторов (Thompson et al., 2023).

FLAG-тег довольно часто используется для разработки оригинальных методик, например технологии SKI-TRIP (single copy knockin translating ribosome immunoprecipitation) (Wester et al., 2023), с помощью которой изучают тканезависимую разницу в трансляции белка. Флуоресцентный иммуносенсор Quenchbody используется для изучения экспрессии белков с меткой FLAG в реальном времени (Gao et al., 2023).

В 2024 г. к FLAG-тегу получены антитела из растений (Kong et al., 2024). Как утверждают авторы, их технология позволяет достигнуть большего выхода антител. Физиология растений не предполагает синтез иммуноглобулинов, но с помощью генной инженерии ученые получили возможность синтезировать так называемые plantibodies (Oluwayelu, Adebisi, 2016).

На примере FLAG-тега показано, что специфичность очистки белка может варьировать в зависимости не только от выбора тега и условий элюции, но и от варианта антитела (Marchetti et al., 2023), что, впрочем, характерно и для других меток.

### STREP-ТЕГИ

Стрептавидин-связывающая метка (Strep-tag) — это небольшой пептид, который был впервые использован в качестве аффинной метки в начале 1990-х гг. (Schmidt, Skerra, 1993) и усовершенствование которого ведется до сих пор. В основе технологии лежит высокая аффинность стрептавидина к биотину (витамину Н), которая превышает показатели взаимодействия антиген—антитело. В качестве сорбента используется стрептавидин или его модификации, которые можно регенерировать и использовать многократно. Элюирование проводится в мягких условиях с использованием конкурентного связывания биотина (Kosobokova et al., 2016). Небольшие по размеру и практически инертные Strep-теги оказывают малое влияние на функцию белка, а физиологически близкая к нативным условиям элюция позволяет использовать метки для различных типов белков. Эти метки используются как для выделения и очистки белка, так и в интерактивных исследованиях (Li et al., 2021).

Из-за ограничений в выборе локализации тега (доступен только C-конец), а также из-за сниженной аффинности был предложен тег Strep II (Schmidt, Skerra, 2007), который одинаково хорошо работает как на C-, так и на N-концах рекомбинантного белка. Кроме того, усовершенствован стрептавидин — Strep-Tactin, что позволило повысить эффективность связывания с сорбентом и снизить потери целевого продукта. Однако в таких условиях эффективность биотина недостаточна.

Примечательные результаты получены при использовании дестиобиотина для элюирования желаемого продукта. Полученная система долгое время широко использовалась для очистки рекомбинантных белков из бактерий, дрожжей, клеток млекопитающих, растений и насекомых, инфицированных бакуловирусом (Terpe, 2003). Однако низкая концентрация одного из компонентов (Strep-tag или Strep-Tactin) затрудняла использование этой системы в случае низкой экспрессии рекомбинантного белка и/или при использовании больших объемов буферных растворов.

Для преодоления этих ограничений разработана оптимизированная система Twin-Strep-

tag II. Метка представляет собой два Strep-тега, связанных коротким линкером. Как и в предыдущем варианте, матрицей служит Strep-Tactin. Система обеспечивает эффективную очистку нужного белка даже в случае большой рекомбинантной конструкции или при использовании объемных образцов с низкой концентрацией белка (Schmidt et al., 2013).

#### НА-ТЕГ

Часто используемый НА-тег представляет собой компактный участок молекулы поверхностного гемагглютинаина вируса гриппа (YPYDVPDYA, 98–106 а.к.о.), что минимизирует риски искажения свойств фьюжн-белков. НА-тег считается высокоиммунореактивным тегом, рутинно применяемым для изолирования, очистки, детекции и мониторинга белков (Schembri et al., 2007; Moon et al., 2012). У тега репутация сбалансированного по параметрам специфичности и выхода связывания. К удобству использования НА-тега добавляется тот факт, что его последовательность содержит в себе сайт узнавания каспазы (Schembri et al., 2007). В качестве недостатка следует отметить, что НА-тег, как и другие эпитопные метки, может давать невысокий выход связывания белка (Kimple et al., 2013).

Считается, что увеличение плотности тега, т. е. увеличение количества повторов последовательности тега в метке, несмотря на их большой размер, помогает в выделении белков, экспрессирующихся в клетке на низком уровне. Это показано на примере НА- и Мус-тегов. Генетические конструкции, включающие десять повторов каждого из них, получили забавное, но очень точное название — спагетти-монстр (Hortua Triana et al., 2018).

#### МУС-ТЕГ

Мус-тег — это участок кодирующей последовательности протоонкогена и фактора транскрипции с-Мус (MacMillan et al., 2011), состоящего из 10 аминокислот (EQKLISEEDL). Мус-тег очень популярен прежде всего из-за своей компактности, которая позволяет минимизировать влияние на функции тегированного белка и физиологию всей клеточной системы.

На С-конце последовательности этот тег может увеличивать экспрессию белка и защищать белки от убиквитинирования (Mikalsen et al., 2005). Увеличенная экспрессия таргетного белка естественным образом облегчает его детекцию, но имеет и свои негативные последствия. Оверэкспрессированный белок взаимодействует с не-

характерными для него партнерами (например, белками теплового шока), что может обернуться неверными выводами о функциях целевого белка в клетке. Мус-тег стоит с осторожностью применять для изучения секретируемых белков. Примечательно, что расположение метки сразу за сигнальным пептидом препятствует правильному прохождению белком секреторного пути (Zhao et al., 2013).

При всех обозначенных особенностях, Мус-тег считается подходящей меткой для большого набора иммунохимических методов (Zhao et al., 2013).

#### S-ТЕГ

S-тегирование подразумевает специфическое связывание 15-аминокислотного (KETAAAKFERENHMDs) S-тега (или S15) с S-белком, происходящим из рибонуклеазы А (Kim, Raines, 1993). Тег состоит из четырех положительно заряженных, трех отрицательно заряженных, трех незаряженных полярных и пяти неполярных аминокислот. Такой аминокислотный состав обеспечивает высокую растворимость пептида, его суммарный заряд близок к нейтральному уровню pH (Yadav et al., 2016).

S-тег применяется для одностадийной очистки (при использовании S-белка в качестве иммобилизованного лиганда) и колориметрической детекции меченых белков (Hackbarth et al., 2004). Недостаток S-системы — жесткие условия элюирования меченых белков (pH 2) (Zhao et al., 2013).

#### КОМБИНИРОВАННЫЕ ТЕГИ

Комбинированные теги используются для двухстадийной ТАР. Благодаря двум последовательным стадиям элюции достигается достаточная степень очистки белка. Изначально ТАР разработана для очистки рекомбинантных белков, разрушаемых в процессе выделения протеолитическими системами бактериальной клетки. В частности, к ним относится IGF-II — гормон белковой природы, влияющий на рост и дифференцировку клеток во многих тканях (главным образом, внутриутробно) (Hammarberg et al., 1989; Rozkov, Enfors, 2004). Для предотвращения деградации целевого белка по терминальным положениям предложена следующая стратегия: по одной различной аффинной метке пришивалось к N- и С-концам последовательности, и продуктом ТАР был целый белок. Впоследствии использование двух аффинных меток открыло возможность быстрой очистки

белковых комплексов в мягких условиях (Rigaut et al., 1999).

Сейчас существуют и используются комбинации из аффинных меток (Gully et al., 2003), аффинной и пептидной, двух пептидных. Каждая получаемая система обладает собственными особенностями, включая плюсы обоих тегов (Li, 2010). К примеру, для FLAG-Strep II-тег все этапы очистки могут быть проведены в одном буфере (Gloeckner et al., 2007), что позволяет выделять различные виды белков в бактериях (Fodor et al., 2004) и клетках млекопитающих (Gloeckner et al., 2009). Использование FLAG-His-тега позволяет сочетать детекцию белковых комплексов с помощью чувствительных антител к FLAG и сравнительно простую и недорогую очистку iMAC (DiCiommo et al., 2004). Низкий выход белка в случае высокоспецифичного FLAG-тега также может быть компенсирован в случае объединения с Мус- (Donaubauer et al., 2016; Mehrasa et al., 2023) или HA-тегами (Shestakova et al., 2017; Tagami, 2018). В частности, именно FLAG-HA использован в крупнейшем интерактомном проекте BioPlex для выявления белковых взаимодействий более чем для 14 тыс. белков (Huttlin et al., 2015, 2021).

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КЛЮЧЕВЫХ ЭПИТОПОВ

По определению, эпитопные теги — короткие последовательности, однако добавление даже десятка аминокислотных остатков может повлиять на характеристики тегированного белка (Bucher et al., 2002; Zhao et al., 2020): стабильность, растворимость, склонность к полимеризации и способность сохранить нативную конформацию.

Например, His-тег на N-конце белка в некоторых случаях может уменьшать его термическую стабильность (Booth et al., 2018) либо приводить к димеризации (Wu, Filutowicz, 1999). В эксперименте на дрожжевых белках метки Мус и GFP не влияли на свойства, в то время как 3×HA-тег уменьшал активность целевого продукта (Saiz-Baggetto et al., 2017).

Последовательность тега влияет на растворимость белка. Так, для плохо растворимых белков предпочтение отдается меткам, состоящим из гидрофильных аминокислот (Jo, 2022).

Важным критерием является также и положение метки в тегированной последовательности. Традиционно в целях минимизации воздействия на конформацию белка теги пришиваются либо на N-, либо на C-конец целевого продукта, хотя иногда ведется поиск оптимального места для

тега внутри последовательности (Bonanno et al., 2023). При терминальном положении метки возможно использование линкера, несущего сайт узнавания протеазы (среди популярных — TEV, тромбин). С помощью протеазы после очистки возможно отрезать уже ненужную последовательность тега, что может быть важно для нивелирования эффектов, оказываемых меткой на характеристики исследуемого белка. Однако использование протеаз увеличивает как стоимость, так и сложность эксперимента (Arnau et al., 2006). К тому же ферменты могут узнавать и расщеплять последовательности и внутри целевого белка (Jenny et al., 2003).

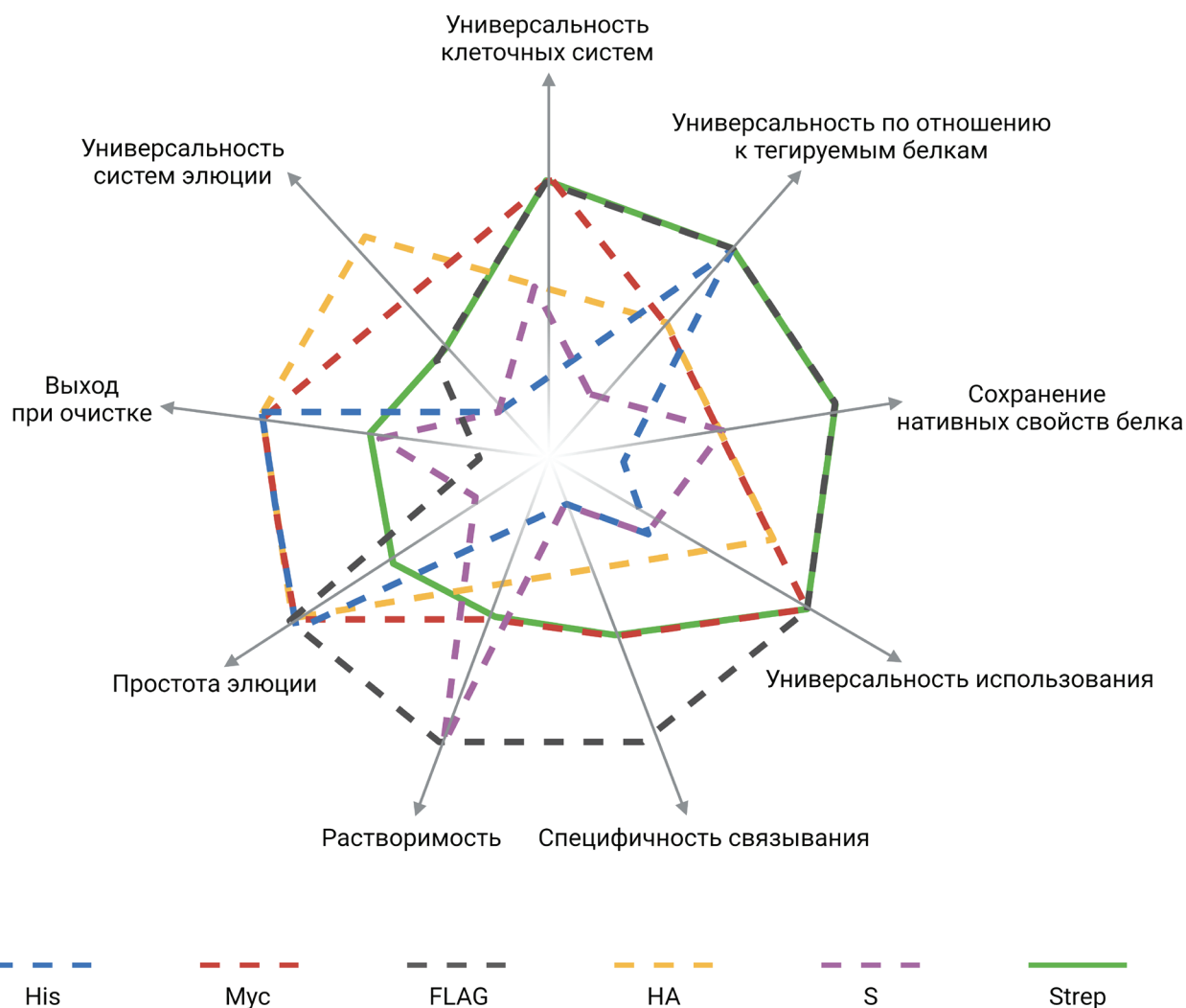
Условия элюции — также немаловажный фактор, поскольку принципиально сохранить структуру и функцию белка, выделить только целевой белок и в достаточном количестве. Предпочтение отдается легко удаляемым тегам (De Almeida et al., 2018), для которых применяется одностадийная очистка (Kinrade et al., 2020). Кроме того, идеальный тег должен иметь одинаково высокую эффективность очистки разными подходами — иммуннопреципитацией, вестерн-блотом и пр.

При выборе подходящей метки для каждого эксперимента необходимо учитывать и другие факторы: тип белка, характер системы экспрессии и последующее применение целевого белка (Tehseen et al., 2019).

На рис. 2 приведены ключевые суммирующие свойства для наиболее популярных меток: His-, Мус-, FLAG-, HA-, S- и Strep-тегов.

### СЕГОДНЯ И ЗАВТРА ЭПИТОПНЫХ МЕТОК

История применения эпитопных меток начинается с 1984 г., когда была предложена (Munro, Pelham, 1984) генетическая конструкция, в которой участок кодирующей последовательности субстанции Р (нейропептида, опосредующего взаимодействия между нейронами и иммунными клетками) пришит к таргетному белку теплового шока hsp70 из *Drosophila*. В дальнейшем конструкция узнавалась с помощью специфического моноклонального антитела. Параллельно другая группа исследователей занималась получением антител к одному из первых известных протоонкогенов — с-Мус — для изучения его свойств. В 1985 г. получен (Evan et al., 1985) эффективный пептид для мечения белков, хотя исследователи и не ставили себе такую цель изначально. Одними из первых также созданы теги из остатков повторяющихся аминокислот. В 1984 г. впервые описан Arg-тег (Smith et al., 1984), состоящий из пяти или шести остатков аргинина, который не нашел широкого при-



**Рис. 2.** Диаграмма-радар, характеризующая сильные и слабые стороны наиболее популярных эпитопов. Центр окружности соответствует наименьшим значениям, периферия — наибольшим.

менения. Противоположной ситуация оказалась для разработанного в 1988 г. и ставшего одним из самых популярных полигистидинового тега (His-тег). В это же время были предложены и другие популярные системы для детекции белков, например FLAG-тег (Hopp et al., 1988), HA-тег (Field et al., 1988) и Strep-тег (Schmidt, Skerra, 1993).

Множество доступных к приобретению меток является лучшей иллюстрацией тезиса о том, что идеального тега, подходящего к любому белку, пока не существует. Ограничения в универсальности использования того или иного тега могут быть следствием жестких условий элюции (например, для Muc-тега), результатом искажения функций получившегося fusion-белка по сравнению с целевым (как в случае His-тега) и многих других особенностей (Kimple et al.,

2013). Кажется очевидным, что для более чем 20 тыс. отличающихся по своим физико-химическим свойствам белков невозможно подобрать универсальный тег, не влияющий на нативные характеристики белка, его стабильность и проч. Однако для того, чтобы облегчить исследователю жизнь, не прекращается работа в направлении получения идеальной метки.

Теги последнего поколения, к примеру PepTag (Fagbadebo, Rothbauer, 2022) или ALFA-тег (Götzke et al., 2019), вместо обычных антител, связываются с наноантителами. Наноантитела, обладая однодоменной структурой, малым размером, высокой стабильностью и растворимостью, совершили революцию в сфере тегирования и выделения белков. Они используются для визуализации живых клеток, поскольку наноантитела можно связать с флуорофором (Pedreñez

et al., 2021). Флуоресцентно меченые наноанти-тела экспрессируются в качестве так называемых chromobodies (Traenkle et al., 2020). Объемная флуоресцентная метка переносится на не связанный непосредственно с белком агент, тем самым не препятствуя параметрам его экспрессии и стабильности.

Схожую цель создания идеальной метки преследовала разработанная в 2012 г. система SpyCatcher-SpyTag. Идея реализует прочное взаимодействие между эпитопом и лигандом за счет формирования пептидной связи. Помимо меченых белков, данная система используется для стабилизации белковых комплексов и даже при разработке вакцин (Hatlem et al., 2019). С использованием ортогональной для SpyCatcher-SpyTag системы SnooPCatcher-SnooTag можно исследовать белковые ассоциации из нескольких компонентов.

Дизайн новых тегов также нацелен на преодоление влияния метки на функциональность белка. В качестве решения предлагается составлять тег таким образом, чтобы его структура не изменяла структуру и свойства белка. Такой функционально нейтральной меткой является ALFA-tag (Götzke et al., 2019), что и отражено в названии тега, который представляет собой альфа-петлю. По заявлениям разработчиков ALFA-метки, она не влияет на сворачивание белка и другие его характеристики. Похожими свойствами обладает RA-tag, который образует  $\beta$ -поворот в связывающем кармане NZ-1. Эта уникальная конформация позволяет пептиду RA встраиваться в петли, образующие поворот в складчатом домене белка. Такое решение применяется в различных областях, включая очистку белка, вестерн-блоттинг и проточную цитометрию (Brown, Takagi, 2018).

Еще один вектор работы по усовершенствованию тегов направлен на уменьшение неспецифических взаимодействий при тегировании. В 2022 г. для достижения этой цели создан TD-пептид, состоящий из 9 аминокислот (Pao et al., 2022). Прочное связывание тега со специфическим антителом GD-26 обеспечивается как полярными, так и неполярными взаимодействиями. Полезная особенность этой метки заключается в том, что она не похожа ни на про-, ни на эукариотические белки, поскольку ее последовательность взята из архей. Таким образом снижается вероятность неспецифических кросс-взаимодействий.

Помимо движения в направлении универсализации эпитопов, улучшается эффективность меток и для решения конкретных задач. Например, hei-тег (high efficiency tag), созданный на основе Мус-тега, увеличивает эффективность CRISPR-редактирования (Thumberger et al., 2022).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эпитопы — это важный инструмент изучения белков, их функций, структур и партнеров по взаимодействиям. Несмотря на многочисленные обзоры (Wood, 2014; Kosobokova et al., 2016; Yadav et al., 2016; Mahmoudi Gomari et al., 2020), текущая практика свидетельствует, что научное сообщество еще находится в процессе создания идеального тега, который при малом размере имел бы высокую специфичность связывания, не менял бы свойств белков и был бы универсальным. От такой метки ожидают, что она будет удаляться с минимальными потерями целевого белка, без труда детектироваться иммуногистохимически, сохраняя близость к физиологическим условиям. Такой сферический тег в вакууме должен подходить для широкого спектра исследовательских задач — от наработки и очистки целевого белка вплоть до функциональной аннотации и поиска новых лекарств.

За сорокалетнюю историю эпитопов шесть из более 50 созданных тегов стали действительно востребованными (His, Мус, FLAG, HA, S и Strep). Эти метки имеют репутацию оптимальных для различных задач. Подходы с одновременным использованием нескольких меток зачастую нивелируют индивидуальные недостатки, хотя и повышают риски нарушения структуры и свойств белка.

Для взвешенного выбора подходящего тега в фокусе своих исследований мы собрали и проанализировали информацию о практическом использовании шести популярных тегов, упорядочив ее в формате радар-диаграммы. Такая наглядная иллюстрация видится нам дорожной картой, которая была бы полезна исследователям, решившим расширить горизонты своих молекулярно-биологических работ за счет тегов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Выполнение работ поддержано грантом Российского научного фонда № 21-74-10061.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- De Almeida J.M., Moure V.R., Müller-Santos M. et al. Tailoring recombinant lipases: keeping the His-tag favors esterification reactions, removing it favors hydrolysis reactions // *Sci. Rep.* 2018. V. 8 (1). P. 10000.
- Arnau J., Lauritzen C., Petersen G.E., Pedersen J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins // *Protein Expr. Purif.* 2006. V. 48 (1). P. 1–13.
- Aslantas Y., Surmeli N.B. Effects of N-terminal and C-terminal polyhistidine tag on the stability and function of the thermophilic P450 CYP119 // *Bioinorg. Chem. Appl.* 2019. V. 2019. P. 8080697.
- Ayoub N., Roth P., Ucurum Z. et al. Structural and biochemical insights into His-tag-induced higher-order oligomerization of membrane proteins by cryo-EM and size exclusion chromatography // *J. Struct. Biol.* 2023. V. 215 (1). P. 107924.
- Bonanno S.L., Sanfilippo P., Eamani A., et al. Constitutive and conditional epitope-tagging of endogenous G protein coupled receptors in *Drosophila* // *bioRxiv*. 2023.12.27.573472.
- Booth W.T., Schlachter C.R., Pote S. et al. Impact of an N-terminal polyhistidine tag on protein thermal stability // *ACS Omega*. 2018. V. 3 (1). P. 760–768.
- Brizzard B., Chubet R. Epitope tagging of recombinant proteins // *Curr. Protoc. Neurosci.* 2001. Ch. 5. Unit 5.8.
- Brown Z.P., Takagi J. The PA tag: a versatile peptide tagging system in the era of integrative structural biology // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018. V. 1105. P. 59–76.
- Bucher M.H., Evdokimov A.G., Waugh D.S. Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein // *Acta Crystallogr. D. Diol. Crystallogr.* 2002. V. 58 (3). P. 392–397.
- Costa S., Almeida A., Castro A. et al. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. P. 63.
- Crespo P., Schuebel K.E., Ostrom A.A. et al. Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product // *Nature*. 1997. V. 385. P. 169–172.
- DiCiommo D.P., Duckett A., Burcescu I. et al. Retinoblastoma protein purification and transduction of retina and retinoblastoma cells using improved alphavirus vectors // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004. V. 45 (9). P. 3320–3329.
- Donaubauer E.M., Law N.C., Hunzicker-Dunn M.E. Follicle-stimulating hormone (FSH)-dependent regulation of extracellular regulated kinase (ERK) phosphorylation by the mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase MKP3 // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291 (37). P. 19701–19712.
- Dunham W.H., Mullin M., Gingras A.-C. Affinity-purification coupled to mass spectrometry: basic principles and strategies // *Proteomics*. 2012. V. 12 (10). P. 1576–1590.
- Einhauer A., Jungbauer A. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2001. V. 49 (1–3). P. 455–465.
- Evan G.I., Lewis G.K., Ramsay G., Bishop J.M. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-Myc proto-oncogene product // *Mol. Cell. Biol.* 1985. V. 5 (12). P. 3610–3616.
- Fagbadebo F.O., Rothbauer U. Peptide-tag specific nanobodies for studying proteins in live cells // *Methods Mol. Biol.* 2022. V. 2446. P. 555–579.
- Field J., Nikawa J., Broek D. et al. Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method // *Mol. Cell. Biol.* 1988. V. 8 (5). P. 2159–2165.
- Fodor B.D., Kovács Á.T., Csáki R. et al. Modular broad-host-range expression vectors for single-protein and protein complex purification // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70 (2). P. 712–721.
- Gao Y., Zhao S., Zhang R. et al. Immunosensor for realtime monitoring of the expression of recombinant proteins during bioprocess // *Anal. Biochem.* 2023. V. 665. P. 115069.
- Gloeckner C.J., Boldt K., Schumacher A. et al. A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes // *Proteomics*. 2007. V. 7 (23). P. 4228–4234.
- Gloeckner C. J., Boldt K., Schumacher A. et al. Tandem affinity purification of protein complexes from mammalian cells by the Strep/FLAG (SF)-TAP tag // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 564. P. 359–372.
- Goldstein D.J., Toyama R., Dhar R., Schlegel R. The BPV-1 E5 oncoprotein expressed in *Schizosaccharomyces pombe* exhibits normal biochemical properties and binds to the endogenous 16-kDa component of the vacuolar proton-ATPase // *Virology*. 1992. V. 190 (2). P. 889–893.
- Götzke H., Kilisch M., Martínez-Carranza M. et al. The ALFA-tag is a highly versatile tool for nanobody-based bioscience applications // *Nat. Commun.* 2019. V. 10 (1). P. 4403.
- Gully D., Moinier D., Loiseau L., Bouveret E. New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification // *FEBS Lett.* 2003. V. 548 (1–3). P. 90–96.
- Hackbarth J.S., Lee S.-H., Meng X.W. et al. S-peptide epitope tagging for protein purification, expression monitoring, and localization in mammalian cells // *Biotechniques*. 2004. V. 37 (5). P. 835–839.
- Hammarberg B., Nygren P. A., Holmgren E. et al. Dual affinity fusion approach and its use to express recombinant human insulin-like growth factor II // *PNAS USA*. 1989. V. 86 (12). P. 4367–4371.
- Hatlem D., Trunk T., Linke D., Leo J.C. Catching a SPY: using the SpyCatcher-SpyTag and related systems for labeling and localizing bacterial proteins // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20 (9). P. 2129.
- Hopp T.P., Prickett K.S., Price V.L. et al. A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification // *Nat. Biotechnol.* 1988. V. 6 (10). P. 1204–1210.

- Hortua Triana M.A., Márquez-Nogueras K.M., Chang L. et al.* Tagging of weakly expressed toxoplasma gondii calcium-related genes with high-affinity tags // *J. Eukaryot. Microbiol.* 2018. V. 65 (5). P. 709–721.
- Hernan R., Heuermann K., Brizzard B.* Multiple epitope tagging of expressed proteins for enhanced detection // *Biotechniques*. 2000. V. 28 (4). P. 789–793.
- Huttlin E.L., Ting L., Bruckner R.J. et al.* The BioPlex network: a systematic exploration of the human interactome // *Cell*. 2015. V. 162 (2). P. 425–440.
- Huttlin E.L., Bruckner R.J., Navarrete-Perea J. et al.* Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome // *Cell*. 2021. V. 184 (11). P. 3022–3040.e28.
- Ino Y., Yamaoka Y., Tanaka K. et al.* Integrated tandem affinity protein purification using the polyhistidine plus extra 4 amino acids (HiP4) tag system // *Proteomics*. 2023. V. 23 (11). P. 2200334.
- Jenny R.J., Mann K.G., Lundblad R.L.* A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa // *Protein Expr. Purif.* 2003. V. 31 (1). P. 1–11.
- Jo B.H.* An intrinsically disordered peptide tag that confers an unusual solubility to aggregation-prone proteins // *Appl. Environ. Microbiol.* 2022. V. 88 (7). P. e0009722.
- Kim J.S., Raines R.T.* Ribonuclease S-peptide as a carrier in fusion proteins // *Protein Sci.* 1993. V. 2 (3). P. 348–356.
- Kimple M.E., Brill A.L., Pasker R.L.* Overview of affinity tags for protein purification // *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2013. V. 73. P. 9.9.1–9.9.23.
- Kinrade B., Davies P.L., Vance T.D.R.* Bacterial sugar-binding protein as a one-step affinity purification tag on dextran-containing resins // *Protein Expr. Purif.* 2020. V. 168. P. 105564.
- Kong Z., Xiong X., Wu C., Pan W.* High-level expression of anti FLAG tag antibody in plants // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2024. V. 40 (1). P. 269–279.
- Kosobokova E.N., Skrypnik K.A., Kosorukov V.S.* Overview of fusion tags for recombinant proteins // *Biochemistry (Mosc)*. 2016. V. 81 (3). P. 187–200.
- Krupka M., Masek J., Barkocziova L. et al.* The position of His-tag in recombinant OspC and application of various adjuvants affects the intensity and quality of specific antibody response after immunization of experimental mice // *PLoS One*. 2016. V. 11 (2). P. e0148497.
- Lee T.H., Kim K.S., Kim J.H. et al.* Novel short peptide tag from a bacterial toxin for versatile applications // *J. Immunol. Methods*. 2020. V. 479. P. 112750.
- Li H., Huang L., Yu Y. et al.* Generation of recombinant influenza virus bearing strep tagged PB2 and effective identification of interactional host factors // *Vet. Microbiol.* 2021. V. 254. P. 108985.
- Li Y.* Commonly used tag combinations for tandem affinity purification // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2010. V. 55 (2). P. 73–83.
- Lilius G., Persson M., Bülow L., Mosbach K.* Metal affinity precipitation of proteins carrying genetically attached polyhistidine affinity tails // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 198 (2). P. 499–504.
- Liu H.-L., Ho Y., Hsu C.-M.* Molecular simulations to determine the chelating mechanisms of various metal ions to the His-tag motif: a preliminary study // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2003. V. 21 (1). P. 31–41.
- Low T.Y., Lee P.Y.* Tandem affinity purification (TAP) of interacting prey proteins with FLAG- and HA-tagged bait proteins // *Methods Mol. Biol.* 2023. V. 2690. P. 69–80.
- MacMillan M.A., Fisher D.I., Roberts K., Orme J.P.* Cellular assay optimization. Part I: The use of large-scale transiently transfected cryobanks and introduction of a c-Myc tag to design a standardized ELISA process // *J. Biomol. Screen.* 2011. V. 16 (9). P. 959–966.
- Mahmoudi Gomari M., Saraygord-Afshari N., Farsimadan M. et al.* Opportunities and challenges of the tag-assisted protein purification techniques: applications in the pharmaceutical industry // *Biotechnol. Adv.* 2020. V. 45. P. 107653.
- Marchetti A., Lima W.C., Hammel P., Cosson P.* A Quantitative comparison of antibodies against epitope tags for immunofluorescence detection // *FEBS Open Bio*. 2023. V. 13 (12). P. 2239–2245.
- Mehrasa R., Cristea I., Bredrup C. et al.* Functional characterization of all-trans retinoic acid-induced differentiation factor (ATRAID) // *FEBS Open Bio*. 2023. V. 13 (10). P. 1874–1886.
- Mikalsen T., Johannessen M., Moens U.* Sequence- and position-dependent tagging protects extracellular-regulated kinase 3 protein from 26S proteasome-mediated degradation // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005. V. 37 (12). P. 2513–2520.
- Mishra V.* Affinity tags for protein purification // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2020. V. 21 (8). P. 821–830.
- Moon J.-M., Kim G.-Y., Rhim H.* A new idea for simple and rapid monitoring of gene expression: requirement of nucleotide sequences encoding an N-terminal HA tag in the T7 promoter-driven expression in *E. coli* // *Biotechnol. Lett.* 2012. V. 34 (10). P. 1841–1846.
- Muñoz A., Castellano M.M.* Coimmunoprecipitation of interacting proteins in plants // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1794. P. 279–287.
- Munro S., Pelham H.R.* Use of peptide tagging to detect proteins expressed from cloned genes: deletion mapping functional domains of *Drosophila* hsp 70 // *EMBO J.* 1984. V. 3 (13). P. 3087–3093.
- Oluwayelu D.O., Adebisi A.I.* Plantibodies in human and animal health: a review // *Afr. Health Sci.* 2016. V. 16 (2). P. 640–645.
- Pacheco B., Crombet L., Loppnau P., Cossar D.* A screening strategy for heterologous protein expression in *Escherichia coli* with the highest return of investment // *Protein Expr. Purif.* 2012. V. 81 (1). P. 33–41.
- Pao P.-J., Hsu M.-F., Chiang M.-H. et al.* Structural basis of an epitope tagging system derived from *Haloarcula marismortui* bacteriorhodopsin I D94N and its monoclonal antibody GD-26 // *FEBS J.* 2022. V. 289 (3). P. 730–747.

- Park W.-J., You S.-H., Choi H.-A. *et al.* Over-expression of recombinant proteins with N-terminal His-tag via subcellular uneven distribution in *Escherichia coli* // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2015. V. 47 (7). P. 488–495.
- Pedreñeñ A., Mosquera-Sulbarán J., Muñoz N. *et al.* Nanoantibodies: small molecules, big possibilities // *BioTechnologia (Pozn)*. 2021. V. 102 (3). P. 321–336.
- Rigaut G., Shevchenko A., Rutz B. *et al.* A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. P. 1030–1032.
- Rozkov A., Enfors S.-O. Analysis and control of proteolysis of recombinant proteins in *Escherichia coli* // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2004. V. 89. P. 163–195.
- Saiz-Baggetto S., Méndez E., Quilis I. *et al.* Chimeric proteins tagged with specific 3×HA cassettes may present instability and functional problems // *PLoS One*. 2017. V. 12 (8). P. e0183067.
- Schembri L., Dalibart R., Tomasello F. *et al.* The HA tag is cleaved and loses immunoreactivity during apoptosis // *Nat. Methods*. 2007. V. 4 (2). P. 107–108.
- Schmidt T.G., Skerra A. The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment // *Protein Eng.* 1993. V. 6 (1). P. 109–122.
- Schmidt T.G.M., Skerra A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2 (6). P. 1528–1535.
- Schmidt P., Sparrow L., Attwood R. *et al.* Taking down the FLAG! How insect cell expression challenges an established tag-system // *PLoS One*. 2012. V. 7 (6). P. e37779.
- Schmidt T.G.M., Batz L., Bonet L. *et al.* Development of the Twin-Strep-tag® and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants // *Protein Expr. Purif.* 2013. V. 92 (1). P. 54–61.
- Shestakova E.A., Boutin M., Bourassa S. *et al.* Identification of proteins associated with transcription factors HOXA9 and E2A-PBX1 by tandem affinity purification // *Mol. Biol. (Mosk)*. 2017. V. 51 (3). P. 490–501.
- Smith J.C., Derbyshire R.B., Cook E. *et al.* Chemical synthesis and cloning of a poly(arginine)-coding gene fragment designed to aid polypeptide purification // *Gene*. 1984. V. 32 (3). P. 321–327.
- Tagami H. Purification of histone variant-interacting chaperone complexes // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1832. P. 51–60.
- Tehseen M., Raducanu V.-S., Rashid F. *et al.* Proliferating cell nuclear antigen-agarose column: a tag-free and tag-dependent tool for protein purification affinity chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2019. V. 1602. P. 341–349.
- Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. V. 60 (5). P. 523–533.
- Thompson J.M., Tragge W., Flood E.D. *et al.* Development of a 5-HT7 receptor antibody for the rat: the good, the bad, and the ugly // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2023. V. 396 (10). P. 2599–2611.
- Thumberger T., Tavhelidse-Suck T., Gutierrez-Triana J.A. *et al.* Boosting targeted genome editing using the hei-tag // *eLife*. 2022. V. 11. P. e70558.
- Traenkle B., Segan S., Fagbadebo F.O. *et al.* A novel epitope tagging system to visualize and monitor antigens in live cells with chromobodies // *Sci. Rep.* 2020. V. 10 (1). P. 14267.
- Tsukamoto A., Jae Man L., Oyama K. *et al.* Effective expression and characterization of the receptor binding domains in SARS-CoV-2 spike proteins from original strain and variants of concern using *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in silkworm // *Protein Expr. Purif.* 2024. V. 218. P. 106450.
- Wester L.E., Lanjuin A., Bruckisch E.H.W. *et al.* A Single-copy knockin translating ribosome immunoprecipitation toolkit for tissue-specific profiling of actively translated mRNAs in *C. elegans* // *Cell Rep. Methods*. 2023. V. 3 (3). P. 100433.
- Woestenek E.A., Hammarström M., van den Berg S. *et al.* His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors // *J. Struct. Funct. Genomics*. 2004. V. 5 (3). P. 217–229.
- Wood D.W. New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2014. V. 26. P. 54–61.
- Wu J., Filutowicz M. Hexahistidine (His6)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale // *Acta Biochim. Pol.* 1999. V. 46 (3). P. 591–599.
- Yadav D.K., Yadav N., Yadav S. *et al.* An insight into fusion technology aiding efficient recombinant protein production for functional proteomics // *Arch. Biochem. Biophys.* 2016. V. 612. P. 57–77.
- Zhang Y., Zhao L., Wang Q. *et al.* A novel epitope tag from rabies virus has versatile *in vitro* applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2023. V. 107 (12). P. 3955–3966.
- Zhao F., Song Q., Wang B. *et al.* Purification and immobilization of  $\alpha$ -amylase in one step by gram-positive enhancer matrix (GEM) particles from the soluble protein and the inclusion body // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. V. 104 (2). P. 643–652.
- Zhao X., Li G., Liang S. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification // *J. Anal. Methods Chem.* 2013. V. 2013. P. 581093.

## Affinity Anchors: Overview of Popular Tags for Modern Molecular Biology

P. A. Kryukova<sup>a</sup>, O. I. Kiseleva<sup>a</sup>, I. Yu. Kurbatov<sup>a</sup>, E. V. Poverennaya<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>*Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: inst@ibmc.msk.ru*

In the functioning of living systems, intermolecular contacts, including protein-protein interactions, play a crucial role. One of the main methods for studying them is affinity purification coupled with mass spectrometry (AP-MS). This approach relies on the refinement of epitope tags, short genetic modifications of proteins, which subsequently enable the “capture” of target molecules. The review aims to compare the most popular epitope tags and discuss traditional and innovative studies in which they are used. The primary goal of this manuscript is to assess how close the scientific community is to creating a “perfect” tag that meets the needs of most researchers applying tags to address a wide range of molecular biology tasks.

**Keywords:** affinity purification, tags, epitope, protein-protein interaction

УДК 577.21; 578.27; 578.56; 578.82/83

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ОБНАРУЖЕНИИ И ГЕНОТИПИРОВАНИИ САПОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

© 2024 г. А. Ю. Кашников<sup>1,\*</sup>, Н. В. Епифанова<sup>1</sup>, Н. А. Новикова<sup>1</sup><sup>1</sup>Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия

\*e-mail: a.kashn@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.04.2024 г.

После доработки 08.05.2024 г.

Принята к публикации 06.05.2024 г.

Саповирус (род *Sapovirus*, семейство *Caliciviridae*), наряду с норовирусом, признается важной причиной острой кишечной инфекции человека. Штаммы саповирусов человека демонстрируют значительное генетическое разнообразие. В настоящее время показано существование 18 генотипов, объединенных в четыре геногруппы (GI, GII, GIV, GV). Для обнаружения саповирусов в клинических образцах широко используются методы ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) из-за их высокой чувствительности и широкой реактивности. Для дальнейшей характеристики выявленных саповирусов проводят генотипирование, которое является основой для построения системы классификации саповирусов человека. Цель данного обзора — освещение современных методов обнаружения и генотипирования саповирусов, основанных на ОТ-ПЦР и секвенировании вирусного генома.

**Ключевые слова:** саповирусы, ОТ-ПЦР, скрининг, генотипирование, геногруппа, генотип

DOI: 10.31857/S0042132424040043, EDN: PPNQYA

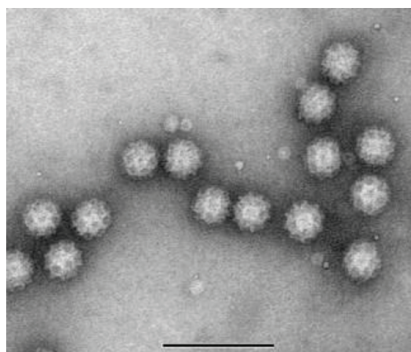
### ВВЕДЕНИЕ

Острые кишечные инфекции (ОКИ) продолжают оставаться одной из наиболее серьезных проблем здравоохранения из-за их широкой распространенности и наносимого социально-экономического ущерба. В последние годы в мире возрос интерес к саповирусам, которым в России не уделяется достаточного внимания. Развитие молекулярных методов индикации возбудителей инфекционных заболеваний, в первую очередь полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), позволило установить важную роль саповирусов в этиологии ОКИ как среди детей, так и среди взрослых. В связи с этим целью данного обзора явилось освещение информации о современных молекулярно-генетических методах, с помощью которых можно обнаружить и генотипировать саповирусы человека.

### ОТКРЫТИЕ САПОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА, ИХ ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ

Саповирусы впервые выявлены в 1977 г. в образцах фекалий детей в возрасте до 2 лет во

время вспышки гастроэнтерита в детском доме в г. Саппоро (Япония) с помощью электронной микроскопии. Свое название новые вирусы получили по месту их первоначальной идентификации (Chiba et al., 1979; Kogasaka et al., 1981). Эти вирусы имели характерную морфологию в виде звезды Давида, визуально были сходны с открытыми ранее норовирусами (рис. 1) и заметно отличались от других вирусов, выявляемых при электронной микроскопии в фекалиях пациентов с острым гастроэнтеритом (ОГЭ), — ротавирусов, аденовирусов, энтеровирусов. В течение последующих 5 лет в этом же детском доме саповирусы вызвали еще три вспышки ОГЭ. Штамм, выделенный в 1982 г., — Hu/SaV/Sapporo/1982/JPN — стал прототипным штаммом (*Sapporovirus*) группы SLV3 (*Sapporo-like*, Саппороподобные вирусы) (Chiba et al., 2000). В 2002 г. Международным комитетом по таксономии представители данной группы вирусов выделены в отдельный род *Sapovirus* семейства *Caliciviridae* (Nakanishi et al., 2011). Саповирусы — безоболочечные вирусы, капсид которых имеет диаметр 27–40 нм, икосаэдрическую симметрию ( $T = 3$ ) и состоит из 90 димеров (180 молекул) капсидного белка VP1 (Vinjé et al., 2019).



**Рис. 1.** Трансмиссионная электронная микрофотография частиц саповируса из клинических образцов. Масштабная шкала 100 нм. Источник: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/sapporo-virus>.

Геном саповируса человека представляет собой одноцепочечную молекулу РНК позитивной полярности размером от 7.4 до 7.5 тыс. нуклеотидных оснований, 5'-конец которой связан с белком VPg, а 3'-конец имеет поли(А)-тракт. Геномная последовательность имеет две открытые рамки считывания ORFs (open reading frames). ORF1 кодирует 7 неструктурных белков (NS1-NS2-NS3-NS4-NS5-NS6 и NS7) или RdRp (RNA-dependent RNA-polymerase) и главный капсидный белок (VP1), а ORF2 кодирует второстепенный капсидный белок VP2 (Oka et al., 2015). На основании нуклеотидных последовательностей, кодирующих VP1, саповирусы человека подразделяют на четыре геногруппы: GI, GII, GIV и GV. В настоящее время геногруппы GI, GII и GV включают семь, восемь и два гено типа соответственно — GI.1–GI.7, GII.1–GII.8, GV.1–GV.2, геногруппа GIV содержит один гено тип — GIV.1 (Oka et al., 2019). Причем саповирусы геногрупп GII и GIV выявлены только у человека, а геногрупп GI и GV обнаружены как у человека, так и у некоторых видов животных. Саповирусы геногрупп GIII и GV–GXI выявлены у свиней (Scheuer et al., 2013), GV — у морских львов (Li et al., 2011), GXII — у норок (Birch et al., 2021), GXIII — у собак (Stamelou et al., 2022), GXIV, GXVI–GXIX — у летучих мышей (Yinda et al., 2017), GXV — у крыс (Firth et al., 2014) и GI — у шимпанзе (Mombo et al., 2014).

В течение нескольких десятилетий после открытия саповирусов и до начала 2000-х гг. для диагностики саповирусной инфекции применялись электронная микроскопия (ЭМ), обладающая относительно низкой чувствительностью, и иммуноферментный анализ (ИФА), имеющий существенные ограничения в связи с антигенным разнообразием саповирусов и отсутствием доступных тест-систем (Oka et al., 2015). С появлением ОТ-ПЦР возможности индикации

саповирусов существенно расширились. Так, сравнительное исследование (Pang et al., 2014) показало, что методом ПЦР саповирусы выявлены в 4.2% исследованных образцов фекалий больных с гастроэнтеритом, а методом ЭМ саповирус в данных образцах обнаружить не удалось. Чувствительность ИФА при выявлении саповирусов относительно однораундовой и вложенной ПЦР (Hansman et al., 2006) составляет только 60 и 25% соответственно.

Разработка молекулярно-генетических методов обнаружения саповирусов расширила возможности изучения их распространенности, которая существенно недооценивалась, по сравнению с другими кишечными вирусами (Becker-Dreps et al., 2020). По оценкам (Сагалова, 2009), молекулярно-генетические методы, в сравнении с традиционно применяемыми в учреждениях практического здравоохранения, позволяют более чем в 2 раза повысить эффективность диагностики кишечных вирусных инфекций у взрослых при спорадических заболеваниях и значительно улучшить этиологическую расшифровку вспышек (Сагалова, 2009).

Исследования с использованием ОТ-ПЦР, проведенные в России в начале 2000-х гг., показали относительно низкую инфицированность саповирусами больных с ОКИ. При изучении этиологии ОКИ у детей в московских инфекционных стационарах в 2002–2004 гг. обнаружены (Подколзин и др., 2004) саповирусы у 10 из 2080 обследованных больных (0.48% случаев). При обследовании (Сагалова и др., 2008) 753 больных ОГЭ в возрасте 15–90 лет, госпитализированных в инфекционное отделение стационара при спорадической заболеваемости в Челябинске, выявлены саповирусы у семи больных (0.996% случаев). В наших исследованиях, проведенных в 2003–2007 и в 2008–2009 гг., саповирусы у детей, госпитализированных с ОГЭ в Нижнем Новгороде, выявлены в единичных случаях — 3/2312 и 3/839 соответственно (Епифанова и др., 2009; Луковникова и др., 2009). Вероятно, полученные результаты обусловили отсутствие в последующие годы интереса у российских исследователей к изучению циркуляции саповирусов.

Исследования, проводимые за рубежом, показывают широкую распространенность саповирусной инфекции среди населения планеты. В частности, в Финляндии в 2009–2011 гг. саповирусы обнаружены в 3.1% образцов стула (31/999) (Pitkänen et al., 2022), в Германии в 2008–2009 гг. — в 8.8% (30/342) и в 2008–2018 гг. — в 2.0% (112/5555) (Mann et al., 2019), в Испании в 2010–2011 гг. — в 15.6% (417/2667) (Varela et al., 2019) и в 2018–2020 гг. — в 8% (203/2545) (De Oliveira-Tozetto et al., 2021), в Японии в 2009–2019 гг. — в 5.6% (318/5697)

(Hoque et al., 2022), в Перу в 2007–2011 гг. — в 11.5% (192/1669) (Sanchez et al., 2018), в Никарагуа в 2009–2010 гг. — 17% (57/330) (Bucardo et al., 2014), в Буркина-Фасо в 2009–2010 гг. — в 18.0% (56/309) (Matussek et al., 2015). По наблюдениям во Вьетнаме, после внедрения вакцинации против ротавирусной инфекции и снижения циркуляции ротавирусов доли саповирусов и норовирусов в этиологической структуре ОКИ имеют тенденцию к росту (Mai et al., 2023).

### ВАРИАНТЫ ПЦР-МЕТОДИК ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ САПОВИРУСОВ

В связи с этим представляется значимым рассмотреть развитие методических подходов к выявлению и генотипированию саповирусов, основанных на ПЦР и секвенировании, для дальнейшего их использования в работе по изучению саповирусной инфекции в России на современном этапе.

Скрининг фекальных проб на присутствие саповирусов человека может быть осуществлен с помощью обычной (однораундовой), вложенной или гнездовой (двухраундовой) ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации и количественной ОТ-ПЦР (в режиме реального времени) (Oka et al., 2006; Okada et al., 2006; Mann et al., 2019; De Oliveira-Tozetto et al., 2021; Pitkänen et al., 2022).

Однораундовую ПЦР применяли в ряде скрининговых исследований на наличие саповирусов (Yan et al., 2003; Romani et al., 2012; Kumthip et al., 2020; Zaki et al., 2021). При этом, если в одних исследованиях однораундовый анализ ограничивался электрофоретической детекцией продуктов амплификации (Yan et al., 2003; Zaki et al., 2021), то в других — продукты ПЦР из образцов, положительных на РНК саповируса, далее генотипировали с помощью секвенирования (Romani et al., 2012; Kumthip et al., 2020). Однораундовую ОТ-ПЦР чаще проводят с использованием пары праймеров SLV5317 и SLV5749, нацеленных на фрагмент области гена вирусного капсида размером 434 н.о.

В ряде работ (Okada et al., 2006; Mann et al., 2019; De Oliveira-Tozetto et al., 2021) использована техника вложенной ОТ-ПЦР для обнаружения саповирусов.

Применение двухраундовой ПЦР позволяет увеличить чувствительность ПЦР, а также с помощью специфичных в отношении геногруппы праймеров получить во втором раунде ампликоны различной длины и таким образом осуществить дифференциацию саповирусов на ге-

ногруппы без последующего секвенирования ампликонов (Okada et al., 2006).

Однако, являясь более чувствительным и специфичным методом, чем однораундовая ОТ-ПЦР, вложенная ОТ-ПЦР требует больше времени, и при ее использовании присутствует риск контаминации (Oka et al., 2006). Поэтому для обнаружения саповирусов чаще используют ОТ-ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) — количественный метод, который отличается не только повышенной чувствительностью, но и быстротой исполнения (Oka et al., 2006), минимизированным риском контаминации продуктами ПЦР и позволяет измерить относительную величину вирусной нагрузки по числу циклов амплификации генетического материала. Известно, что генотипирование саповирусов более успешно при высокой вирусной нагрузке с пороговым циклом  $Ct < 30$  (Sanchez et al., 2018; Varela et al., 2019; Becker-Dreps et al., 2020).

В последние годы при выявлении саповирусов исследователи сочетают ПЦР-РВ и двухраундовую ОТ-ПЦР (Sanchez et al., 2018; Mann et al., 2019; Su et al., 2023).

Для обнаружения саповирусов человека разработано множество праймеров. Эти праймеры предназначены для амплификации частичной области RdRp, зоны соединения RdRp-VP1 или частичной области VP1. Из-за высокого генетического разнообразия саповирусов большинство анализов включают множественные или вырожденные праймеры (Oka et al., 2015).

Для первоначального выявления саповирусов чаще всего применяют ОТ-ПЦР, нацеленную на участок соединения генов, кодирующих РНК-зависимую РНК-полимеразу и капсидный белок. Это обусловлено тем, что участок RdRp-VP1 является самым консервативным в геноме саповирусов человека, и праймеры, направленные на данный участок, позволяют выявлять широкий спектр генетически разнообразных штаммов саповирусов человека (Oka et al., 2015).

В 2006 г. разработана первая система ОТ-ПЦР в реальном времени, которая могла обнаруживать саповирусы человека всех геногрупп (Oka et al., 2006). Однако несколько штаммов саповируса (классифицированных как GI.2, GI.7, GII.7, GII.8 и GV.2) плохо выявлялись с помощью этой системы. Чтобы преодолеть эти технические ограничения, авторы (Oka et al., 2019) позднее модифицировали праймеры и зонды на основе доступных нуклеотидных последовательностей саповирусов 18 генотипов и разработали анализ ОТ-ПЦР в реальном времени на саповирусы человека с широким спектром реактивности (табл. 1).

**Таблица 1.** Праймеры и зонды, использованные для разработанного анализа ОТ-ПЦР в реальном времени на саповирус человека (Oka et al., 2019)

|           | Название   | Последовательность (5'–3') (a) | Направление праймера (b) | Положение     |
|-----------|------------|--------------------------------|--------------------------|---------------|
| Праймеры  | HuSaV-F1   | GGCHCTYGCCACCTAYAAAYG          | “+”                      | 5079–5098 (d) |
|           | HuSaV-F2   | GACCARGCHCTCGCYACCTAYGA        | “+”                      | 5078–5100 (e) |
|           | HuSaV-F3   | GCWRYKGCWTGYTAYAACAGC          | “+”                      | 5121–5141 (f) |
|           | HuSaV-R    | CCYTCCATYTCAAACACTA            | “–”                      | 5159–5177 (d) |
| Зонды (c) | HuSaV-TP-a | FAM-CCNCCWATRWACCA-MGB-NFQ     | “–”                      | 5101–5114 (d) |
|           | HuSaV-TP-b | FAM-CCNCCWACRWACCA-MGB-NFQ     | “–”                      | 5101–5114 (f) |

Примечание: (a) — буквы в праймерах и зондах соответствуют нуклеотидам: H = A/C/T, Y = C/T, R = A/G, W = A/T, K = G/T, N = A/C/G/T; (b) — “+” — прямой; “–” — обратный; (c) — зонды помечены репортерным красителем FAM на 5'-конце и MGB-NFQ — на 3'-конце олигонуклеотида; (d) — положение нуклеотидов в полноразмерном геноме штамма GI.1 Manchester (X86560); (e) — положение нуклеотидов в полноразмерном геноме штамма GII.1 Bristol (AJ249939); (f) — положение нуклеотидов в полноразмерном геноме штамма GV.1 Ehime475 (DQ366344).

**Таблица 2.** Праймеры для детекции саповирусов человека по участку RdRp

| Праймер | Последовательность (5'–3') | Направление праймера | Позиции в геноме | Номер регистрации |
|---------|----------------------------|----------------------|------------------|-------------------|
| P289    | TGACAATGTAATCATCACCATA     | “–”                  | 4663–4684        | X86560            |
| P290    | GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC    | “+”                  | 4354–4376        | X86560            |
| Sapp35  | GCAGTGGGTTTGAGACCAAG       | “–”                  | 4740–4760        | AB614356          |
| Sapp36  | GTTGCTGTTGGCATTAACA        | “+”                  | 4273–4291        | X86560            |

Другой консервативный участок в геноме саповирусов человека — ген RdRp. На использовании данной области генома основан двухэтапный методический подход к диагностике норовирусной и саповирусной инфекций (Епифанова и др., 2009; Луковникова и др., 2009). Этот подход включает первоначальный скрининг фекальных образцов на наличие калицивирусов с использованием универсальной пары праймеров P290 и P289 (Jiang et al., 1999), фланкирующих участок гена полимеразы, с последующим тестированием положительных проб с помощью праймеров, специфичных в отношении норовирусов геногрупп I, II и саповирусов. Для индикации саповирусов используют праймеры Sapp35 и Sapp36 (Berke et al., 1997) (табл. 2).

В последние годы в связи с обнаружением новых генетических вариантов саповируса человека возросла необходимость их генетической классификации, для которой важна вариабель-

ность анализируемого участка генома. Поэтому, когда ставится задача молекулярной характеристики (генотипирования) саповирусов человека методом ОТ-ПЦР или секвенирования, предпочтение исследователей отдается области генома саповируса, кодирующей белок капсида VP1 (Oka et al., 2015). Данная область, являясь наиболее вариабельным участком генома (Oka et al., 2006), дает больше информации для генотипирования саповирусов, чем консервативная область RdRp, генетическая информация с которой менее разнообразна. Полная нуклеотидная последовательность гена VP1 нужна для генетической классификации саповирусов, для выявления новых геногрупп и генотипов (Wang et al., 2018; Mann et al., 2019; Oka et al., 2019; Yan et al., 2020; Zhuo et al., 2021; Su et al., 2023).

Кроме ограниченной вариабельности области RdRp, в настоящее время в распоряжении исследователей имеется значительно меньше

доступных полных последовательностей гена RdRp, по сравнению с геном VP1 (Oka et al., 2015). Однако дальнейшая характеристика разнообразия саповирусов будет основываться и на нуклеотидных последовательностях гена полимеразы, по аналогии с близким в таксономическом плане норовирусом, для генетической классификации которого применяется двойное генотипирование (Rahman et al., 2021).

### ПОДБОР КОМБИНАЦИЙ ПРАЙМЕРОВ С ШИРОКИМ ДИАПАЗОНОМ ИНДИКАЦИИ САПОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА

Далеко не все из разработанных исследователями праймеров обладают широким диапазоном узнавания всего спектра нуклеотидных последовательностей саповирусов человека. Кроме этого, комплементарность большинства праймеров распространяется на геномы других кишечных вирусов (норовирусы, ротавирусы, астровирусы и аденовирусы) (Oka et al., 2015). Как отмечалось выше, недавно японскими исследователями предложен анализ ПЦР-РВ широкого диапазона, позволяющий выявлять все 18 идентифицированных в настоящее время генотипов саповируса человека (Oka et al., 2019). Однако слишком малый размер ампликонов, получаемых с помощью данного анализа (приблизительно 100 п.н.), не позволяет осуществлять генетическую характеристику выявленных саповирусов, для которой необходим анализ более протяженных участков генома.

В последующих исследованиях (Oka et al., 2020) проведена экспериментальная оценка реактивности одиннадцати различных систем для ПЦР-анализа с использованием опубликованных и недавно разработанных модифицированных праймеров и показано, что четыре системы с различными комбинациями праймеров амплифицировали все протестированные генотипы саповируса человека с использованием либо синтетической ДНК, либо кДНК, полученной из положительных на саповирусы человека образцов кала. Эти четыре ПЦР-анализа дали сходные результаты, когда кДНК находилась в диапазоне примерно от  $10^7$  до  $10^2$  копий/реакция (диапазон значений Ct: 18–37/реакция). Прямые праймеры в данных комбинациях комплементарны участку соединения RdRp-VP1, а обратные — последовательности гена VP1 (табл. 3).

Первая комбинация состоит из праймеров, разработанных ранее (Okada et al., 2006) применительно к мультиплексной ПЦР. Эти праймеры специфичны для геногрупп саповирусов человека, поскольку генерируют ПЦР-продукты

разной длины: GI (500 п.н.), GII (430 п.н.), GIV (360 п.н.) и GV (290 п.н.), что позволяет не только выявить саповирусы, но и дифференцировать их на геногруппы с помощью электрофореза в агарозном геле при мультиплексной постановке по размеру ПЦР-продуктов без необходимости секвенирования ампликонов.

Предложены (Oka et al., 2020) вторая, третья и четвертая комбинации праймеров. Вторая комбинация также позволяет получить ПЦР-продукты разного размера в зависимости от геногруппы: GI (450 п.н.), GII (380 п.н.), GIV (310 п.н.) и GV (240 п.н.).

Третья и четвертая комбинации амплифицируют продукты ПЦР одинакового размера (приблизительно 460 и 380 п.н. соответственно) независимо от геногруппы и генотипа и поэтому не позволяют с помощью электрофореза дифференцировать саповирусы человека на геногруппы в мультиплексной постановке. Причем, если в третьей комбинации три прямых праймера группоспецифичны, а обратный праймер универсален, то в четвертой комбинации оба праймера (прямой и обратный) универсальные.

Три последних комбинации праймеров модифицированы присоединением 5'-хвостовых последовательностей из 18 н.о. (5'-tgtaaaacgacggccagt-3' — для прямых праймеров M13F и 5'-caggaacagctatgacc-3' — для обратных праймеров M13R). Цель модификации — уменьшение неспецифической амплификации и улучшение качества секвенирования продуктов ПЦР. Отмечено, что с применением данных комбинаций праймеров не наблюдается перекрестной реактивности с образцами, положительными на норовирусы GI и GII, астровирусы типов I и IV, ротавирусы A и C, аденовирусы человека типа 40/41. Данные группы праймеров могут использоваться в качестве улучшенных широкореактивных скрининговых тестов, а также для генотипирования путем амплификации фрагментов с последующим секвенированием (Oka et al., 2020).

### СЕКВЕНИРОВАНИЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ САПОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА

Для детальной характеристики вируса его генотипируют с применением метода секвенирования. Секвенирование позволяет идентифицировать конкретный генетический вариант, а также новые, ранее не описанные, геноварианты вируса. Нарботанные в ОТ-ПЦР ампликоны после очистки в геле со специальным набором реагентов и мечения секвенируют в автоматическом генетическом анализаторе с использованием

**Таблица 3.** Наборы праймеров с широким диапазоном узнавания для индикации и генотипирования саповирусов человека (Oka et al., 2020, с изменениями)

| № набора | Название праймера | Последовательность (5'–3')     | Направление праймера | Локализация в геноме саповируса | Регистрационный номер GenBank |
|----------|-------------------|--------------------------------|----------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| I        | SV-F13            | GAY YWG GCY CTC GCY ACC TAC    | “+”                  | 5074–5094                       | X86560                        |
|          | SV-F14            | GAA CAA GCT GTG GCA TGC TAC    | “+”                  | 5074–5094                       | X86560                        |
|          | SV-G1-R           | CCC BGG TGG KAY GAC AGA AG     | “–”                  | 5561–5580                       | X86560                        |
|          | SV-G2-R           | CCA NCC AGC AAA CAT NGC RCT    | “–”                  | 5483–5503                       | AY237420                      |
|          | SV-G4-R           | GCG TAG CAG ATC CCA GAT AA     | “–”                  | 5413–5432                       | DQ058829                      |
|          | SV-G5-R           | TTG GAG GWT GTT GCT CCT GTG    | “–”                  | 5384–5404                       | AY646856                      |
| II       | M13F-SaV 1245Rfwd | TAG TGT TTG ARA TGG AGG G      | “+”                  | 5159–5177                       | X86560                        |
|          | M13R-SV-G1-R      | CCC BGG TGG KAY GAC AGA AG     | “–”                  | 5561–5580                       | X86560                        |
|          | M13R-SV-G2-R      | CCA NCC AGC AAA CAT NGC RCT    | “–”                  | 5483–5503                       | AY237420                      |
|          | M13R-SV-G4-R      | GCG TAG CAG ATC CCA GAT AA     | “–”                  | 5413–5432                       | DQ058829                      |
|          | M13R-SV-G5-R      | TTG GAG GWT GTT GCT CCT GTG    | “–”                  | 5384–5404                       | AY646856                      |
| III      | M13F-HuSaV-F1     | GGC HCT YGC CAC CTA YAA YG     | “+”                  | 5079–5098                       | X86560                        |
|          | M13F-HuSaV-F2     | GAC CAR GCH CTC GCY ACC TAY GA | “+”                  | 5078–5100                       | AJ249939                      |
|          | M13F-HuSaV-F3     | GCW RYK GCW TGY TAY AAC AGC    | “+”                  | 5121–5141                       | DQ366344                      |
|          | M13R-HuSaV-5498R  | CCC CAN CCN GCV HAC AT         | “–”                  | 5482–5498                       | X86560                        |
| IV       | M13F-HuSaV-5159F  | TAG TGT TTG ARA TGG ARG G      | “+”                  | 5159–5177                       | X86560                        |
|          | M13R-HuSaV-5498R  | CCC CAN CCN GCV HAC AT         | “–”                  | 5482–5498                       | X86560                        |

Примечание: H = A/C/T, Y = C/T, R = A/G, W = A/T, K = G/T, N = A/C/G/T.

ем, как правило, тех же, что и в ПЦР, прямых и обратных праймеров. Данные секвенирования вначале анализируют в целях поиска родственных им последовательностей, сопоставляя и выравнивая полученные последовательности с зарегистрированными в GenBank с помощью программ Clustal X 2.0 (Larkin et al., 2007), MEGA X (Kumar et al., 2018) или других. Затем проводят филогенетический анализ исследуемых саповирусов, позволяющий на основе сравнения установленных и референсных последовательностей гена капсидного белка разделить их на кластеры, соответствующие геногруппе или генотипу саповируса (De Oliveira-Tozetto et al., 2021). Филогенетические деревья демонстрируют степень родства между геномами саповирусов человека, относящимися к разным геногруппам и генотипам, которые выделены в разных странах, и отражают глобальную циркуляцию и широкое распространение саповирусов среди населения планеты.

Недавно сообщалось о применении независимых от праймеров подходов метагеномного секвенирования для идентификации саповирусов человека. Метагеномный анализ позволяет не только выявить саповирусы разных геногрупп, но и получить их полногеномные нуклеотидные последовательности при исследовании образцов стула детей с ОГЭ в провинции Цзянсу, Китай (Li et al., 2020), при вспышках и спорадических случаях ОГЭ в США, Никарагуа, Перу и Гватемале (Diez-Valcarce et al., 2018), а также при обследовании детей с острым вялым параличом в Нигерии (George et al., 2024). Вирусная метагеномика оказалась эффективным методом обнаружения новых вирусов и расширения понимания разнообразия вирусов, обнаруженных в клинических образцах, включая идентификацию новых штаммов саповирусов человека и животных (Balázs et al., 2024). Анализ полного генома, а не коротких последовательностей, позволяет отслеживать передачу вирусной

инфекции и проводить эффективные эпидемиологические исследования (Yang et al., 2022; George et al., 2024). В целях диагностики метагеномный анализ пока не получил широкого применения, но может быть использован в будущем, когда стоимость такого анализа и обработки данных будет сравнима с традиционными ПЦР-методами.

К настоящему времени с помощью специально разработанных наборов праймеров, а также на основе высокопроизводительного секвенирования амплифицированы и секвенированы полные геномы ряда саповирусов человека (Yan et al., 2020; Li et al., 2022; Ji et al., 2024). По состоянию на 01.04.2024 г. в GenBank находятся 155 нуклеотидных последовательностей полных (почти полных) геномов саповирусов человека, относящихся к геногруппе GI, 81 — к GII, 42 — к GIV и 13 — к GV (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

В последние годы продолжается и развитие иммунологических подходов для диагностики вирусных инфекций. В частности, недавно появился новый усовершенствованный вариант метода иммунохроматографии LFIC (lateral flow immunochromatography) для выявления норовирусов (Gao et al., 2024). Он разработан в целях преодоления недостатков старого метода, связанных с низкой чувствительностью и отсутствием возможности количественного определения вирусной нагрузки. Новая версия отличается быстротой, точностью измерения и большей чувствительностью, по сравнению со старой версией LFIC и может стать многообещающим вариантом для тестирования на месте оказания медицинской помощи в будущем (Gao et al., 2024). Этот инструмент, вероятно, может быть модифицирован и для быстрой диагностики саповирусной инфекции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с появлением в последние годы новых более чувствительных молекулярно-генетических методов, возросла частота выявления при диарейных заболеваниях саповирусов, отличающихся широким разнообразием генетических вариантов. К настоящему времени открыто 18 генотипов саповирусов человека, относящихся к четырем геногруппам и подобраны четыре комбинации праймеров, спектр реактивности которых распространяется на все 18 аннотированных в GenBank геновариантов. С данными комбинациями праймеров не наблюдается перекрестной реактивности с образцами, положительными на другие кишечные вирусы, и в настоящее время их можно использовать не только в качестве более совершенных скрининговых

тестов, но и для более успешного генотипирования саповирусов человека.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Епифанова Н.В., Луковникова Л.Б., Новикова Н.А. Молекулярная диагностика норовирусной и саповирусной инфекции у детей с гастроэнтеритом // Сб. науч. тр. / Ред. Е.И. Ефимов. НН: ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной, 2009. С. 133–137.
- Луковникова Л.Б., Епифанова Н.В., Новиков Д.В., Новикова Н.А. Генетическое разнообразие калицивирусов человека, обнаруженных у детей с гастроэнтеритом в Нижнем Новгороде // Вопр. вирусол. 2009. Т. 54 (6). С. 24–28 [Lukovnikova L.B., Epifanova N.V., Novikov D.V., Novikova N.A. Genetic diversity of human caliciviruses found in children with gastroenteritis in Nizhny Novgorod // Vopr. Virol. 2009. T. 54 (6). S. 24–28. In Russ].
- Подколзин А.Т., Мухина А.А., Шипулин Г.А. и др. Первый опыт выявления саповирусов у детей с острыми кишечными инфекциями в Москве в 2002–2003 гг. // Генодиагностика инфекционных болезней. Т. 2 (5) / Мат. V Всерос. науч.-практ. конф. (Москва, 19–21 октября 2004 г.). М.: Медицина для всех, 2004. С. 109–110 [Podkolzin A.T., Mukhina A.A., Shipulin G.A. et al. The first experience of identifying sapoviruses in children with acute intestinal infections in Moscow in 2002–2003 // Gene diagnostics of infectious diseases. 2004. V. 2 (5). P. 109–110. In Russ.].
- Сагалова О.И. Клинико-иммунологическая характеристика кишечных инфекций вирусной этиологии у взрослых // Автореф. дис... док. мед. наук. М.: РМАНПО, 2009. 43 с. <https://viewer.rsl.ru/ru/rsl01003479765?page=1&rotate=0&theme=white>
- Сагалова О.И., Подколзин А.Т., Абрамьева Н.Ю. и др. Роль саповирусов в этиологии диарейных заболеваний у взрослых // 75 лет кафедры инфекционных бо-

- лезней РМАНПО / Сб. науч. тр. М.: РМАНПО, 2008. С. 125–128.
- Balázs B., Boros Á., Pankovics P. *et al.* Detection and complete genome characterization of a genogroup X (GX) sapovirus (family Caliciviridae) from a golden jackal (*Canis aureus*) in Hungary // *Arch. Virol.* 2024. V. 169 (5). P. 100.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-024-06034-2>
- Becker-Dreps S., González F., Bucardo F. Sapovirus: an emerging cause of childhood diarrhea // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2020. V. 33. P. 388–397.  
<https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000671>
- Berke T., Golding B., Jiang X. *et al.* Phylogenetic analysis of the caliciviruses // *J. Med. Virol.* 1997. V. 52 (4). P. 419–424.  
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9071\(199708\)52:4<419::aid-jmv13>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(199708)52:4<419::aid-jmv13>3.0.co;2-b)
- Birch J., Leijon M., Nielsen S.S. *et al.* Visualization of intestinal infections with astro- and sapovirus in mink (*Neovison vison*) kits by *in situ* hybridization // *FEMS Microbes.* 2021. V. 2. P. xtab005.  
<https://doi.org/10.1093/femsmc/xtab005>
- Bucardo F., Reyes Y., Svensson L., Nordgren J. Predominance of norovirus and sapovirus in Nicaragua after implementation of universal rotavirus vaccination // *PLoS One.* 2014. V. 9 (5). P. 1–8.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098201>
- Chiba S., Sakuma Y., Kogasaka R. *et al.* An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home // *J. Med. Virol.* 1979. V. 4. P. 249–254.  
<https://doi.org/10.1002/jmv.1890040402>
- Chiba S., Nakata S., Numata-Kinoshita K., Honma S. Sapporo virus: history and recent findings // *J. Infect. Dis.* 2000. V. 181 (2). P. 303–308.  
<https://doi.org/10.1086/315574>
- De Oliveira-Tozetto S., Santiso-Bellón C., Ferrer-Chirivella J. M. *et al.* Epidemiological and genetic characterization of sapovirus in patients with acute gastroenteritis in Valencia (Spain) // *Viruses.* 2021. V. 13 (2). P. 184.  
<https://doi.org/10.3390/v13020184>
- Diez-Valcarce M., Castro C.J., Marine R.L. *et al.* Genetic diversity of human sapovirus across the Americas // *J. Clin. Virol.* 2018. V. 104. P. 65–72.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.05.003>
- Firth C., Bhat M., Firth M.A. *et al.* Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City // *mBio.* 2014. V. 5 (5). P. e01933-14.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.01933-14>
- Gao J., Xue L., Li Y. *et al.* Rapid and sensitive lateral flow biosensor for the detection of GII human norovirus based on immunofluorescent nanomagnetic microspheres // *J. Med. Virol.* 2024. V. 96 (3). P. e29487.  
<https://doi.org/10.1002/jmv.29487>
- George U.E., Faleye T.O.C., De Coninck L. *et al.* Metagenomic detection and genetic characterization of human sapoviruses among children with acute flaccid paralysis in Nigeria // *Pathogens.* 2024. V. 13 (3). P. 264.  
<https://doi.org/10.3390/pathogens13030264>
- Hansman G.S., Guntapong R., Pongsuwanna Y. *et al.* Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens // *Arch. Virol.* 2006. V. 151. P. 551–561.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-005-0630-x>
- Hoque S.A., Nishimura K., Thongprachum A. *et al.* An increasing trend of human sapovirus infection in Japan, 2009 to 2019: an emerging public health concern // *J. Infect. Public. Health.* 2022. V. 15 (3). P. 315–320.  
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2022.01.019>
- Ji X., Guo C., Dai Y. *et al.* Genomic characterization and molecular evolution of sapovirus in children under 5 years of age // *Viruses.* 2024. V. 16 (1). P. 146.  
<https://doi.org/10.3390/v16010146>
- Jiang X., Huang P.W., Zhong W.M. *et al.* Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR // *J. Virol. Methods.* 1999. V. 83 (1–2). P. 145–154.  
[https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(99\)00114-7](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(99)00114-7)
- Kogasaka R., Nakamura S., Chiba S. *et al.* The 33- to 39-nm virus-like particles, tentatively designed as Sapporo agent, associated with an outbreak of acute gastroenteritis // *J. Med. Virol.* 1981. V. 8 (3). P. 187–193.
- Kumar S., Stecher G., Li M. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35 (6). P. 1547–1549.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kumthip K., Khamrin P., Ushijima H. *et al.* Genetic recombination and diversity of sapovirus in pediatric patients with acute gastroenteritis in Thailand, 2010–2018 // *PeerJ.* 2020. V. 8. P. e8520.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.8520>
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0 // *Bioinformatics.* 2007. V. 23 (21). P. 2947–2948.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Li L., Shan T., Wang C. *et al.* The fecal viral flora of California sea lions // *J. Virol.* 2011. V. 85 (19). P. 9909–9917.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.05026-11>
- Li W., Dong S., Xu J. *et al.* Viral metagenomics reveals sapoviruses of different genogroups in stool samples from children with acute gastroenteritis in Jiangsu, China // *Arch. Virol.* 2020. V. 165 (4). P. 955–958.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-020-04549-y>
- Li T.C., Kataoka M., Doan Y.H. *et al.* Characterization of a human sapovirus genotype GII.3 strain generated by a reverse genetics system: VP2 is a minor structural protein of the virion // *J. Viruses.* 2022. V. 14 (8). P. 1649.  
<https://doi.org/10.3390/v14081649>
- Mai C.T.N., Ly L.T.K., Doan Y.H. *et al.* Prevalence and characterization of gastroenteritis viruses among hospitalized children during a pilot rotavirus vaccine introduction in Vietnam // *Viruses.* 2023. V. 15 (11). P. 2164.  
<https://doi.org/10.3390/v15112164>

- Mann P., Pietsch C., Liebert U.G. Genetic diversity of sapoviruses among inpatients in Germany, 2008–2018 // *Viruses*. 2019. V. 11 (8). P. 726.  
https://doi.org/10.3390/v11080726
- Matussek A., Dienus O., Djeneba O. et al. Molecular characterization and genetic susceptibility of sapovirus in children with diarrhea in Burkina Faso // *Infect. Genet. Evol.* 2015. V. 32. P. 396–400.  
https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.039
- Mombo I.M., Berthet N., Bouchier C. et al. Characterization of a genogroup I sapovirus isolated from chimpanzees in the Republic of Congo // *Genome Announc.* 2014. V. 2 (4). P. e00680-14.  
https://doi.org/10.1128/genomeA.00680-14
- Nakanishi K., Tatsumi M., Kinoshita-Numata K. et al. Full sequence analysis of the original Sapporo virus // *Microbiol. Immunol.* 2011. V. 55 (9). P. 657–660.  
https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00358.x
- Oka T., Katayama K., Hansman G.S. et al. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction // *J. Med. Virol.* 2006. V. 78. P. 1347–1353.  
https://doi.org/10.1002/jmv.20699
- Oka T., Wang Q., Katayama K., Saif L.J. Comprehensive review of human sapoviruses // *Clin. Microbiol. Rev.* 2015. V. 28 (1). P. 32–53.  
https://doi.org/10.1128/CMR.00011-14
- Oka T., Iritani N., Yamamoto S.P. et al. Broadly reactive real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of human sapovirus genotypes // *J. Med. Virol.* 2019. V. 91 (3). P. 370–377.  
https://doi.org/10.1002/jmv.25334
- Oka T., Yamamoto S.P., Iritani N. et al. Polymerase chain reaction primer sets for the detection of genetically diverse human sapoviruses // *Arch. Virol.* 2020. V. 165 (10). P. 2335–2340.  
https://doi.org/10.1007/s00705-020-04746-9
- Okada M., Yamashita Y., Oseto M., Shinozaki K. The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers // *Arch. Virol.* 2006. V. 151 (12). P. 2503–2509.  
https://doi.org/10.1007/s00705-006-0820-1
- Pang X.L., Preiksaitis J.K., Lee B.E. Enhanced enteric virus detection in sporadic gastroenteritis using a multi-target real-time PCR panel: a one-year study // *J. Med. Virol.* 2014. V. 86. P. 1594–1601.  
https://doi.org/10.1002/jmv.23851
- Pitkänen O., Markkula J., Hemming-Harlow M. Sapovirus, norovirus and rotavirus detections in stool samples of hospitalized Finnish children with and without acute gastroenteritis // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2022. V. 41 (5). P. e203–e207.  
https://doi.org/10.1097/INF.0000000000003493
- Rahman R., Rahman S., Afrad Md.M.H. et al. Epidemiology and genetic characterization of human sapovirus among hospitalized acute diarrhea patients in Bangladesh, 2012–2015 // *J. Med. Virol.* 2021. V. 93 (11). P. 6220–6228.  
https://doi.org/10.1002/jmv.27125
- Romani S., Azimzadeh P., Mohebbi S.R. et al. Prevalence of sapovirus infection among infant and adult patients with acute gastroenteritis in Tehran, Iran // *Gastroenterol. Hepatol. Bed. Bench.* 2012. V. 5 (1). P. 43–48.
- Sanchez G.J., Mayta H., Pajuelo M.J. et al. Epidemiology of sapovirus infections in a birth cohort in Peru // *Clin. Infect. Dis.* 2018. V. 66 (12). P. 1858–1863.  
https://doi.org/10.1093/cid/cix1103
- Scheuer K.A., Oka T., Hoet A.E. et al. Prevalence of porcine noroviruses, molecular characterization of emerging porcine sapoviruses from finisher swine in the United States, and unified classification scheme for sapoviruses // *J. Clin. Microbiol.* 2013. V. 51 (7). P. 2344–2353.  
https://doi.org/10.1128/JCM.00865-13
- Stamelou E., Giantsis I.A., Papageorgiou K.V. et al. First report of canine astrovirus and sapovirus in Greece, hosting both asymptomatic and gastroenteritis symptomatic dogs // *Virol. J.* 2022. V. 19 (1). P. 58.  
https://doi.org/10.1186/s12985-022-01787-1
- Su L., Mao H., Sun Y. et al. The analysis of the genotype of sapovirus outbreaks in Zhejiang Province // *Virol. J.* 2023. V. 20. P. 268.  
https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3049589/v1
- Varela M.F., Rivadulla E., Lema A. et al. Human sapovirus among outpatients with acute gastroenteritis in Spain: a one-year study // *Viruses*. 2019. V. 11 (2). P. 144.  
https://doi.org/10.3390/v11020144
- Vinje J., Estes M.K., Esteves P. et al. ICTV virus taxonomy profile: Caliciviridae // *J. Gen. Virol.* 2019. V. 100 (11). P. 1469–1470.  
https://doi.org/10.1099/jgv.0.001332
- Wang J., Li Y., Kong X. et al. Two gastroenteritis outbreaks caused by sapovirus in Shenzhen, China // *J. Med. Virol.* 2018. V. 90 (11). P. 1695–1702.  
https://doi.org/10.1002/jmv.25236
- Yan H., Yagyu F., Okitsu S. et al. Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR // *J. Virol. Methods*. 2003. V. 114 (1). P. 37–44.  
https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.08.009
- Yan Y., Li Y., Shi W. et al. An outbreak of gastroenteritis associated with a novel GII.8 sapovirus variant-transmitted by vomit in Shenzhen, China, 2019 // *BMC Infect. Dis.* 2020. V. 20 (1). P. 911.  
https://doi.org/10.1186/s12879-020-05643-x
- Yang S., He Y., Zhang J. et al. Viral metagenomics reveals diverse viruses in the fecal samples of children with diarrhea // *Virol. Sin.* 2022. V. 37 (1). P. 82–93.  
https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.01.012
- Yinda C.K., Conceição-Neto N., Zeller M. et al. Novel highly divergent sapoviruses detected by metagenomics analysis in straw-colored fruit bats in Cameroon // *Emerg. Microbes Infect.* 2017. V. 6. P. 1–7.  
https://doi.org/10.1038/emi.2017.20
- Zaki M.E.S., Shrief R., Hassan R.H. Molecular detection of sapovirus in children under five years with acute gastroenteritis in Mansoura, Egypt between January 2019 and February 2020 // *F1000Res*. 2021. V. 10. P. 123.  
https://doi.org/10.12688/f1000research.29991.4
- Zhuo R., Ding X., Freedman S.B. et al. Molecular epidemiology of human sapovirus among children with acute gastroenteritis in Western Canada // *J. Clin. Microbiol.* 2021. V. 59 (10). P. e00986-21.  
https://doi.org/10.1128/JCM.00986-21

## Molecular Genetic Methods for Detection and Genotyping of Human Sapoviruses (Review)

A. Yu. Kashnikov<sup>a, \*</sup>, N. V. Epifanova<sup>a</sup>, N. A. Novikova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: a.kashn@yandex.ru*

Sapovirus (genus *Sapovirus*, family Caliciviridae), along with norovirus, is recognized as an important cause of acute intestinal infection (AEI) in humans. Human sapovirus strains exhibit significant genetic diversity. Currently, the existence of 18 genotypes, combined into four genogroups (GI, GII, GIV, GV), has been shown. Reverse transcription-PCR (RT-PCR) techniques are widely used for the detection of sapoviruses in clinical samples due to their high sensitivity and broad reactivity. To further characterize the identified sapoviruses, genotyping is carried out, which is the basis for constructing a classification system for human sapoviruses. The purpose of this review was to highlight modern methods for the detection and genotyping of sapoviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction and viral genome sequencing.

**Keywords:** sapoviruses, RT-PCR, screening, genotyping, genogroup, genotype

УДК 616.24-005.98:661.97

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛЕГКИХ В ДИНАМИКЕ ИНГАЛЯЦИОННОГО ОТРАВЛЕНИЯ ДИХЛОРАНГИДРИДОМ УГОЛЬНОЙ КИСЛОТЫ

© 2024 г. П. А. Торкунов<sup>1,\*</sup>, С. В. Чепур<sup>2</sup>, П. Д. Шабанов<sup>1</sup>, А. В. Земляной<sup>3</sup>,  
О. В. Торкунова<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека,  
г.п. Кузьмоловский, Ленинградская область, Россия

<sup>4</sup>Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: tpa4@mail.ru

Поступила в редакцию 27.03.2024 г.

После доработки 19.04.2024 г.

Принята к публикации 19.04.2024 г.

Исследование структурных изменений ткани легкого при формировании отека органа вследствие ингаляции липотропного яда — дихлорангидрида угольной кислоты — показало особенности формирования острого респираторного дистресс-синдрома. Точкой приложения яда выступают дистальные бронхиолы, эпителий которых подвержен дистрофическим и некротическим изменениям с последующей бокаловидной метаплазией. Всосавшийся яд вызывает выраженные изменения микроциркуляции крови, стероидрезистентную NO-опосредованную эндотелиальную дисфункцию с депонированием крови в расширенных капиллярах, с агрегацией и с лизисом эритроцитов. Изменения сосудистого русла в межалвеолярных перегородках предшествуют формированию острой воспалительной реакции с накоплением альвеолярного выпота и дистрофических изменений эпителия альвеол с десквамацией клеток. Среди клеток альвеолярной выстилки наиболее уязвимы альвеолоциты II типа. Плазматическое пропитывание соединительной ткани интерстиция межалвеолярных перегородок сопровождается их инфильтрацией полиморфно-ядерными лейкоцитами и активацией макрофагов. Десквамация клеток эпителия дистальных бронхиол приводит к обтурации их просветов и посредством вентильного механизма способствует перерастяжению альвеол с формированием эмфиземы и редукции капиллярного кровотока в альвеолярных перегородках. Прослеженные изменения определили направления совершенствования терапии отравлений удушающими ядами.

**Ключевые слова:** ингаляционное отравление, отек легких, патогенез, дихлорангидрид угольной кислоты

DOI: 10.31857/S0042132424040056, EDN: PPHUGP

### ВВЕДЕНИЕ

Токсический отек легких (ТОЛ) рассматривают как проявление острейшего воспаления с массивным экссудативным компонентом и в различной степени выраженной клеточной инфильтрацией ткани органа (Торкунов и др., 2008; He et al., 2020; Shao et al., 2022). ТОЛ — крайне опасное для жизни состояние, а его лечение, равно как и любого отека легких, сопряжено с рядом трудностей и не всегда эффективно (Зильбер, 1996). Причиной острого некардио-

генного нарушения сосудистой проницаемости как для плазмы, так и для форменных элементов крови может стать действие раздражителей, веществ, вызывающих кислотный или щелочной ожог слизистой оболочки воздухоносных путей и альвеолярной выстилки. Вещества, вызывающие ТОЛ, можно встретить в быту и в промышленности, их образование возможно в процессе горения. К их числу относят хлор, фтор, аммиак, диоксид серы, сероводород и оксиды азота (Pauluhn, 2022). Однако среди этих веществ особое место занимает дихлорангидрид уголь-

ной кислоты и перфторизобутилен, токсическое действие которых, как считают, опосредовано преимущественно алкилирующим повреждением специализированных клеточных структур аэрогематического барьера (Толкач и др., 2020).

Выяснение механизмов формирования ТОЛ необходимо для разработки методов профилактики и лечения этого патологического состояния, характеризующегося высокой летальностью. Одним из основных методов исследования, позволяющих получить наиболее полное представление о патологическом процессе в легких при их ингаляционном токсическом повреждении, признан морфологический. В то же время морфофункциональные адаптивные и патологические изменения при ТОЛ, и прежде всего на его ранних стадиях (Толкач, 2020), до сих пор недостаточно изучены, а изложенные оценки противоречивы с точки зрения последовательности патологических изменений. Следствием этого стала невозможность формирования единых взглядов на патогенез и клеточные субстраты — мишени фармакологического воздействия, что затрудняет разработку патогенетических методов профилактики и лечения ТОЛ (Мотавкин, Гельцер, 1998; Lu et al., 2021; Pauluhn, 2021). Все вышесказанное объясняет необходимость дальнейших экспериментальных исследований его морфогенеза и патогенеза, попытка проведения которых предпринята в данной работе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

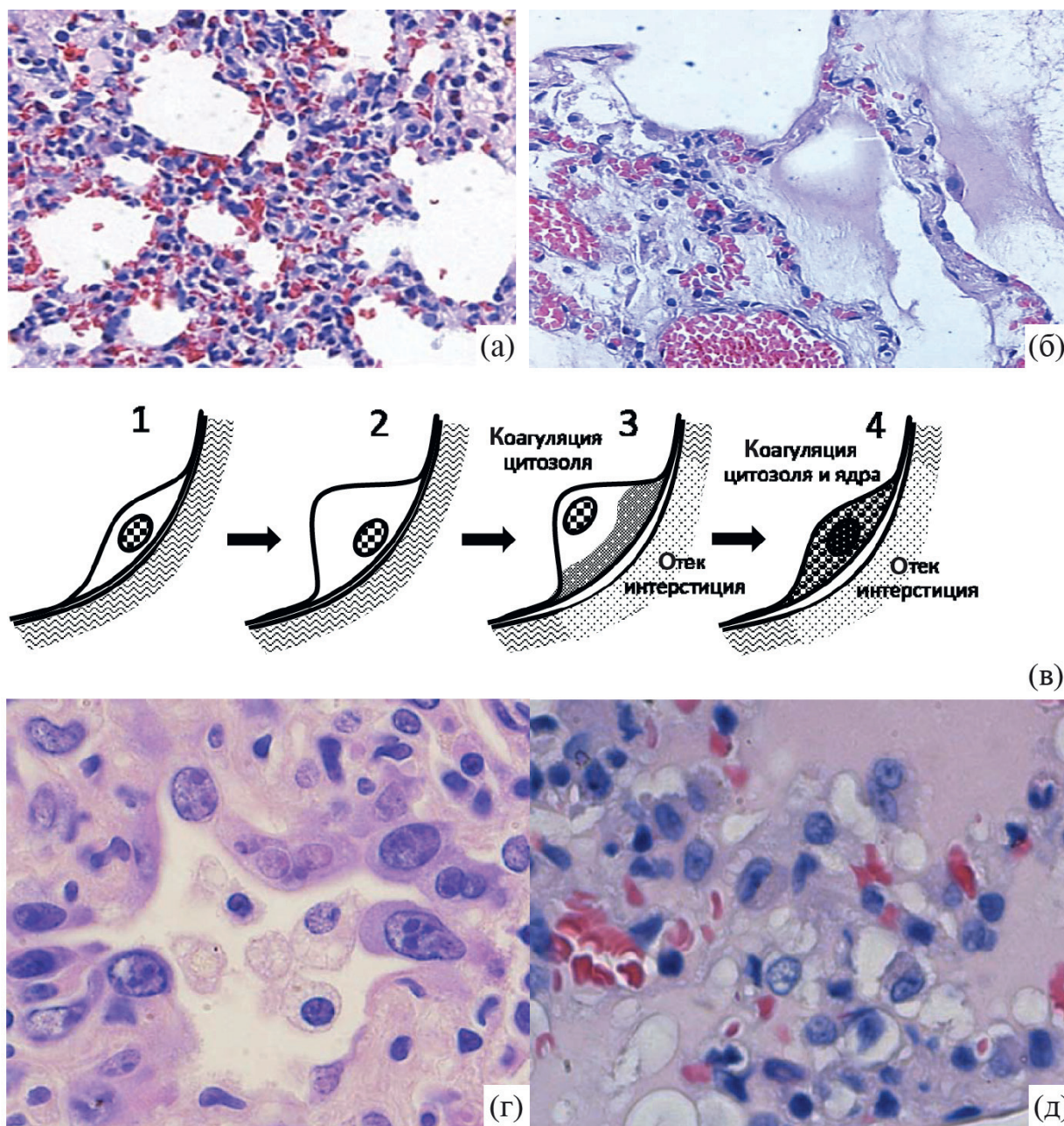
Исследования выполняли на неинbredных мышах-самцах массой 18–24 г, полученных из питомника “Рапполово”. Животных содержали в условиях вивария на стандартном рационе питания. Токсический отек легких вызывали ингаляционным статическим отравлением животных дихлорангидридом угольной кислоты в камере в дозе, соответствующей  $LC_{50}$  (Торкунов и др., 2008). После отравления температуру воздуха в помещении, где находились животные поддерживали на уровне 19–21°C. Для забора морфологического материала животных одномоментно умерщвляли дислокацией шейных позвонков с последующей препаровкой трахеи для исключения заброса крови в воздухоносные пути. Легкие исследовали через 30 мин, 3 и 24 ч после воздействия пульмонотоксиканта. Иссеченные образцы ткани фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, обезживали по общепринятой методике и заливали в парафин, изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм. Изготовленные срезы легочной ткани окрашивали: толлуидиновым синим с докраской эозином для выявления популяции тучных клеток; орсеином

для выявления эластических волокон; по методу Браше для выявления РНК-содержащих структур; по методу Маллори в модификации для выявления фибрина (Меркулов, 1969).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В характеристике действия пульмонотоксикантов имеет место давняя дискуссия о первичности повреждений эпителиального или сосудистого компонентов в механизме формирования нарушений. В пользу первично сосудистых повреждений приводится аргумент, что дихлорангидрид угольной кислоты и перфторизобутилен реализуют свое действие на уровне богатых капиллярами альвеол и не вызывают серьезных повреждений других структур, что было опровергнуто в данной работе. В пользу же специфичных эпителиальных повреждений свидетельствует тот факт, что пульмонотоксиканты реализуют поражающее действие только при ингаляционном введении. Внутрибрюшинное их введение, в отличие от солей серебра, не вызывает повреждений мезотелия, а, главное, не вызывает системного повреждения эндотелия сосудов, при этом отек легких не формируется (Толкач, 2020). Все вышесказанное определяет понимание первичности эпителиальных повреждений с формированием воспалительной реакции на повреждение, однако при светооптическом морфологическом исследовании наиболее выраженные изменения в ранний период прослеживаются со стороны микрососудов, а нарушения гемодинамики соответствуют классическим схемам формирования легочного отека (Чучалин, 2005).

Уже через 30 мин (рис. 1) после воздействия токсиканта в легких отмечены существенные нарушения микроциркуляции крови с ее перераспределением и депонированием в резко расширенных, полнокровных и сильно выбухающих в просвет альвеол петлях альвеолярных капилляров и в венах, что подтверждает роль гидростатического компонента в формировании отека. Артериальные бронхиальные сосуды спазмированы. Помимо изменений сосудистого тонуса, имеют место изменения структуры клеток крови, что соответствует описаниям (Aggarwal et al., 2019). Эритроциты в сосудах нередко деформированы и агрегированы в составе микротромбов, располагаясь в венах пристеночно сообразно диаграмме скорости кровотока по просвету микрососудов. Прослежено увеличение количества лейкоцитов в крови. По-видимому, повреждение эпителия способствует выбросу тканевого тромбопластина, поступление которого в капиллярный кровоток опреде-



**Рис. 1.** Структура легочной паренхимы у мышей через 30 мин после ингаляционного воздействия дихлорангидрида угольной кислоты в дозе  $1 \text{ LC}_{50}$ . Окраска гематоксилин-эозин. (а) — полнокровие капилляров перегородок, пролабирующих в просвет альвеол (об.  $\times 20$ ); (б) — полнокровие венозных сосудов с набуханием перегородок и пропотеванием белоксодержащей жидкости в просвет альвеол (об.  $\times 40$ ); (в) — стадийные изменения респираторного альвеолоцита вследствие коллоидно-осмотического состояния цитозоля и подлежащей соединительной ткани; (г) — изменения мембраносвязанных и просветных клеток эпителия альвеолы и макрофагов (об.  $\times 100$ ); (д) — кариорексис в эндотелиальных клетках и инфильтрация перегородки полиморфноядерными лейкоцитами, участвующими в резорбции альвеолярного выпота (об.  $\times 100$ ).

ляет вероятность тромбоза обменных и емкостных сосудов гемомикроциркуляторного русла, а сохраняющийся приток крови в них формирует гидростатическое давление, способствующее пропотеванию плазмы, однако выраженных

повреждений эпителиальной выстилки к этому сроку не отмечено. Стаз эритроцитов, их агрегация и частичный гемолиз с деформацией наблюдаются в альвеолярных капиллярах (рис. 1а). Отдельные легочные венулы мелкого и средне-

го калибра закупорены крупными агрегатами частично гемолизированных эритроцитов или сформированными уже к этому сроку наблюдения фибриноидно-эритроидными тромбами. Местами наблюдается диапедез деформированных и лизированных эритроцитов в просвете альвеол. Несмотря на адекватную фиксацию материала на срезах выявлена зернистость плазмы, соответствующая диспротеинемии и нарушению свертывания.

Нарушения микроциркуляции крови коррелируют с очаговыми изменениями воздушности легочной паренхимы. Сочетание зон ателектаза и частичного спадания альвеол наблюдается как в центральных сегментах по ходу сосудисто-бронхиальных путей, так и в периферических отделах легких. Кроме того, прослежено формирование локальной эмфиземы органа с резким расширением полостей альвеолярных ходов и альвеол с сильным истончением альвеолярных перегородок (рис. 1б). Природа этой острой эмфиземы требует пояснения и может быть сопряжена как с компенсаторным ателектазом изменением воздушности легочной ткани, так и с сопротивлением выдоху на фоне спастической или обтурационной бронхообструкции при токсическом или вторично-воспалительном нарушении эластичности ткани легкого (Aggarwal et al., 2019). Выраженная неравномерность воздушности паренхимы легкого, в свою очередь, соразмерна значительными колебаниями плотности распределения альвеолоцитов — от скопления ядросодержащих элементов на базальной мембране до истончения выстилки с оголением ее структур в эмфизематозных участках. Это соответствует результатам исследований, выполненных при отравлении перфторизобутиленом (Толкач и др., 2020), когда изменение формы клеток и их слущивание в просвет альвеол создают условия для разрушения барьера и перипеллюлярного пропотевания жидкости.

Среди респираторных альвеолоцитов, слущенных в альвеолы, находящихся на перегородках и местах сильно выбухающих в просвет, отмечены дегидратированные формы или элементы с признаками коагуляционных изменений. Ядра таких клеток — небольших размеров с уплотненным хроматином и выраженной эозинофилией кариоплазмы, цитоплазма также интенсивно воспринимает эозин и выглядит стекловидно-гомогенной с мелкими вакуолеобразными просветлениями и с уплотнением на периферии клетки. У значительной части клеток выявлено асимметричное увеличение объема цитоплазмы на стороне, обращенной в просвет альвеол. В перегородках также обнаружены клетки, имеющие значительный объем зернистой и вакуолизиро-

ванной цитоплазмы, и более светлые набухшие ядра с ядрышком. Осмотические изменения цитоплазмы клеток с появлением зон перераспределения жидкости могут возникать вследствие влияния как внешних осмоактивных факторов, так и вследствие реализации осмотического потенциала коллоида цитозоля, проявляющегося в сдвиге (часто обратимом) полимеризации его белков (Сотников, 1985). В этом случае прослеженную эволюцию форм эпителиоцитов — от призматических через полярнодегидратированные до коагулированных — можно связать с результатом токсического воздействия, причем по вектору изменений их источник однозначно определен со стороны интерстиция межальвеолярной перегородки (рис. 1в). В секреторирующих гранулярных альвеолоцитах II типа встречаются литические изменения ядер, но иногда выявляются единичные фигуры митоза.

Продолжая дискуссию о топике первичных изменений, следует отметить, что при десквамации в просвет альвеол клетки в свободном состоянии в изотонической пропотевавшей плазме имеют призматическую форму и часто формируют своеобразную культуру, хоть и временно, приобретая отличный от прикрепленных к мембране тип метаболизма и функциональную активность. Для клеток разных популяций, как находящихся в составе альвеолярных перегородок, так и оказавшихся в просвете альвеол, прослежено большое разнообразие форм, характеризующих их функциональное состояние от выраженной функциональной активности до некроза с накоплением в альвеолах клеточного детрита (рис. 1г). Значительно чаще, чем альвеолоциты I типа, в просветах альвеол встречаются секреторирующие альвеолярные эпителиоциты (альвеолоциты II типа), повышение многообразия которых в просвете альвеол соответствует уменьшению их количества в составе альвеолярных перегородок. Клетки хорошо идентифицируются при окраске суданом черным по более сильной суданофилии их цитоплазмы. У большинства клеток она интенсивно гомогенная и особенно яркая в наплывах цитоплазмы в сторону альвеолярных полостей. В зонах резкого расширения альвеол и альвеолярных ходов при истончении перегородок гранулярные альвеолоциты не определяются. Отмечены также клетки со слабой общей суданофилией цитоплазмы, но имеющие отдельные мелкие ярко суданофильные диффузно размещенные гранулы. Свойства клеток этого дифферона косвенно могут свидетельствовать об имевшей место в самые ранние сроки постинтоксикационного периода активации их функциональной секреторной активности.

Слушивание клеток эпителия происходит с усилением миграции в легкие мелкоячеистых форм лейкоцитов (малые лимфоциты, нейтрофильные гранулоциты) с их экстравазацией в структуры интерстиция альвеолярных перегородок, а также с их выходом в просвет альвеол (рис. 1д). Существенно реже наблюдается выход в альвеолярные полости моноцитов и плазмоцитов. В альвеолярных пространствах отмечены привязанные к альвеолярной выстилке альвеолярные макрофаги. Большинство их, как в просвете альвеол, так и в составе альвеолярных перегородок, обладают увеличенным объемом цитоплазмы, в которой при большом увеличении выявлены множественные, часто железосодержащие при окраске по Перлсу, фагоцитируемые вакуоли. В отдельных макрофагах отмечены остатки лизированных ядер. На поверхности некоторых слушенных в просвет альвеол макрофагов адгезированы обесцвеченные, разрушенные эритроциты. Большинство лимфоцитов и лейкоцитов, как попавших в просвет альвеол, так и в интерстиции альвеолярных перегородок, имеют уплотненный ядерный хроматин или пикнотичные ядра.

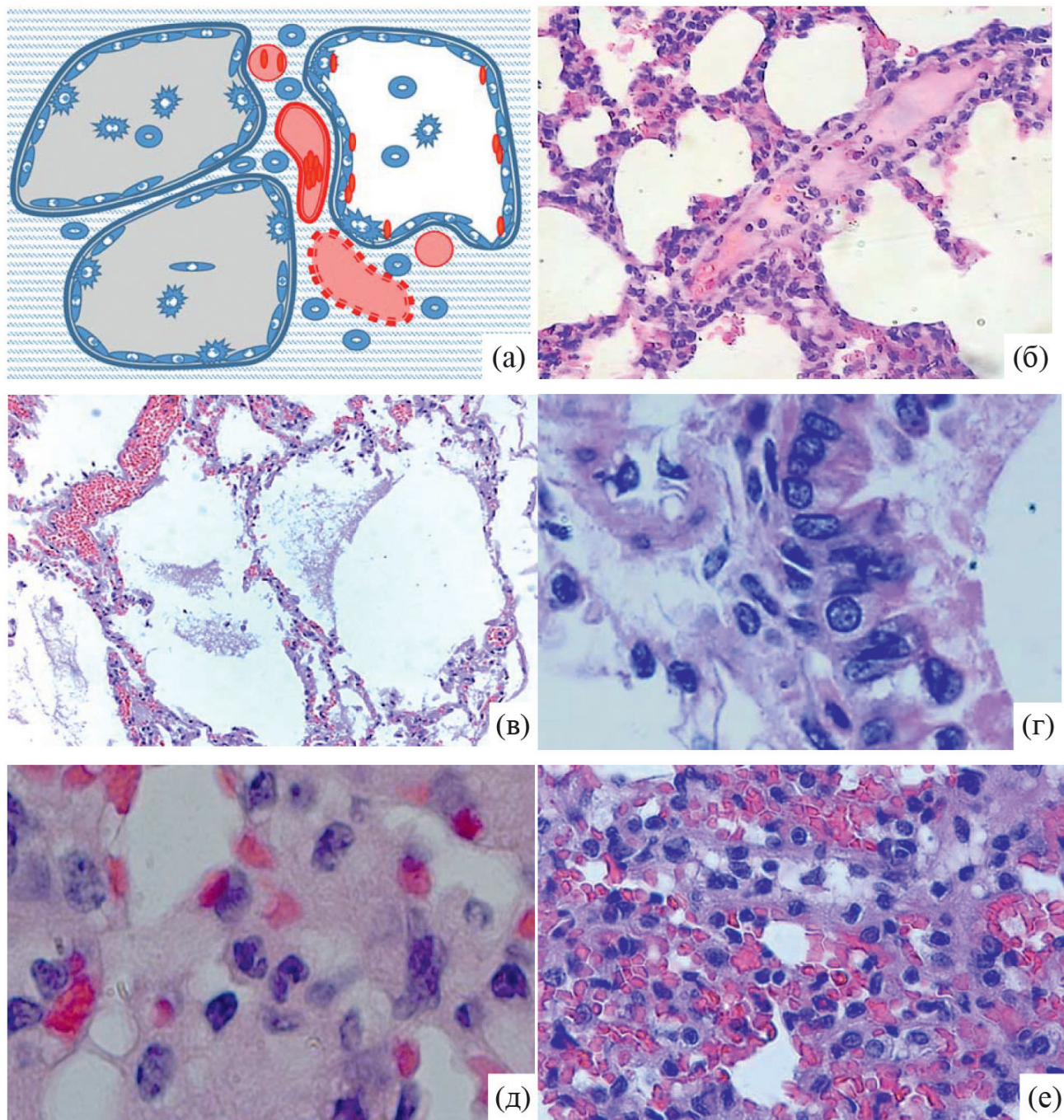
В эпителии бронхов, как крупных, так и мелких, а также в меньшей степени в бронхиолах, обнаруживается диссоциация эпителиальных клеток с проявлениями дезорганизации и коагуляционного некроза. Наблюдаются округление апикальных отделов клеток выстилки с редукцией плотных апикальных контактов между ними, секвестрация апикальных частей мерцательного эпителия, опустошение бокаловидных клеток, гибель и слушивание эпителиоцитов в просвет альвеол. Можно также констатировать пикноз ядер эпителия во многих участках эпителиального пласта. Эта объективная картина изменений противоречит ранее высказанным представлениям (Толкач, 2020) о действии дихлорангидрида угольной кислоты преимущественно на альвеолярную выстилку. Такая избирательность может быть связана с физико-химическими свойствами  $\text{COCl}_2$ , плохо растворимого в воде, что определяет меньшую вероятность поражения бронхов и большую тропность яда к структурам аэрогематического барьера (Cao et al., 2022; Pauluhn, 2022). Однако никто не исключает наличия у дихлорангидрида угольной кислоты классических прижигающих свойств по отношению как к воздухоносным путям (Radbel et al., 2020), так и к конъюнктиве глаз (Tiwari, Raghavan, 2022).

Через 3 ч (рис. 2) после отравления в легких отмечены значительные дистрофические и деструктивные изменения, затрагивающие практически все структурные компоненты ткани

органа (рис. 2а). При замедлении кровотока, переходящем в стаз с депонированием крови в капиллярах и венозном русле, прослежена дилатация и неравномерные паретические расширения микрососудов с неравномерным распределением жидкой фракции крови и клеточного компонента по ветвям венозных легочных сосудов, а также петлям альвеолярных капилляров. Большинство септальных венул плазмалемальные (рис. 2б) с редкими обтурирующими их просвет плотными массами агрегированных частично гемолизированных эритроцитов. Адгезия лизированных эритроцитов сопровождается отеком и плазматическим пропитыванием стенок сосудов, особенно венозных. В таких зонах нередко выявляются вытянутые светлоядерные активные формы клеток, относящиеся, вероятно, к пристеночным внутрисосудистым макрофагам. На препаратах, окрашенных по Маллори на фибрин, прослежено изменение цветовой гаммы плазмы вследствие трансформации (модификации) структуры ее белков и выпадения тонких нитей фибрина. Резко расширенные артериальные легочные сосуды оказываются запустевшими, а их стенки утолщенными, отечными, с тотальным набуханием миоцитов. Запустевшими выглядели и бронхиальные артериальные сосуды. В эндотелии сосудов отмечена гидропическая дистрофия цитоплазмы клеток нередко с выраженной вакуолизацией и лизисом их ядер. Отмечены также эндотелиоциты с пикнозом ядер или перинуклеарной агрегацией хроматина. Прослежен выраженный отек периваскулярной соединительной ткани с диапедезом эритроцитов или обширными кровоизлияниями по ходу бронхиальных сосудов.

К этому сроку у большинства животных общая воздушность легочной ткани возрастает за счет как расправления части альвеол, затронутых ателектазом, так и увеличения доли легочных ацинусов с эмфиземой центрлобулярного типа (рис. 2в).

Степень поражения бронхиального эпителия варьирует в бронхах разного калибра. Масштабность и выраженность дистрофии и некроза эпителиальных клеток возрастает в более крупных бронхах и доступна при оценке изменений бронхоальвеолярного лаважа (Aggarwal et al., 2019; Shao et al., 2022). В мелких и терминальных бронхах выявлены очаговые подэпителиальные скопления значительных объемов отеменной жидкости, которые определяют взбухание эпителиальных пластов клеток в просвет бронхов, создавая картину выраженной складчатости эпителия. При этом в отдельных ветвях бронхов просветы заполнены значительным количеством слушенных пластов эпителиоцитов,



**Рис. 2.** Структура легочной паренхимы у мышей через 3 ч после ингаляционного воздействия дихлорангидрида угольной кислоты в дозе 1  $LCt_{50}$ . Окраска гематоксин-эозин. (а) — схема формирующихся гистопатологических изменений (пояснения в тексте); (б) — плазмалемальные септальные вены (об.  $\times 40$ ); (в) — расширение просветов альвеол с резорбируемым белковым выпотом при полнокровии частично тромбированных септальных сосудов (об.  $\times 20$ ); (г) — дистрофические изменения эпителия бронха с апикальным некрозом, с отторжением части цитозоля клеток и гибелью альвеолоцитов в составе эпителиального пласта (об.  $\times 100$ ); (д) — инфильтрация межальвеолярных перегородок полиморфоядерными лейкоцитами (об.  $\times 100$ ); (е) — микротромбы в капиллярах перегородок и очаги диапедеза эритроцитов в просвет альвеол (об.  $\times 40$ ).

вызывающих обтурацию просвета воздухопроводящих путей. Прослежена, хотя и в меньшей степени, чем в предыдущий срок наблюдения, секвестрация апикальных частей и десквамация отдельных клеток (рис. 2г). На поверхности эпителия и в просветах бронхов отмечены разрушенные эритроциты. В составе эпителиального пласта с разреженным расположением диссоциированных клеток выявлены мерцательные эпителиоциты призматической формы и уплощенные клетки, сохранившие лишь узкий ободок перинуклеарной цитоплазмы. Местами эпителий выглядит высоким, многорядным или как нагромождение клеток, по всей видимости, из-за задержки в апикальных отделах выстилки эпителиоцитов, потерявших связь с базальной мембраной и имеющих сморщенные или лизировавшиеся ядра. Практически все реснитчатые призматические клетки эпителия бронхов очень слабо или совсем не аффинны к пиронину при окраске по Браше, что отражает редукцию белоксинтезирующего аппарата клеток. Отмечены небольшие зоны оголения и деструкции базальной мембраны бронхов. В стенках бронхов в соединительной ткани и в эпителиальном пласте выявлены пикнотичные клетки воспалительного инфильтрата, их наибольшее количество наблюдается в эпителии крупных бронхов, а на поверхности эпителия адгезированы деформированные лизированные эритроциты.

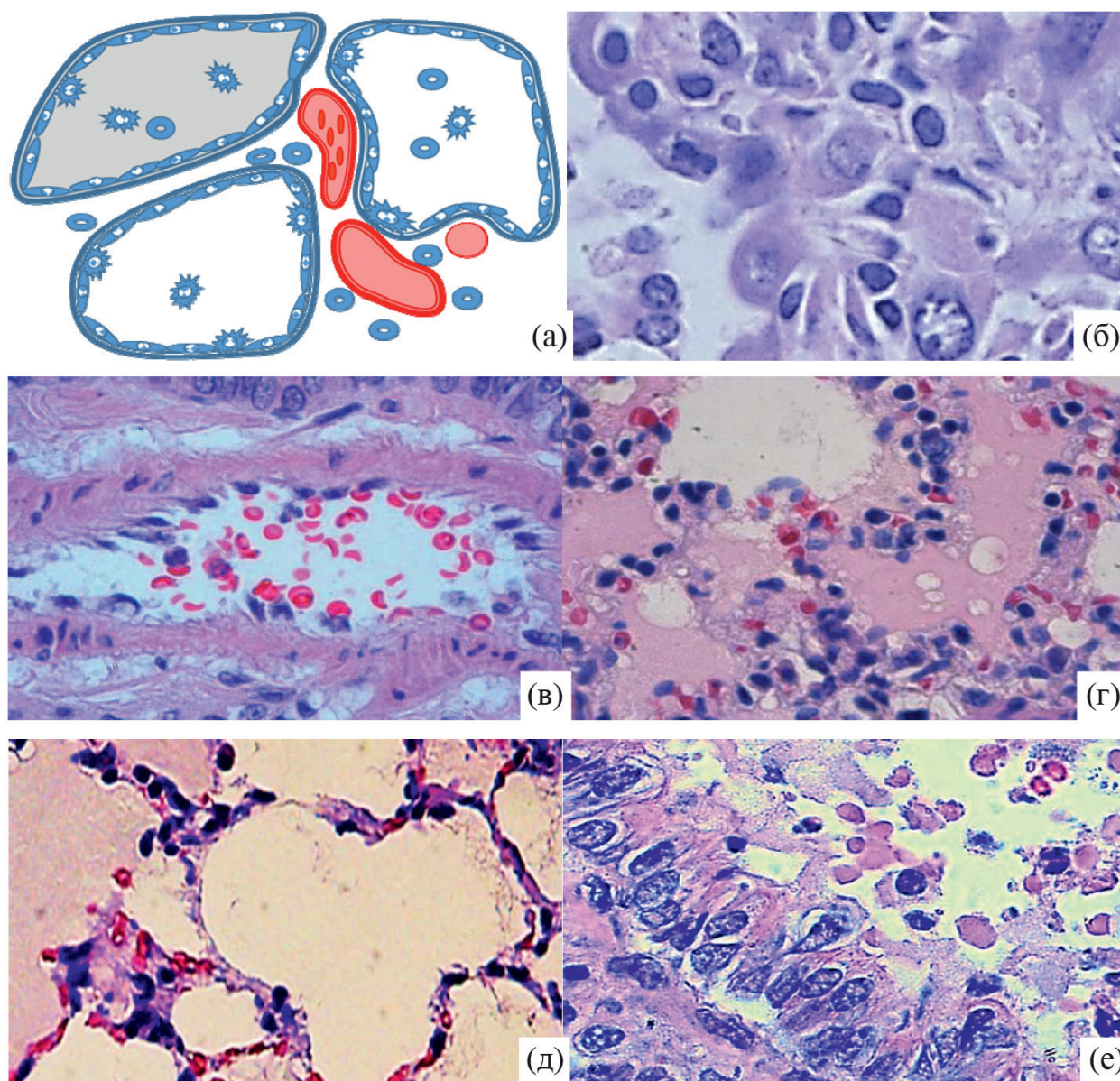
По мере восстановления отмечены и процессы начинающейся репарации эпителиальной выстилки с увеличением размеров и просветлением хроматина ядер, количества и размеров ядрышек, с появлением ярко пиронинофильного перинуклеарного ободка у части клеток. Эти процессы более выражены в низких базальных (замещающих) клетках и сохранившихся ампутированных эпителиоцитах. Местами активированные эпителиоциты формируют ряды по 4–6 клеток, некоторые из которых двухядерные.

В альвеолярных перегородках отмечен интерстициальный отек структур соединительной ткани. Отек интерстиция при относительно сохранной эпителиальной выстилке наиболее выражен в ацинусах без эмфиземы. Отечная жидкость обнаруживается в просветах альвеол и бронхов. Просветы части альвеол заполнены эритроцитами. К этому сроку еще более возрастает доля легочной ткани, в которой альвеолярные перегородки теряют естественные клеточные элементы. В отдельных отечных перегородках определяются лишь дистрофически измененные или лизирующиеся ядра эндотелиальных клеток и измененные клетки инфильтрата, чаще лейкоциты. Некоторые альвеолярные перегородки интенсивно инфильтрированы полиморфно-

ядерными лейкоцитами с увеличенным относительным содержанием моноцитов и макрофагов (рис. 2д). В эмфизематозных участках стенки альвеолярных перегородок выстилают эритроциты. В просветах альвеол с пропотеванием отечной жидкости и диапедезными эритроцитами (рис. 2е) местами насчитывается до 4–6 пристеночных макрофагов в функционально активном состоянии фагоцитирующих отечные массы. В цитоплазме интерстициальных макрофагов часто встречаются фагоцитированные ими, поврежденные или погибшие клетки инфильтрата, их ядерный детрит. Для плазматических клеток, встречающихся в альвеолярных перегородках, характерны явление клазматоза и пикнотизация ядра.

К первым суткам (рис. 3) после воздействия токсиканта деструктивные изменения нарастают вследствие истощения резервных возможностей поврежденных клеток (рис. 3а). Восстановление нарушенного популяционного объема и уровня физиологической активности клеток происходит из неповрежденных источников регенерации (рис. 3б). Фиксированные клеточные элементы альвеолярных перегородок, а также популяции подвижных клеток, мигрирующих из кровотока, активно участвуют в элиминации структурных повреждений и устранении погибших клеток легочной паренхимы.

Морфологические признаки атонии сосудов отражают нарушенную микроциркуляцию крови в легких. К ним относятся появление фестончатого извитого контура сосудов с микроаневризмами и выраженная неравномерность толщины стенок сосудов по его окружности (рис. 3в). Неравномерность толщины стенок сосудов вызвана сокращением миоцитов в утолщенных участках и их дистонией в зонах истончения стенок. В последнем случае ядра миоцитов совсем не выявлены, или же имеют место кариолиз или пикноз ядер. Как компенсаторную реакцию на гибель части гладкомышечных клеток оценивают появление в стенках сосудов отдельных миоцитов с набухшими ядрами и с активной формой ядрышкового аппарата. Признаки некроза (пикноз, кариолиз) или выраженная гидропическая дистрофия с крупнокапельной вакуолизацией ядер отмечены в подавляющем большинстве эндотелиальных клеток во всех звеньях микроциркуляции. Определены супрабазальные скопления отечной жидкости в стенках артериол с диапедезом эритроцитов и единичных мононуклеаров с пикноморфными ядрами, способствующие локальному слушиванию эндотелиоцитов в просвет сосудов (рис. 3г). Усиление эмфиземы легочной паренхимы увеличивает объем ткани с редукцией кровоснабжения. В перерастянутых



**Рис. 3.** Структура легочной паренхимы у мышей через 1 сут после ингаляционного воздействия дихлорангидрида угольной кислоты в дозе 1  $LC_{50}$ .

Окраска гематоксилин-эозин. (а) — схема формирующихся гистопатологических изменений (пояснение в тексте); (б) — метафазные “пластинки” в сохранившихся альвеолоцитах ацинарных ходов (об.  $\times 100$ ); (в) — дистоническое расширение септальных сосудов, сопровождающееся дистрофическими изменениями клеток мышечной оболочки сосуда и плазматическим пропитыванием паравазальной соединительной ткани (об.  $\times 40$ ); (г) — дистрофические изменения клеток и слущивание эпителия в просвет альвеол с резорбцией выпота активированными формами макрофагов (об.  $\times 100$ ); (д) — эмфизема свободных от выпота альвеол, в перерастянутых перегородках которых прослеживали редукцию капилляров с мелкими агрегатами лизированных эритроцитов (об.  $\times 20$ ); (е) — дистрофические изменения и гибель клеток эпителия бронхов с накоплением обсемененного кокковой флорой клеточного детрита в просвете (об.  $\times 100$ ).

альвеолярных перегородках прослежена редукция капилляров, их просветы заполнены мелкими агрегатами лизированных эритроцитов, а при гибели эндотелиоцитов или кариолизисе на светоптическом уровне капилляры не выявляются (рис. 3д). При этом наблюдаются как спавшиеся,

так и переполненные кровью с гемолизом пристеночных агрегатов эритроцитов септальные вены. Проявление положительной динамики нарушенной микроциркуляции — обнаруженные отдельные венозные сосуды с признаками резорбции застойной фибриноидной плазмы

вдоль эндотелиальной выстилки. Значительная часть внутрисосудистых макрофагов имеют сморщенные гомогенные и деформированные ядра, резко смещенные на периферию цитоплазмы небольшого объема. Аналогичного вида макрофаги в незначительном количестве расположены пристеночно в просветах альвеол.

К суткам после отравления нарастает эмфизема легких с перерастяжением и разрывами альвеолярных перегородок. В расширенных просветах терминальных и мелких бронхиол, в начальных участках ветвления более крупных бронхов просветы забиты клеточным детритом из слущенного эпителия со слизью (рис. 3е). В слущенном эпителии изредка отмечается вегетирование колоний микробной флоры. Эпителий крупных бронхов на обширных участках их стенки из-за слущивания и гибели значительной части эпителиоцитов сильно уплощен, вытянут вдоль базальной мембраны. В локусах некроза эпителия его распространение прослеживается и на подлежащие гладкомышечные клетки с кариолизом и пикнозом ядер миоцитов. Слизистая оболочка терминальных и мелких бронхиол сохраняет представительство призматического эпителия. Увеличена доля слизиобразующих клеток, которые приобретают шарообразную форму с ядром в центре клетки, окруженным со всех сторон секреторными вакуолями. Альвеолярные пространства в разной степени сохраняют воздушность, часть из них заполнены эритроцитами, даже в свободных альвеолах наблюдается гемолиз диапедезных эритроцитов, прижатых отеком жидкостью к альвеолярным перегородкам. Эритроциты встречаются и в интерстиции альвеолярных перегородок.

Как в просветах альвеол, так и в составе альвеолярных перегородок сохранившиеся альвеолоциты II типа чаще всего характеризуются небольшими клеточными размерами, округлыми контурами, уплотненным хроматином, отсутствием или редукцией ядрышек, а также просветленной перинуклеарной цитоплазмой, незначительным количеством или отсутствием вакуолей. Все эти проявления относят к морфологическим признакам резкого снижения как белоксинтезирующей активности клеток, так и, очевидно, секреции пластинчатых телец. При окраске суданом черным суданофильные включения в клетках альвеолярных перегородок отмечены в единичных случаях. По мере увеличения объема легочной паренхимы, затронутой эмфиземой, на оголяемых альвеолярных перегородках альвеолоциты II типа практически не выявлены.

Формирование острой эмфиземы сопряжено с изменениями эластического каркаса легких в виде перерастяжения эластических волокон.

Эластические волокна альвеолярных перегородок несколько истончены и удлинены. Изменяется и их пространственная архитектура в стенках альвеол: в отеком перегородах эластические волокна вытянуты по краю поверхностей альвеолярной стенки, чем сдерживают их растяжение, а доля срезанных поперек эластических волокон снижается. Эластические мембраны сосудов с учетом отмеченных ранее локальных дистонических изменений либо вытянуты на одних участках стенки, либо сильно складчаты на других.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные морфологические исследования призваны уточнить механизм формирования альвеолярного выпота при отравлении дихлорангидридом угольной кислоты в смертельных дозах для формирования единой терапевтической стратегии купирования возникающих патологических изменений после реализации первичного токсического действия яда. Наиболее очевидное предположение — отнесение рассматриваемого патологического процесса к острому респираторному дистресс-синдрому, обусловленному воспалением легочной ткани, изменением ее воздушности, и к вторичному изменению перфузии с нарушением гидростатических градиентов. Механизмы формирования воспалительной реакции остаются не ясными, учитывая липофильность токсиканта (Cao et al., 2022; Pauluhn, 2022). Вместе с тем, прослеженные изменения слизистой дистальных бронхиол позволяют рассматривать их как пусковой фактор нарушений. Повреждения клеток и накопление клеточного детрита становятся причиной обтурационно обусловленной эмфиземы легочных ацинусов с соответствующей перестройкой микроциркуляции ткани органа. Эпителий дистальных бронхиол и ацинарных ходов, хотя и в значимо меньшей степени, чем респираторный эпителий альвеол, способен участвовать в газообмене. По-видимому, его повреждение определяет всасывание токсиканта и реализацию токсического действия на уровне легочных ацинусов. Такое предположение определяет прослеженные наблюдения формирования патологии:

- полнокровие, гемокоагуляцию и перераспределение фракций крови в межальвеолярных и септальных сосудах до формирования видимых повреждений респираторного эпителия;

- вторичность необратимых повреждений респираторных альвеолоцитов по отношению к плазматическому пропитыванию подлежащей соединительной ткани;

— слушивание в просвет альвеол жизнеспособных альвеолоцитов, прослеживаемых в составе альвеолярного выпота.

В альвеолах установлено поражение всех типов альвеолоцитов, однако слушивание секреторных сурфактантпродуцирующих реснитчатых клеток с признаками коагуляционных и литических изменений отмечено в значимо большем количестве. Дистрофические изменения вплоть до некроза констатированы также среди отдельных эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток сосудистого русла. Эпителий крупных бронхов к первым суткам практически лишен нормально функционирующих клеток, а недифференцированный распластаный регенерат лишь прикрывает оголенные базальные мембраны. В терминальных бронхиолах, где степень поражения эпителиальных клеток меньше, компенсаторно-замещающая передифференцировка мерцательного эпителия направлена на слизееобразование, т. е. имеет место бокаловидная метаплазия, тогда как в норме бронхиолы не содержат бокаловидных клеток.

Прослеженные изменения определяют необходимость применения бронхорасширяющих средств для профилактики экспираторного напряжения, способствующего растягиванию альвеол и формированию эмфиземы с перерастяжением эластического каркаса и с характерной вторичной редукцией кровообращения. Применение респираторной поддержки будет способствовать повышению интенсивности газообмена в легких, однако мера сопротивления на выдохе должна лишь обеспечить снижение выраженности пропотевания жидкости и пролабирования капилляров в просвет сосудов и не должна превышать давления заклинивания легочных капилляров, которое равно конечному диастолическому давлению крови в левом желудочке — 5–13 мм рт.ст. В отличие от кардиогенного отека легких избыток остаточного давления на выдохе в целях повышения оксигенации ткани будет, вместе с тем, способствовать перерастяжению поврежденных альвеол. Мероприятия респираторной поддержки должны быть обеспечены фармакологическим снижением гидростатического давления, реализуемым как посредством интенсификации оттока крови из легких, так и профилактикой токсической NO-зависимой эндотелиальной дисфункции с формированием часто стероидрезистентного пареза емкостных сосудов и с депонированием крови в них. Направленные мероприятия должны сопрягаться с противовоспалительной терапией стероидами и препаратами цитокинов, стратегии которой были детально отработаны во время эпидемии COVID-19 (Chaudhuri et al., 2021).

Таким образом, проведенные исследования позволили уточнить представления о токсическом действии дихлорангидрида угольной кислоты и с позиций единых биологических закономерностей формирования патологии определить направления их терапевтической коррекции.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования на животных выполнены по программе, одобренной комиссией по этике и биоэтике ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ. Животных содержали в надлежащих условиях вивария (разрешение Главного государственного ветеринарного инспектора Санкт-Петербурга № 78-1102/19, сертификат ISO 9001:2015 № ST. RU.0001.M0017187, сертификат соответствия стандарту GLP № GLP-0727-1020).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зильбер А.П. Респираторная медицина (этюды критической медицины). Петрозаводск: ПетрГУ, 1996. Т. 2. 488 с.
- Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. Л.: Медицина, 1969. 424 с.
- Мотавкин П.А., Гельцер Б.И. Клиническая и экспериментальная патофизиология легких. М.: Наука, 1998. 366 с.
- Сотников О.С. Динамика структуры живого нейрона. Л.: Наука, 1985. 160 с.
- Толкач П.Г. Изучение механизма токсического действия дихлорангидрида угольной кислоты // Токсикол. вестн. 2020. № 3 (162). С. 26–32.
- Толкач П.Г., Башарин В.А., Ченур С.В. и др. Ультраструктурные изменения аэрогематического барьера крыс при острой интоксикации продуктами пиролиза фторопласта // Бюл. эксп. биол. мед. 2020. Т. 169 (2). С. 235–241.
- Торкунов П.А., Шабанов П.Д., Земляной А.В. Фармакологическая коррекция токсического отека легких. СПб.: Элби-СПб., 2008. 176 с.
- Чучалин А.Г. Отек легких: физиология легочного кровообращения и патофизиология отека легких // Пульмонология. 2005. № 4. С. 9–18.

- Aggarwal S., Jilling T., Doran S. *et al.* Phosgene inhalation causes hemolysis and acute lung injury // *Toxicol. Lett.* 2019. V. 312. P. 204–213.  
https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.04.019
- Cao C., Zhang L., Shen J. Phosgene-induced acute lung injury: approaches for mechanism-based treatment strategies // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. P. 917395.  
https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.917395
- Chaudhuri D., Sasaki K., Karhar A. *et al.* Corticosteroids in COVID-19 and non-COVID-19 ARDS: a systematic review and meta-analysis // *Intensive Care Med.* 2021. V. 47. P. 521–537.  
https://doi.org/10.1007/s00134-021-06394-2
- He D.-K., Xu N., Shao Y.-R., Shen J. NLRP3 gene silencing ameliorates phosgene-induced acute lung injury in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome and proinflammatory factors, but not anti-inflammatory factors // *J. Toxicol. Sci.* 2020. V. 45 (10). P. 625–637.  
https://doi.org/10.2131/jts.45.625
- Lu Q., Huang S., Meng X. *et al.* Mechanism of phosgene-induced acute lung injury and treatment strategy // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 10933.  
https://doi.org/10.3390/ijms222010933
- Pauluhn J. Phosgene inhalation toxicity: update on mechanisms and mechanism-based treatment strategies // *Toxicology.* 2021. V. 450. P. 152682.  
https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152682
- Pauluhn J. Derivation of thresholds for inhaled chemically reactive irritants: searching for substance-specific common denominators for read-across prediction // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2022. V. 130. P. 105131.  
https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2022.105131
- Radbel J., Laskin D.L., Laskin J.D., Kipen H.M. Disease-modifying treatment of chemical threat agent-induced acute lung injury // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2020. V. 1480 (1). P. 14–29.  
https://doi.org/10.1111/nyas.14438
- Shao Y., Jiang Z., He D., Shen J. NEDD4 attenuates phosgene-induced acute lung injury through the inhibition of Notch1 activation // *J. Cell. Mol. Med.* 2022. V. 26 (10). P. 2831–2840.  
https://doi.org/10.1111/jcmm.17296
- Tiwari R.R., Raghavan S. Chronic low-dose exposure to highly toxic gas phosgene and its effect on peak expiratory flow rate // *Indian J. Occup. Environ. Med.* 2022. V. 26 (3). P. 189–192.  
https://doi.org/10.4103/ijoem.ijoem\_417\_20

## Structural Changes of Lung Tissues in the Dynamics of Inhalation Poisoning with Carbonic Acid Dichlorohydride

P. A. Torkunov<sup>a,\*</sup>, S. V. Chepur<sup>b</sup>, P. D. Shabanov<sup>a</sup>, A. V. Zemlyanoy<sup>c</sup>, O. V. Torkunova<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup>State Research Testing Institute of Military Medicine, St. Petersburg, Russia

<sup>c</sup>Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Kuzmolovsky settlement, Leningrad Region, Russia

<sup>d</sup>State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia

\*e-mail: tpa4@mail.ru

A study of structural changes in lung tissue during the formation of organ edema due to inhalation of a lipotropic poison, carbonic acid dichloride, showed the peculiarities of the formation of acute respiratory distress syndrome. The point of application of the poison is the distal bronchioles, the epithelium of which is subject to dystrophic and necrotic changes followed by goblet metaplasia. The absorbed poison causes pronounced changes in blood microcirculation, steroid-resistant NO-mediated endothelial dysfunction with blood deposition in dilated capillaries, aggregation and lysis of erythrocytes. Changes in the vascular bed in the interalveolar septa precede the formation of an acute inflammatory reaction with the accumulation of alveolar effusion and dystrophic changes in the alveolar epithelium with cell desquamation. Among the cells of the alveolar lining, type II alveolocytes are the most vulnerable. Plasma permeation of the connective tissue of the interalveolar septa interstitium is accompanied by their infiltration with polymorphonuclear leukocytes and activation of macrophages. Desquamation of epithelial cells of the distal bronchioles leads to obstruction of their lumens and, through the valve mechanism, contributes to overextension of the alveoli with the formation of emphysema and reduction of capillary blood circulation in the alveolar septa. The observed changes determined the directions for improving the treatment of poisoning by asphyxiating poisons.

**Keywords:** inhalation poisoning, pulmonary edema, pathogenesis, carbonic acid dichloride

УДК 615.917+616.24-005.98

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕСПИРАТОРНОЙ ПОДДЕРЖКИ В РАННЕМ ПЕРИОДЕ ИНТОКСИКАЦИИ КРОЛИКОВ ПРОДУКТАМИ ТЕРМОДЕСТРУКЦИИ ФТОРОПЛАСТА-4

© 2024 г. П. Г. Толкач<sup>1, \*</sup>, Д. М. Ярошенко<sup>1</sup>, А. А. Ховпачев<sup>1</sup>, Д. Т. Сизова<sup>1</sup>,  
Ю. Д. Илатовская<sup>2</sup>, Г. Ю. Грачёва<sup>2, 3</sup>, В. А. Башарин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Ветеринарная клиника онкологии, травматологии и интенсивной терапии доктора Сотникова,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: pgtolkach@gmail.com

Поступила в редакцию 19.02.2024 г.

После доработки 24.02.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Ингаляционное поступление ацилирующих пульмонотоксикантов (фосген, перфторизобутилен) приводит к формированию токсического отека легких, фармакологические подходы к лечению которого малоэффективны. Для лечения отека легких нетоксического генеза успешно применяют респираторную терапию. Данные об эффективности респираторной поддержки при токсическом отеке легких ограничены. Цель исследования — экспериментальная оценка эффективности проведения протективной искусственной вентиляции легких с поддержанием положительного давления в конце выдоха в раннем периоде интоксикации продуктами термодеструкции фторопласта-4. В экспериментальном исследовании установлено, что раннее проведение протективной искусственной вентиляции легких с поддержанием положительного давления в конце выдоха — эффективный подход для коррекции токсического отека легких у кроликов в раннем периоде интоксикации продуктами термодеструкции фторопласта-4, обладающими пульмонотоксическим действием. Проведение респираторной поддержки может быть перспективным подходом для лечения токсического отека легких, вызванного интоксикацией ацилирующими пульмонотоксикантами.

**Ключевые слова:** протективная искусственная вентиляция легких, положительное давление в конце выдоха, токсический отек легких, респираторная поддержка, фторопласт

DOI: 10.31857/S0042132424040063, EDN: PPEBND

### ВВЕДЕНИЕ

Ацилирующие агенты (фосген и перфторизобутилен) широко применяются в различных отраслях промышленности как исходные компоненты для синтеза пластмасс, красителей, пестицидов и др. (Паншин, 1978; Grainge, Rice, 2010; Jugg, 2016). Помимо этого, перфторизобутилен может образовываться при горении фторсодержащих полимерных материалов, например фторопласта (Meng et al., 2010; Patocka, 2019). При случайном или преднамеренном поступлении ацилирующих агентов в окружающую среду может появиться большое число пострадавших, что приведет к сверхнормативной нагрузке на систему здравоохранения (Graham et al.,

2018; Patocka, 2019). Данные вещества обладают высокой токсичностью, при ингаляционном поступлении приводят к отеку легких, проявляющемуся после скрытого периода, который может длиться до 48 ч (Grainge, Rice, 2010). В экспериментах на лабораторных животных продемонстрировано, что патологические процессы, прогрессирующие в легких при моделировании интоксикации фосгеном и перфторизобутиленом, имеют схожие черты, что предполагает общность их механизмов действия (Muir et al., 2005). Эти токсиканты представляют собой сильные электрофилы, которые вступают в реакцию ацилирования с нуклеофильными компонентами макромолекул, поэтому их на-

зывают ацилирующими агентами. Поскольку их ингаляционное воздействие приводит к поражению легких, их можно объединить в общую группу — ацилирующие пульмонотоксиканты. Следует отметить, что на сегодня окончательный механизм пульмонотоксического действия ацилирующих агентов окончательно не изучен (Башарин и др., 2019; Patocka, 2019), эффективные фармакологические подходы к проведению этиотропной и патогенетической терапии отсутствуют (Parkhouse et al., 2007; Meng et al., 2010).

Существует ряд сходств между отеком легких, вызванным воздействием ацилирующих пульмонотоксикантов, и отеком легких нетоксического генеза (например, кардиогенный отек легких): нарушение целостности альвеолярного барьера, артериальная гипоксемия и др. (Parkhouse et al., 2007). Исходя из этого, можно предположить, что методы, разработанные для лечения отека легких нетоксического генеза, могут быть использованы для лечения отека легких химической этиологии (Graham et al., 2018). В клинической медицине для купирования отека легких нетоксического генеза применяют протективную искусственную вентиляцию легких с поддержанием положительного давления в конце выдоха — протективную ИВЛ с ПДКВ (Parkhouse et al., 2007; Graham et al., 2018). Предположительно, данный вид респираторной поддержки может быть использован и для лечения отека легких, вызванного интоксикацией ацилирующими пульмонотоксикантами (Башарин и др., 2019).

Цель исследования — в экспериментах на кроликах оценить эффективность проведения протективной ИВЛ с ПДКВ в раннем периоде интоксикации продуктами термодеструкции фторопласта-4.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модельного ацилирующего пульмонотоксиканта использовали продукты термического разложения фторопласта-4, содержащие перфторизобутилен, которым в первую очередь обусловлена токсичность образующейся газовой смеси (Паншин, 1978).

Работа проведена на кроликах-самцах породы Советская шиншилла ( $n = 12$ ). При проведении исследования соблюдали правила экспериментальной работы с использованием лабораторных животных. Для выведения животных из эксперимента осуществляли внутривенное введение 10%-ного раствора лидокаина. Кроликов разделили на группы (в каждой группе  $n = 3$ ): интактные; контроль (животные находились в ингаляционной камере в течение 15 мин,

дышали атмосферным воздухом, через 1 ч им начинали протективную ИВЛ с ПДКВ); интоксикация (животных подвергали ингаляционному воздействию продуктов термодеструкции фторопласта-4); лечение (животных подвергали ингаляционному воздействию продуктов термодеструкции фторопласта-4, через 1 ч им начинали протективную ИВЛ с ПДКВ).

Кроликов подвергали тяжелой ингаляционной интоксикации продуктами термодеструкции фторопласта-4 в концентрации, соответствующей двум средним летальным (экспозиция — 15 мин). Содержание монооксида углерода и кислорода в ингаляционной камере измеряли с помощью газоанализатора Автотест-02.02 (МЕТА, Россия).

Для индукции анестезии кроликам вводили раствор тилетамина+золазепама (Золетил 100, Virbac, France) 15 мг/кг, внутривенно и пипекурония бромида (Gedeon Richter Ltd., Hungary) 1 мг/особь, внутривенно. После достижения седации и миорелаксации осуществляли интубацию трахеи (трубка № 3,0 с манжетой). Искусственную вентиляцию легких проводили с помощью аппаратов Mindray SynoVent E3 (Mindray, China) и Medtronic Puritan Bennett 840 (Medtronic, USA) в режиме принудительной вентиляции с контролем по давлению. Начало вентиляции осуществляли с параметрами: фракция кислорода во вдыхаемом воздухе ( $\text{FiO}_2$ ) — 0.3, положительное давление в конце выдоха (ПДКВ) — 5 см вод.ст., пиковое давление — 13–15 см вод.ст., частота дыхания —  $35\text{--}40 \times \text{мин}^{-1}$ , на этом фоне дыхательный объем составил 20–25 мл, а минутный объем дыхания — 0.7–1.0 л/мин. Поддержание анестезии осуществляли путем введения тилетамина+золазепама ( $5 \text{ мг} \times \text{ч/кг}$  внутривенно с помощью инфузомата) и пипекурония бромида (0.5 мг/особь внутривенно при появлении спонтанного дыхания). Респираторную поддержку животным группы контроль и лечение начинали через 1 ч после воздействия, проводили в течение 5 ч.

Во время проведения респираторной поддержки осуществляли мониторинг сатурации гемоглобина крови и парциального давления диоксида углерода в выдыхаемом воздухе ( $\text{PeCO}_2$ ) с помощью ветеринарного монитора Mindray uMEC12 Vet (Mindray, China), выполняли аускультацию. Непосредственно перед началом проведения респираторной поддержки и выведением животных из эксперимента выполняли анализ газового состава артериальной крови с помощью портативного анализатора i-STAT (Abbott Laboratories, USA). Определяли показатель кислотности (pH), парциальное давление кислорода, парциальное давление уг-

лекислого газа. При проведении анализа газового состава артериальной крови учитывали  $\text{FiO}_2$  и ректальную температуру. В качестве интегрального параметра рассчитывали индекс оксигенации (ИО) — отношение парциального давления кислорода в артериальной крови к фракции кислорода во вдыхаемом воздухе ( $\text{paO}_2/\text{FiO}_2$ ) (Ярошецкий, 2020).

Через 6 ч после окончания воздействия выводили из эксперимента кроликов групп контроль, интоксикация и лечение, извлекали легкие, проводили макроскопическое исследование.

Полученные экспериментальные данные выражали в виде медианы, первого и третьего квартилей —  $\text{Me} [Q_1; Q_3]$ . Для сравнения двух и более независимых групп использовали критерий Краскела—Уоллиса и критерий Ньюмана—Кейлса. Для сравнения связанных данных использовали Т-критерий Уилкоксона. О значимости различий между группами судили при уровне  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В отдельной серии экспериментов кроликам группы контроль через 1 ч после воздействия атмосферного воздуха осуществили индукцию анестезии, интубировали трахею, наладили респираторную поддержку, исходное значение ПДКВ составило 5 см вод.ст. Протективную ИВЛ с ПДКВ проводили в течение 5 ч, за это время дважды увеличивали ПДКВ на 2 см вод.ст., через 3 и 4.5 ч после воздействия. На этом фоне пиковое давление составило 15–17 см вод.ст., дыхательный объем — 25–30 мл. На фоне проведения респираторной поддержки сатурация и  $\text{PeCO}_2$  не отличались от фоновых значений (рис. 1а,б). Показатели газового состава артериальной крови, определенные через 1 и 6 ч после воздействия атмосферного воздуха, не отличались от показателей интактных животных. Выявленные через 6 ч после воздействия атмосферного воздуха увеличения  $\text{raO}_2$  и ИО связаны с тем, что у животных группы контроль  $\text{FiO}_2$  составила 0.3, в группе интактные  $\text{FiO}_2$  — 0.21 (табл. 1).

Легочный коэффициент кроликов группы контроль, определенный через 6 ч после воздействия атмосферного воздуха, не значимо отличался от легочного коэффициента интактных животных (рис. 2).

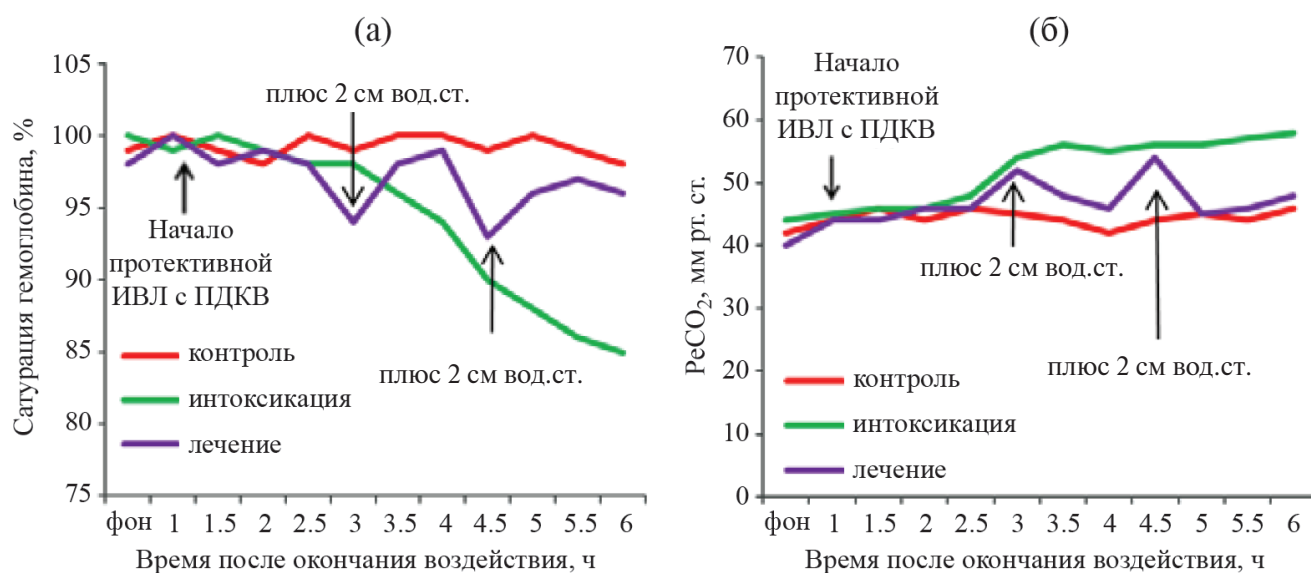
Термодеструкция навески фторопласта-4 приводила к поступлению в ингаляционную камеру аэрозоля белого цвета. Раздражающего действия аэрозоля на кроликов выявлено не было. Концентрация монооксида углерода в ингаля-

ционной камере, определенная после окончания термодеструкции, составила 350 [328; 364] ppm, что соответствует менее 0.1  $\text{LC}_{50}$  для грызунов (Завирский и др., 2020). Содержание кислорода в ингаляционной камере при одновременном нахождении трех кроликов снижалось не более чем на 1.0%. После извлечения кроликов из ингаляционной камеры их состояние не отличалось от интактных животных. Животные группы интоксикация дышали атмосферным воздухом, животным группы лечение через 1 ч после воздействия осуществляли респираторную поддержку с указанными ранее параметрами.

Через 2.5–3 ч после воздействия у животных групп интоксикация и лечение определили снижение сатурации и увеличение  $\text{PeCO}_2$ . У кроликов группы лечение выполнили увеличение ПДКВ на 2 см вод.ст., при этом пиковое давление составило 15–17 см вод.ст., дыхательный объем — 24–28 мл. На этом фоне отметили увеличение сатурации и снижение  $\text{PeCO}_2$  до фоновых значений. Через 4–4.5 ч после воздействия у кроликов группы лечение вновь определили снижение сатурации и нарастание  $\text{PeCO}_2$ . Еще одно увеличение ПДКВ на 2 см вод.ст. (с сохранением дыхательного объема 25–30 мл) привело к нормализации исследуемых параметров. Через 6 ч после воздействия сатурация у кроликов группы лечение была выше (96 [94; 98] %,  $p < 0.05$ ), а  $\text{PeCO}_2$  — ниже (48 [45; 49] мм рт.ст.,  $p < 0.05$ ), по сравнению с показателями кроликов группы интоксикация (85 [83; 88] % и 58 [55; 61] мм рт.ст.), и не отличались от фоновых значений и показателей животных группы контроль (рис. 1). При проведении аускультации через 6 ч после воздействия у кроликов группы интоксикация определили влажные мелкопузырчатые хрипы, у животных группы лечение хрипов не выявили.

Показатели газового состава артериальной крови кроликов групп интоксикация и лечение, определенные через 1 ч после воздействия, не отличались от животных группы контроль. Через 6 ч после воздействия у кроликов группы интоксикация определили артериальную гипоксемию (снижение ИО до 290 [271; 306]) и гиперкапнию ( $\text{raCO}_2$  — 52.8 [50.5; 53.4]). Данные изменения проводили к формированию ацидоза. У кроликов группы лечение на фоне проводимой респираторной поддержки признаков артериальной гипоксемии (ИО — 600 [566; 638]) выявлено не было,  $\text{raCO}_2$  было ниже ( $p < 0.05$ ), по сравнению с показателем кроликов группы интоксикация, значимого снижения pH не выявили (табл. 1).

При проведении макроскопического исследования легких кроликов группы интоксикация



**Рис. 1.** (а) — сатурация гемоглобина крови; (б) — парциальное давление углекислого газа в выдыхаемом воздухе ( $P_{eCO_2}$ ) кроликов, определенное во время проведения респираторной поддержки, Ме.

**Таблица 1.** Некоторые показатели газового состава артериальной крови животных в различные сроки после воздействия, Ме [ $Q_1$ ;  $Q_3$ ]

| Группа       | $t$ , ч | Ректальная температура, °C | $FiO_2$ | Показатель газового состава артериальной крови |                     |                    |                       |
|--------------|---------|----------------------------|---------|------------------------------------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
|              |         |                            |         | pH                                             | $paO_2$ , мм рт.ст. | ИО                 | $paCO_2$ , мм рт.ст.  |
| Интakтные    | —       | 38.1<br>[37.7; 38.6]       | 0.21    | 7.40<br>[7.39; 7.42]                           | 90<br>[89; 91]      | 428<br>[425; 430]  | 34.9<br>[34.7; 35.1]  |
| Контроль     | 1       | 38.5<br>[38.4; 38.6]       | 0.21    | 7.45<br>[7.44; 7.45]                           | 91<br>[90; 92]      | 433<br>[430; 437]  | 37.2<br>[36.9; 37.5]  |
|              | 6       | 38.8<br>[38.3; 39.1]       | 0.3     | 7.41<br>[7.39; 7.43]                           | 120<br>[117; 123]   | 571<br>[564; 587]  | 38.4<br>[37.7; 38.8]  |
| Интoксикация | 1       | 38.4<br>[38.1; 38.9]       | 0.21    | 7.42<br>[7.39; 7.43]                           | 90<br>[89; 91]      | 433<br>[430; 437]  | 37.2<br>[36.8; 37.6]  |
|              | 6       | 39.1<br>[38.8; 39.3]       | 0.3     | 7.29<br>[7.28; 7.31]*                          | 61<br>[57; 64]*     | 290<br>[271; 306]* | 52.8<br>[50.5; 53.4]* |
| Лечение      | 1       | 38.5<br>[38.3; 38.7]       | 0.21    | 7.41<br>[7.40; 7.41]                           | 91<br>[90; 93]      | 434<br>[428; 442]  | 38.6<br>[37.3; 38.8]  |
|              | 6       | 38.7<br>[38.5; 39.2]       | 0.3     | 7.35<br>[7.34; 7.38]#                          | 126<br>[119; 134]#  | 600<br>[566; 638]# | 46.8<br>[46.1; 47.5]# |

Примечание:  $t$  — время забора крови после воздействия;  $FiO_2$  — фракция кислорода во вдыхаемом воздухе; ИО — индекс оксигенации ( $paO_2/FiO_2$ ); \* — различия значимы, по сравнению с группой контроль (6 ч); # — различия значимы по сравнению с группой интоксикация (6 ч); в каждой группе  $n = 3$ .

определили очаги субплеврального кровоизлияния диаметром 1.5–2 см, сглаженность междолевых складок, отделение пенистого содержимого из трахеи и на разрезе легких. Легочный коэффициент был выше ( $p < 0.05$ ), по сравнению с животными группы контроль (рис. 2). На поверхности легких кроликов группы лечение выявили точечные кровоизлияния диаметром 0.1–0.3 см. На разрезе легкие имели пестрый вид, при надавливании выделялось небольшое количество светлой жидкости. Легочный коэффициент был ниже ( $p < 0.05$ ), по сравнению с животными группы интоксикация, однако отличался ( $p < 0.05$ ) от животных группы контроль (рис. 2).

### ОБСУЖДЕНИЕ

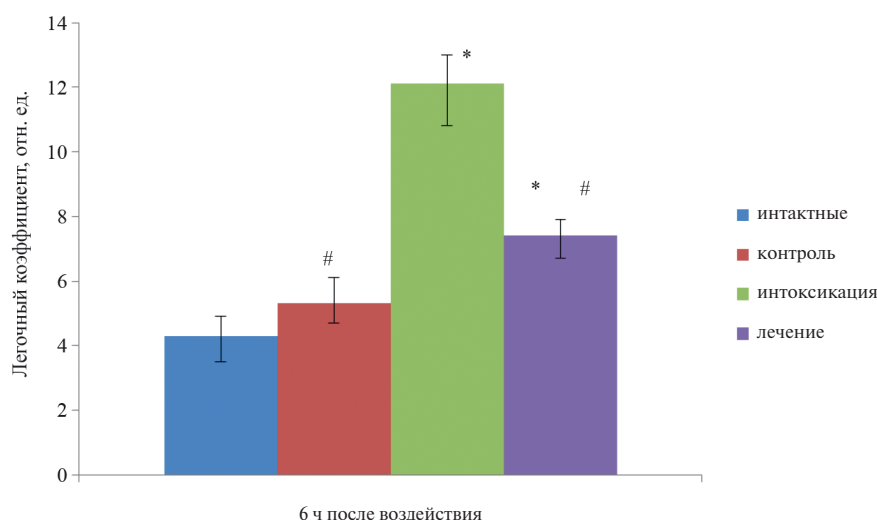
Тяжелая интоксикация ацилирующими пульмоноотоксикантами приводит к отеку легких химического генеза, формирующемуся после скрытого периода (Башарин и др., 2019; Meng et al., 2010; Graham et al., 2018). Важно отметить, что патологические процессы, приводящие к нарушению целостности аэрогематического барьера и к увеличению выхода жидкости и клеточных элементов в альвеолярное пространство, происходят именно в скрытом периоде (Башарин и др., 2019; Grainge, Rice, 2010). Следовательно, лечебные мероприятия должны быть начаты в наикратчайшие сроки после воздействия.

Одним из подходов к лечению поражения легких, вызванного интоксикацией ацилирующими пульмоноотоксикантами, может быть

проведение респираторной поддержки, которую успешно применяют во всем мире для лечения отека легких нетоксического генеза (Parkhouse et al., 2007; Graham et al., 2018; Mistry et al., 2024). Следует обратить внимание на то, что на сегодня какого-либо общепринятого подхода к проведению респираторной поддержки при отеке легких химического генеза нет. С одной стороны, это связано с малым количеством экспериментальных данных об эффективности данного подхода (Parkhouse et al., 2007; Grainge, Rice, 2010; Li et al., 2015; Graham et al., 2018), а с другой — с неполным пониманием ключевых механизмов патогенеза интоксикации ацилирующими пульмоноотоксикантами (Li et al., 2015; Mistry et al., 2024).

В данном экспериментальном исследовании оценили эффективность проведения протективной ИВЛ с ПДКВ для коррекции токсического отека легких в раннем периоде интоксикации животных продуктами термического разложения фторопласта-4, обладающими ацилирующим действием.

В отдельной серии экспериментов кроликам группы контроль в течение 5 ч выполняли протективную ИВЛ с ПДКВ, при этом дважды повышали ПДКВ на 2 см вод.ст. На этом фоне нарушений газообмена выявлено не было. На вскрытии, выполненном через 5 ч после начала респираторной поддержки, макроскопических изменений в тканях легких не обнаружили, легочный коэффициент не отличался от интактных животных. Таким образом, проведение про-



**Рис. 2.** Легочный коэффициент кроликов через 6 ч после воздействия на фоне проведения протективной ИВЛ с ПДКВ, отн. ед., Ме [ $Q_1$ ;  $Q_3$ ].

Примечания: в каждой группе  $n = 3$ ; \* — различия значимы, по сравнению с группой контроль,  $p < 0.05$ ; # — различия значимы, по сравнению с группой интоксикация,  $p < 0.05$ .

тективной ИВЛ с ПДКВ в выбранном режиме не оказывало повреждающего действия на легкие животных.

Через 1 час после воздействия продуктов термического разложения фторопласта-4 состояние кроликов групп интоксикация и лечение не отличалось от интактных животных, различий в газовом составе артериальной крови не выявили, следовательно, протективную ИВЛ с ПДКВ начали еще в скрытом периоде.

У кроликов группы интоксикация через 2.5–3.5 ч после воздействия отметили снижение сатурации и нарастание  $\text{PeCO}_2$ . Перфторизобутилен, входящий в состав продуктов термодеструкции фторопласта-4, проникает глубоко в легкие, вплоть до альвеол и оказывает ацилирующее действие на макромолекулы компонентов аэрогематического барьера (Meng et al., 2010). Патологические процессы, прогрессирующие в скрытом периоде интоксикации, приводят к накоплению жидкости сначала в периваскулярном, а затем в альвеолярном пространстве, что провоцирует нарушение газообмена (Brown et al., 2002). Так, через 6 ч после воздействия отметили еще большее снижение сатурации и нарастание  $\text{PeCO}_2$ . В биохимическом анализе крови выявили признаки артериальной гипоксемии и гиперкапнии, связанные с еще большим накоплением жидкости в альвеолярном пространстве и нарушением газообмена через аэрогематический барьер. Об избыточном накоплении жидкости в тканях легких свидетельствовали макроскопические изменения, определенные при патоморфологическом исследовании, и увеличение легочного коэффициента. Накопление диоксида углерода в крови и нарушение процессов аэробного окисления в тканях вследствие артериальной гипоксемии приводили к формированию смешанного ацидоза. Выполненные исследования свидетельствуют о том, что тяжесть состояния кроликов в раннем постинтоксикационном периоде обусловлена острой дыхательной недостаточностью, сопряженной как с гипоксией, так и с гиперкапнией.

У кроликов группы лечение через 2.5–3 и 4–4.5 ч после воздействия также определили снижение сатурации и нарастание  $\text{PeCO}_2$ , по-видимому, исходного избыточного давления в дыхательных путях было недостаточно для противодействия отеку. В свою очередь ступенчатое повышение ПДКВ на 2 см вод.ст. (с сохранением физиологического дыхательного объема) обладало выраженным протективным эффектом, что проявлялось в сохранении нормальных показателей сатурации,  $\text{PeCO}_2$  и газового состава артериальной крови, определенных через 6 ч после воздействия.

Механизм протективного действия ПДКВ связан с тем, что положительное давление в дыхательных путях приводит к увеличению давления в альвеолах. Это в свою очередь противодействует повышенному гидростатическому давлению в капиллярах, что замедляет патологический ток жидкости в интерстиций, приводит к расправлению коллабированных альвеол и способствует увеличению альвеолярной вентиляции и улучшению газообмена. Помимо этого, положительное давление в дыхательных путях стимулирует перемещение жидкости из альвеол обратно в интерстиций и остановку ее дальнейшего притока (Parkhouse et al., 2007; Roy et al., 2012; Graham et al., 2018; Mistry et al., 2024). О меньшем содержании внесосудистой жидкости в легких свидетельствовало значимое снижение легочного коэффициента, по сравнению с кроликами группы интоксикация.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Раннее начало протективной искусственной вентиляции легких со ступенчатым увеличением положительного давления в конце выдоха оказалось эффективным для коррекции токсического отека легких у кроликов в раннем периоде интоксикации продуктами термодеструкции фторопласта-4, обладающими пульмонотоксическим действием. Следует отметить, что применение данного подхода не привело к предотвращению формирования отека у животных, а лишь купировало его проявления в раннем постинтоксикационном периоде. Таким образом, остается открытым вопрос о том, настолько будет эффективным проведение протективной ИВЛ с ПДКВ для сохранения жизни лабораторных животных, поддержания структуры и функции дыхательной системы в отдаленном периоде тяжелой интоксикации ацилирующими пульмонотоксикантами.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета ФГБВОУ ВО Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБВОУ ВО Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ. В работе руководствовались требованиями нор-

мативно-правовых актов о порядке экспериментальной работы с использованием животных, в том числе по гуманному отношению к ним.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Башарин В.А., Чепур С.В., Шёголев А.В. и др. Роль и место респираторной поддержки в схемах терапии острого легочного отека, вызванного ингаляционным воздействием токсичных веществ // Воен.-мед. журн. 2019. Т. 340 (11). С. 26–32.
- Завирский А.В., Зацепин В.В., Башарин В.А. и др. Экспериментальная модель комбинированного радиационно-химического поражения в результате воздействия рентгеновского излучения и монооксида углерода // Medline.ru. 2020. Т. 21. С. 11–22.
- Панишин Ю.А., Малкевич С.Г., Дунаевская Ц.С. Фторопласты. Л.: Химия, 1978. 232 с.
- Ярошецкий А.И., Грицан А.И., Авдеев С.Н. и др. Диагностика и интенсивная терапия острого респираторного дистресс-синдрома // Анестезиол. реаниматол. 2020. № 2. С. 5–39.
- Brown R.F., Jugg B.J., Harban F.M. et al. Pathophysiological responses following phosgene exposure in the anaesthetized pig // J. Appl. Toxicol. 2002. V. 22. P. 263–269.
- Grainge C., Rice P. Management of phosgene-induced acute lung injury // Clin. Toxicol. 2010. V. 48. P. 497–508.
- Graham S., Fairhall S., Rutter S. et al. Continuous positive airway pressure: an early intervention to prevent phosgene-induced acute lung injury // Toxicol. Lett. 2018. V. 293. P. 120–126.
- Jugg B.J. Toxicology and treatment of phosgene induced lung injury // Chem. Warfare Toxicol. 2016. V. 1. P. 117–153.
- Li W., Rosenbruch M., Pauluhn J. Effect of PEEP on phosgene-induced lung edema: pilot study on dogs using protective ventilation strategies // Exp. Toxicol. Pathol. 2015. V. 67. P. 109–116.
- Meng G., Zhao J., Wang H.-M. et al. Cell injuries of the blood-air barrier in acute lung injury caused by perfluoroisobutylene exposure // J. Occup. Health. 2010. V. 52. P. 48–57.
- Mistry S., Scott T.E., Jugg B.J. et al. An *in silico* porcine model of phosgene-induced lung injury predicts clinically relevant benefits from application of continuous positive airway pressure up to 8 h post exposure // Toxicol. Lett. 2024. V. 391. P. 45–54.
- Muir B., Cooper D.B., Carrick W.A. et al. Analysis of chemical warfare agents III. Use of bis-nucleophiles in the trace level determination of phosgene and perfluoroisobutylene // J. Chromatogr. A. 2005. V. 1098 (1–2). P. 156–165.
- Parkhouse D.A., Brown R.F., Jugg B.J. et al. Protective ventilation strategies in the management of phosgene-induced acute lung injury // Mil. Med. 2007. V. 172. P. 295–300.
- Patocka J. Perfluoroisobutene: poisonous choking gas // Mil. Med. Sci. Lett. 2019. V. 88 (3). P. 98–105.
- Roy S., Sadowitz B., Andrews P. et al. Early stabilizing alveolar ventilation prevents ARDS: a novel timing-based ventilatory intervention to avert lung injury // J. Trauma Acute Care Surg. 2012. V. 73. P. 391–400.

## The Effectiveness of Respiratory Support in the Early Period of Intoxication of Rabbits with Products of Thermal Degradation of Fluoroplast-4

P. G. Tolkach<sup>a,\*</sup>, D. M. Yaroshenko<sup>a</sup>, A. A. Khovpachev<sup>a</sup>, D. T. Sizova<sup>a</sup>, Yu. D. Ilatovskaya<sup>b</sup>, G. U. Gracheva<sup>b,c</sup>, V. A. Basharin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup>Veterinary clinic of oncology, traumatology and intensive care of Dr. Sotnikov, St. Petersburg, Russia

<sup>c</sup>St. Petersburg State University of veterinary medicine, St. Petersburg, Russia

\*e-mail: pgtolkach@gmail.com

Inhalation intoxication with acylating pulmonotoxicants (phosgene, perfluoroisobutylene) leads to the formation of toxic pulmonary edema, pharmacological approaches to the treatment of which are ineffective. Respiratory therapy is successfully used to treat non-toxic pulmonary edema. Data on the effectiveness of respiratory support in toxic pulmonary edema are limited. The aim of the study was to experimentally evaluate the effectiveness of protective ventilation with positive end-expiratory pressure in the early period of intoxication by products of thermal degradation of fluoroplast-4. Early initiation of protective ventilation with positive end-expiratory pressure proved to be effective for the correction of toxic pulmonary edema in rabbits in the early period of intoxication by products of thermal degradation of fluoroplast-4 with pulmonotoxic effects. Respiratory support may be an effective approach for the treatment of toxic pulmonary edema caused by intoxication with acylating pulmonotoxicants.

**Keywords:** protective ventilation, positive end-expiratory pressure, toxic pulmonary edema, respiratory support, fluoroplast

УДК 612.115.3:615.273.52

## ВОССТАНОВЛЕНИЕ НОРМАЛЬНОЙ СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ ХИТОЗАНОМ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПОКОАГУЛЯЦИИ АСПИРИНОМ

© 2024 г. М. Е. Григорьева<sup>1, \*</sup>, Т. Ю. Оберган<sup>1</sup>, Л. А. Ляпина<sup>1</sup>, Т. А. Шубина<sup>1</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*e-mail: mgrigorjeva@mail.ru

Поступила в редакцию 23.04.2024 г.

После доработки 06.05.2024 г.

Принята к публикации 06.05.2024 г.

Проведено исследование изменения показателей свертывания крови в условиях *in vitro* при разном времени инкубации (5 мин и 30 мин) хитозана (ХТЗ) с нормальной и с гипокоагуляционной плазмой крыс. Добавление ХТЗ к плазме нормальных животных приводит к повышению ее прокоагулянтной активности независимо от длительности инкубации. Однако увеличение времени до 30 мин способствует более значительному снижению фибриндеполимеризационной активности крови. Инкубация ХТЗ с гипокоагуляционной плазмой, полученной после введения животным ацетилсалициловой кислоты (однократно, перорально в дозе 2 мг/кг), в течение как 5 мин, так и 30 мин приводит к активации свертываемости крови. В этих условиях удлинение времени инкубации вызывает более выраженные эффекты этого препарата: значительное повышение концентрации фибриногена, АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов, степени полимеризации фибрина и снижение неферментативного фибринолиза. При этом большинство исследуемых показателей гемостаза приближаются к значениям, соответствующим нормальному уровню. Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о высокой эффективности ХТЗ в качестве средства, восстанавливающего нормальную свертываемость крови и блокирующего явления кровоточивости при гипокоагуляционных состояниях.

**Ключевые слова:** агрегация тромбоцитов, ацетилсалициловая кислота, гипокоагуляция, полимеризация фибрина, система гемостаза, фибринстабилизирующий фактор, хитозан

DOI: 10.31857/S0042132424040075, EDN: PPDZKQ

### ВВЕДЕНИЕ

Одна из важнейших задач современной медицины — поиск новых путей, которые дают возможность контролировать и/или уменьшать кровотечения различной этиологии. Непрерывный технологический прогресс в отрасли здравоохранения требует обновления подходов к созданию гемостатических средств. В последние годы наблюдается стремительный рост разработок биоматериалов с гемостатическими свойствами нового поколения, которые продолжают совершенствоваться по мере улучшения понимания физиологии и патофизиологии гемостаза (Pereira et al., 2018). Современные представления о процессах свертывания крови позволяют расширить потенциал способов получения безопасных, недорогих и легкодоступных гемостатиков, способных бороться с кровотечениями (Sheppard, Foje, 2022).

Кровотечение — это неблагоприятное событие, возникающее при травмах, хирургических вмешательствах и кровоточивости, которое может стать опасным для жизни. Более того, неконтролируемое кровотечение может осложнить хирургические вмешательства, изменяя исход этих манипуляций. Обычно при травме в месте повреждения активируются тромбоциты, которые вырабатывают фибрин и другие биологически активные вещества, запуская процессы свертывания крови, что приводит к образованию гемостатической пробки. Однако при неконтролируемом кровотечении формирование первичного тромбоцитарного тромба затруднено, поэтому в этом случае необходимо использовать эффективные гемостатические средства для обеспечения немедленного контроля кровоточивости. Это позволит снизить риск осложнений и смертности в результате возникающих ге-

моррагий. С внутренним кровотечением можно эффективно бороться с помощью биологически активных веществ и антифибринолитиков. Однако их применение сопряжено с риском тромбоэмболических осложнений, что обуславливает острую необходимость в постоянном поиске новых и совершенствовании уже имеющихся гемостатических средств (Malik et al., 2021). В настоящее время доступен широкий спектр гемостатиков, выбор которых во многом зависит от их доступности и безопасности, от интенсивности и причин возникновения кровотечения, а также от экономических факторов. К гемостатическим средствам относятся и биоматериалы на основе хитозана, которые демонстрируют антибактериальные, противогрибковые, кровоостанавливающие и обезболивающие свойства, в дополнение к их биосовместимости, биодеградации и ранозаживляющему эффекту (Gheorghită et al., 2023).

Хитозан (ХТЗ) — природный полисахарид, получаемый из различных источников, например хитина ракообразных. Установлено, что ХТЗ обладает умеренной свертывающей активностью (Cassano et al., 2017). ХТЗ и его производные с разной молекулярной массой и степенью деацетилирования отличаются по своим физико-химическим характеристикам, в определенных условиях, согласно мнению некоторых авторов, могут обладать свойствами поликатионов и за счет электростатического взаимодействия с клетками крови способствовать их активации и агрегации (Neveleff et al., 2010). ХТЗ — многообещающее гемостатическое средство, он, как сообщается (Malik et al., 2021), усиливает гемостаз даже у пациентов с коагулопатией. В экспериментах *in vitro* и при пероральном введении ХТЗ здоровым животным доказана его способность вызывать усиление свертываемости крови за счет повышения агрегации тромбоцитов, снижения фибринолитического потенциала крови и возрастания степени полимеризации фибрина (Ляпина и др., 2022а; Шубина и др., 2022). В условиях моделирования гипокоагуляции, вызванной введением антикоагулянта гепарина, ХТЗ восстанавливает параметры свертывания крови (Ляпина и др., 2022б). Однако дальнейшее детальное изучение влияния ХТЗ на состояние системы гемостаза при патологическом снижении свертываемости крови разной этиологии остается актуальным.

Известно, что возрастанию риска геморрагических осложнений в организме может способствовать длительное и бесконтрольное применение повышенных доз не только антикоагулянтов, но и антиагрегантов. Хорошо известны эффекты в организме одного из наиболее распространен-

ных антиагрегантов — ацетилсалициловой кислоты (аспирина, АСК). Однако его роль в первичной профилактике сердечно-сосудистых заболеваний остается спорной, а потенциальная польза ограничивается повышенным риском кровотечений (Zheng, Roddick, 2019; Murphy et al., 2021). Получены убедительные доказательства того, что в малых дозах этот препарат значительно снижает риски сосудистых событий: инфаркта миокарда — на 22%, инсульта — на 5%. Во вторичной профилактике этот препарат уменьшает риск повторных инфарктов и инсультов в еще большей степени (на 22–46%) за счет ингибирования тромбоксана  $A_2$  (Capodanno, Angiolillo, 2016). Кроме того, аспирин применяется для лечения целого ряда симптомов, включая воспалительные заболевания, а также опухолевые процессы, и входит в группу нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). Механизм его действия заключается в подавлении активности циклооксигеназ ЦОГ-1 и ЦОГ-2 — ферментов, регулирующих превращение арахидоновой кислоты в простагландины, простациклин и тромбоксан. В отличие от других НПВП при применении аспирина эти эффекты необратимы (Lichtenberger, Vijayan, 2019).

Цель настоящей работы — оценить влияние ХТЗ на свертывание крови в условиях *in vitro* при разной длительности инкубации с плазмой крыс в норме и при моделировании гипокоагуляции, вызванной пероральным введением антиагреганта аспирина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения экспериментов в условиях *in vitro* использовано 20 половозрелых лабораторных белых крыс-самцов Wistar массой 250–280 г, полученных из питомника лабораторных животных “Столбовая” Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (Московская обл., Россия). Содержание животных и все экспериментальные процедуры соответствовали международным биоэтическим нормам (Директива 2010/63/EU Европейского сообщества от 22.09.2010) и этическим нормам работы с животными, установленными национальным стандартом РФ ГОСТ 33044-2014 “Принципы надлежащей лабораторной практики”.

В работе использован сублимированный водорастворимый ХТЗ (сукцинил хитозан) (Биопрогресс, Россия) и антиагрегант аспирин (АСК) (Hebei Jiheng Pharmaceutical Co., China), которые перед употреблением растворяли в 0.9%-ном растворе хлорида натрия (Мосфарм, Россия).

### Дизайн исследования

В условиях *in vitro* проведено две серии экспериментов с использованием пула плазмы крыс.

В первой серии исследованы параметры гемостаза при добавлении ХТЗ к плазме, полученной от нормальных (здоровых) крыс. К образцам плазмы (0.1 мл) добавляли 0.05 мл раствора ХТЗ (5 мг/мл) или физиологического раствора, инкубировали при 37°C в течение 5 или 30 мин, а затем выполняли биохимические исследования. Использование 5- и 30-минутной инкубации ХТЗ с плазмой крови необходимо для того, чтобы выяснить: 1) степень влияния ХТЗ (усиление/ослабление/нейтральность) на параметры гемостаза и 2) оптимальный период инкубации ХТЗ с плазмой для проявления его прокоагулянтных эффектов.

В эксперименте использованы следующие группы: первая группа (Контроль 1) — нормальная плазма (НП) с добавлением 0.85%-ного NaCl, инкубация 5 мин; вторая группа (ХТЗ-5) — НП с добавлением ХТЗ, инкубация 5 мин; третья группа (Контроль 2) — НП с добавлением 0.85%-ного NaCl, инкубация 30 мин; четвертая группа (ХТЗ-30) — НП с добавлением ХТЗ, инкубация 30 мин.

Во второй серии опытов использован пул гипокоагуляционной плазмы (ГПП). Моделирование состояния гипокоагуляции в крови крыс осуществляли пероральным введением АСК, снижающей агрегацию тромбоцитов (однократно в дозе 2 мг/кг массы тела животного). Через 20 мин после применения АСК производили забор крови. Далее к 0.1 мл полученной плазмы крови добавляли 0.05 мл или раствора ХТЗ в концентрации 5 мг/мл, или физиологического раствора, инкубировали при 37°C в течение 5 или 30 мин, а затем оценивали параметры гемостаза.

Использованы следующие экспериментальные группы: первая группа (Контроль 3) — НП с добавлением 0.85%-ного NaCl, инкубация 5 мин; вторая группа (ГПП+NaCl-5) — гипокоагуляционная плазма (ГПП) с добавлением 0.85%-ного NaCl, инкубация 5 мин; третья группа (ГПП+ХТЗ-5) — ГПП с добавлением ХТЗ, инкубация 5 мин; четвертая группа (Контроль 4) — НП с добавлением 0.85%-ного NaCl, инкубация 30 мин; пятая группа (ГПП+NaCl-30) — ГПП с добавлением 0.85%-ного NaCl, инкубация 30 мин; шестая группа (ГПП+ХТЗ-30) — ГПП с добавлением ХТЗ, инкубация 30 мин.

### Оценка состояния системы гемостаза

Образцы крови для определения показателей гемостаза получали из яремной вены

(v. jugularis) крыс, наркотизированных внутривенным введением 2%-ного раствора ксилазина (Alfasan International B.V., Netherlands) в количестве 0.2 мл/кг массы тела. В качестве консерванта использован 3.8%-ный раствор цитрата натрия в соотношении кровь/консервант = 9:1. Для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами, образцы крови центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин, а для получения плазмы, бедной тромбоцитами, — при 2000 об/мин в течение 15 мин. После центрифугирования собирали пул плазмы, с которым работали, как описано выше.

Исследование всех параметров системы гемостаза проводили согласно стандартным коагулологическим методам (Ляпина и др., 2023). В плазме, обогащенной тромбоцитами, измеряли агрегацию тромбоцитов (АТ) по методу Борна на агрегометре АЛАТ-2 ЛА 220 (Биола, Россия) по инструкции к прибору с использованием в качестве индуктора агрегации АДФ (в конечной концентрации  $10^{-6}$  М). В бедной тромбоцитами плазме определяли активность фибринстабилизирующего фактора свертывания XIIIa (FXIIIa), тромбиновое время (ТВ) и концентрацию фибриногена по Клаусу, используя стандартные наборы реактивов (Ренам, Технология-Стандарт, Россия) на анализаторе свертывания крови АСКa 2-02-Астра (Астра, Россия). Фибринолитическую активность определяли по тестам полимеризации фибрина (ПФ) и фибриндеполимеризационной (или неферментативной) фибринолитической активности (ФДПА) на пластинах нестабилизированного фибрина. После выполнения теста оценивали ФДПА по зонам лизиса на пластинах, а степень ПФ рассчитывали по формуле:  $(L_k/L_o) \times 100\%$ , где  $L_k$  — размер зоны лизиса после инкубации плазмы с физиологическим раствором (контроль),  $L_o$  — размер зоны лизиса после инкубации плазмы с ХТЗ (опыт).

### Статистическая обработка данных

По каждому методу исследования для всех экспериментов выполнено не менее трех повторов. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Анализ данных на нормальность распределения проверяли по тесту Шапиро–Уилка. Для описания количественных данных использовали среднее арифметическое  $M$  и стандартную ошибку среднего  $m$ . Статистическую значимость межгрупповых различий оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим парным сравнением выборок

с помощью критерия Ньюмена–Кейлса. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов исследовали параметры гемостаза при добавлении ХТЗ к плазме крови нормальных крыс и дальнейшей инкубации опытных образцов в течение 5 или 30 мин. При этом установлено повышение свертываемости крови, по сравнению с контрольными показателями (добавление к пулу плазмы крови физиологического раствора), независимо от длительности инкубации. В группе ХТЗ-5 наблюдалось снижение ФДПА и ТВ на 27 и 18%, а также повышение ПФ, активности ФХИПа и АТ на 30, 28 и 39% относительно Контроля 1. Увеличение времени инкубации до 30 мин (группа ХТЗ-30) также приводило к увеличению свертывания: ФДПА и ТВ уменьшались на 42 и 23%, а ПФ, активность ФХИПа и АТ превышали значения группы Контроль 2 на 35, 13 и 25% соответственно. При этом не обнаружено достоверных изменений концентрации фибриногена при выбранных временных интервалах инкубации (табл. 1).

Таким образом, добавление ХТЗ к пулу НП приводит к усилению ее прокоагулянтной активности. Длительность инкубации не оказывает существенного влияния на способность ХТЗ повышать свертывание крови, вызывая, однако, более значительное снижение неферментативного фибринолиза (показатель ФДПА).

В следующей серии экспериментов изучали показатели гемостаза при добавлении ХТЗ к плазме крови при моделировании у крыс состояния гипокоагуляции, вызванной введением антиагреганта АСК. Как видно из табл. 2, пероральное введение АСК приводило к снижению свертывающего потенциала крови. В плазме крыс групп ГПП+NaCl-5 и ГПП+NaCl-30 отмечалось увеличение ФДПА на 25–29% и ТВ на 40–32%. При этом степень ПФ, концентрация фибриногена и АТ снижались на 25–38, 45–31 и 22–13% по сравнению с соответствующими значениями в Контроле 3 и Контроле 4.

При инкубации ГПП с ХТЗ в течение 5 мин (группа ГПП+ХТЗ-5) установлено снижение концентрации фибриногена на 36% и возрастание активности ФХИПа на 29% относительно этих показателей в Контроле 3. При этом отмечается тенденция к уменьшению АТ и удлинению ТВ, тогда как ФДПА и степень ПФ соответствуют значениям в плазме нормальных животных (Контроль 3). При сравнении групп ГПП+ХТЗ-5 и ГПП+NaCl-5 практически по всем исследуемым параметрам выявлено достоверное усиление прокоагулянтных свойств крови после инкубации ГПП с ХТЗ: ФДПА и ТВ снижены на 24% в обоих случаях, а ПФ, активность ФХИПа и АТ возрастают на 39, 11 и 19% соответственно (табл. 2).

Увеличение времени инкубации образцов ГПП с ХТЗ до 30 мин приводит к повышению концентрации фибриногена на 23% и АТ на 19% относительно Контроля 4. Сравнение групп

**Таблица 1.** Показатели гемостаза при добавлении к нормальной плазме крови крыс хитозана или физиологического раствора ( $M \pm m$ )

| Условия опыта         | ФДПА, мм <sup>2</sup> | Полимеризация фибрина, % | ФХИПа, ед./мл            | Фибриноген, г/л | ТВ, с        | АТ, %                  |
|-----------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|--------------|------------------------|
| Инкубация 5 мин       |                       |                          |                          |                 |              |                        |
| Группа 1 (Контроль 1) | 19.8 ± 0.7            | 100 ± 2.6                | 124.8 ± 5.6              | 3.7 ± 0.3       | 15.2 ± 0.5   | 100 ± 7.2              |
| Группа 2 (ХТЗ-5)      | 14.5 ± 1.3**          | 130 ± 4.1**              | 159.2 ± 4.4**            | 3.6 ± 0.2       | 12.5 ± 0.8*  | 139 ± 9.0**            |
| Инкубация 30 мин      |                       |                          |                          |                 |              |                        |
| Группа 3 (Контроль 2) | 20.9 ± 2.8            | 101 ± 4.2                | 152.1 ± 4.1              | 3.1 ± 0.3       | 19.6 ± 0.9   | 100 ± 6.3              |
| Группа 4 (ХТЗ-30)     | 12.1 ± 0.9**          | 137 ± 5.6**              | 172.6 ± 5.1 <sup>#</sup> | 2.9 ± 0.2       | 15.1 ± 0.6** | 125 ± 8.5 <sup>#</sup> |

Примечание: \*\* —  $p < 0.01$ , \* —  $p < 0.05$  — статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб Контроля 1 (инкубация 5 мин); \*\* —  $p < 0.01$ , <sup>#</sup> —  $p < 0.05$  — статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб Контроля 2 (инкубация 30 мин). По каждому параметру выполнено не менее трех повторов.

**Таблица 2.** Показатели гемостаза при добавлении к гипокоагуляционной плазме крови крыс хитозана или физиологического раствора ( $M \pm m$ )

| Условия опытов         | ФДПА, мм <sup>2</sup>            | Полимеризация фибрина, %       | ФХП, ед./мл                      | Фибриноген, г/л                  | ТВ, с                          | АТ, %                          |
|------------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Инкубация 5 мин        |                                  |                                |                                  |                                  |                                |                                |
| Группа 1 (Контроль 3)  | 20.0 ± 0.01                      | 100 ± 0.01                     | 127 ± 3.1                        | 2.94 ± 0.15                      | 19.0 ± 1.1                     | 100 ± 4.6                      |
| Группа 2 (ГПП+NaCl-5)  | 25.0 ± 0.01*                     | 75 ± 0.01                      | 134.6 ± 5.4                      | 1.62 ± 0.05**                    | 26.7 ± 0.8**                   | 78 ± 3.5*                      |
| Группа 3 (ГПП+ХТЗ-5)   | 19.0 ± 0.1<br>$p_{2-3} < 0.01$   | 104 ± 0.1<br>$p_{2-3} < 0.01$  | 164 ± 4.0 **<br>$p_{2-3} < 0.05$ | 1.87 ± 0.27*                     | 20.3 ± 1.1<br>$p_{2-3} < 0.05$ | 93 ± 2.4*                      |
| Инкубация 30 мин       |                                  |                                |                                  |                                  |                                |                                |
| Группа 4 (Контроль 4)  | 21 ± 1.6                         | 105 ± 1.6                      | 155.8 ± 2.3                      | 3.0 ± 0.52                       | 26.4 ± 2.2                     | 100 ± 5.6                      |
| Группа 5 (ГПП+NaCl-30) | 27 ± 0.9##                       | 65 ± 0.9##                     | 160 ± 7.5                        | 2.06 ± 0.12##                    | 25.1 ± 1.0##                   | 87 ± 5.8                       |
| Группа 6 (ГПП+ХТЗ-30)  | 18.6 ± 0.05#<br>$p_{5-6} < 0.01$ | 107 ± 0.05<br>$p_{5-6} < 0.01$ | 167 ± 5.9                        | 3.60 ± 0.12#<br>$p_{5-6} < 0.01$ | 22.2 ± 1.8                     | 119 ± 6.5#<br>$p_{5-6} < 0.05$ |

Примечание: \*\* —  $p < 0.01$ , \* —  $p < 0.05$  — статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб Контроля 3 (группа 1, инкубация 5 мин); ## —  $p < 0.01$ , # —  $p < 0.05$  — статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб Контроля 4 (группа 4, инкубация 30 мин);  $p_{2-3}$  — значимость различий между группами 2 и 3;  $p_{5-6}$  — значимость различий между группами 5 и 6. По каждому параметру выполнено не менее трех повторов.

ГПП+NaCl-30 и ГПП+ХТЗ-30 показывает, что добавление ХТЗ к ГПП способствует усилению свертывающего потенциала крови: ФДПА и ТВ снижены на 23 и 12%, а степень ПФ, концентрация фибриногена и АТ достоверно увеличены на 64, 75 и 36% относительно соответствующих показателей в группе ГПП+NaCl-30 (табл. 2).

Итак, при добавлении ХТЗ к ГПП отмечается выраженная активация свертываемости крови, о чем свидетельствуют повышенные значения концентрации фибриногена, степени полимеризации фибрина и агрегации тромбоцитов при одновременном снижении тромбинового времени и фибриндеполимеризационной активности крови. При удлинении времени инкубации гипокоагуляционной плазмы с ХТЗ наблюдаются более выраженные эффекты этого препарата, а именно: еще более значительное повышение концентрации фибриногена, агрегации тромбоцитов, степени полимеризации фибрина и снижение неферментативного фибринолиза.

Таким образом, в настоящей работе проведено комплексное исследование изменения показателей системы гемостаза в условиях *in vitro* при разном времени инкубации ХТЗ как с нормальной, так и с гипокоагуляционной плазмой крыс. Для этого использованы нормальные здоровые

животные и создана модель гипокоагуляции, в которой снижение свертывания крови обусловлено пероральным введением антиагреганта АСК.

Как известно, на начальном этапе свертывания крови и, соответственно, остановки кровотечения немаловажную роль играют тромбоциты, запуская процессы как сосудисто-тромбоцитарного (первичного), так и плазменного (вторичного) гемостаза. Как утверждают многие исследователи, в месте повреждения сосуда в первую очередь активируются тромбоциты, которые благодаря наличию на их мембране специализированных рецепторов вырабатывают биологически активные вещества, которые принимают участие в процессе их агрегации (Кузник, 2010). В клинической практике для снижения агрегации тромбоцитов применяется достаточно большое количество препаратов, в том числе АСК — антиагрегант с хорошо изученным механизмом действия (Murphy et al., 2021), который использован в нашем исследовании для создания гипокоагуляционного эффекта. Аспирин широко применяется в первичной профилактике сердечно-сосудистых заболеваний, однако его использование может сопровождаться кровотечениями (Zheng, Roddick, 2019).

В наших экспериментах через 20 мин после однократного перорального введения АСК наблюдалось уменьшение свертывания крови: в плазме крыс установлено снижение АТ, степени ПФ и концентрации фибриногена, а также увеличение ФДПА и ТВ. Полученные результаты согласуются с данными других авторов, которые утверждают, что аспирин может влиять на ацетилирование фибриногена, увеличивая проницаемость и стимулируя лизис сгустка, уменьшать образование тромбина и воздействовать на выработку фибрина (Undas et al., 2007). В дальнейшем добавление ХТЗ к ГПП, полученной после введения животным аспирина, приводит к усилению АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, к повышению степени полимеризации фибрина и концентрации фибриногена, а также к снижению фибриндеполимеризационной (неферментативной) фибринолитической активности и тромбинового времени. Ранее нами проведено исследование по определению дозозависимости эффектов ХТЗ в экспериментах *in vitro*, в котором показано, что прокоагулянтная активность ХТЗ возрастает при увеличении его концентрации; также выявлены минимальная и оптимальная концентрации, обладающие заметным эффектом на свертывание крови (Шубина и др., 2022). В настоящей работе выбор концентрации исследуемого биополимера обусловлен одновременно возможностью проявления ХТЗ выраженного прокоагулянтного действия и отсутствием вероятности образования геля при соприкосновении с плазмой крови (Lee et al., 2024).

ХТЗ, являющийся природным линейным полисахаридом, проявляет в кислых средах поликатионные свойства, обладает антибактериальной, антиоксидантной, иммуномодулирующей активностью, а также используется при создании лекарственных форм с ранозаживляющими и кровоостанавливающими свойствами (Wang et al., 2020).

Один из механизмов гемостатического действия ХТЗ связан с адгезией, активацией и агрегацией тромбоцитов, концентрация которых повышается в месте повреждения сосудистой стенки в результате сорбции плазмы, что может быть обусловлено поверхностными свойствами молекулы полимера. Сорбция плазмы приводит также к увеличению количества эритроцитов и к их коагуляции в поврежденном месте. Результат этих процессов — формирование сетевой структуры псевдотромба из полимерных цепей ХТЗ и клеток крови (Забивалова, Юдин, 2021). Вероятно, механизм действия ХТЗ может быть связан также с мобилизацией ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и их способностью индуцировать повышенную экспрес-

сию комплекса гликопротеина Пб/Ша и пуриnergического рецептора  $\text{P2Y}_{12}$  на поверхности мембран тромбоцитов, что ускоряет агрегацию тромбоцитов (Chou et al., 2003; Periyah et al., 2014). Кроме того, ХТЗ усиливает высвобождение тромбоцитами тромбоцитарного фактора роста и трансформирующего фактора роста  $\beta_1$ . Возможный механизм прямой активации тромбоцитов связан с активацией тромбоцитарного Toll-подобного рецептора 2 (Lee et al., 2024). В работах других авторов сообщается о способности ХТЗ изменять проницаемость плазматической мембраны клеток (Киселевский и др., 2021).

В настоящей работе установлено, что добавление ХТЗ к пулу НП приводит к усилению ее прокоагулянтной активности, но длительность инкубации не оказывает значительного влияния на выраженность этого эффекта. Однако при добавлении ХТЗ к пулу ГПП увеличение времени инкубации до 30 мин вызывает более выраженные коагуляционные эффекты ХТЗ, а именно: повышение концентрации фибриногена, АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов, степени полимеризации фибрина и снижение неферментативного фибринолиза. Итак, увеличение времени инкубации плазмы с ХТЗ приводит к более выраженному проявлению его прокоагулянтного действия за счет большего усиления активности свертывающих факторов крови. Необходимо также отметить, что независимо от времени инкубации ХТЗ с ГПП большинство исследуемых показателей гемостаза приближаются к контрольным (нормальным) значениям. Превышение некоторыми параметрами (концентрация фибриногена и АТ) нормальных значений не является критичным и в данных условиях (коррекция гипокоагуляции) может рассматриваться как положительный эффект.

Имеются данные, что дополнительным механизмом прокоагулянтного действия ХТЗ является контактное воздействие этого биополимера не только на клетки крови, но и на плазменные белки (Забивалова, Юдин, 2021). Некоторые авторы сообщают, что ХТЗ образует комплексы с фибриногеном и фибрином за счет электростатического взаимодействия (Zhang et al., 2013). В результате этого изменяются структура и конформация фибриногена, что приводит к усилению взаимодействия данного фактора свертывания с тромбоцитами и повышению их агрегационной активности (Rodriguez-Merchan, 2012). Результаты наших исследований позволяют предположить, что взаимодействие ХТЗ с плазменными белками влияет на конечный этап свертывания крови, а также на процес-

сы образования и лизиса фибриновых сгустков. Нами установлено усиление полимеризации фибрина за счет повышения активности фибринстабилизирующего фактора свертывания крови XIIIa, что, как мы полагаем, обусловлено усилением активности ключевого фермента каскада свертывания — тромбина. Это согласуется с данными других авторов (Aktop et al., 2014), показавших, что у людей с гипокоагуляцией при применении содержащего ХТЗ препарата происходит активация факторов внешнего пути свертывания крови вследствие повышения активности тканевого фактора.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании полученных данных установлено, что в условиях *in vitro* инкубация хитозана с пулом нормальной плазмы приводит к повышению ее свертывающей способности. При этом длительность инкубации не оказывает существенного влияния на степень проявления прокоагулянтного действия хитозана. При инкубации биополимера с гипокоагуляционной плазмой, полученной после перорального введения крысам ацетилсалициловой кислоты, также наблюдается значительное усиление свертывающего потенциала крови, причем увеличение времени инкубации способствует более выраженному эффекту хитозана. Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют, что препарат хитозана способен блокировать процессы деполимеризации фибрина, повышая уровень фибриногена и степень полимеризации фибрина. Кроме того, биополимер влияет на первичный гемостаз, повышая агрегацию тромбоцитов, что приводит к блокаде явлений кровоточивости, вызываемой ацетилсалициловой кислотой. Следовательно, хитозан можно отнести к эффективным средствам, повышающим или восстанавливающим нормальную свертываемость крови при геморрагических и гипокоагуляционных состояниях.

Новые знания о гемостатических средствах, в том числе препаратах хитозана и средств на его основе, и понимание механизмов нормализации гемостаза в условиях пониженной свертываемости крови могут способствовать появлению новых безопасных и эффективных гемостатиков в арсенале клиницистов.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Никаких

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

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Забивалова Н.М., Юдин А.Б. Основные механизмы гемостатического действия хитозана // Прикладные вопросы военной медицины / Мат. Всерос. науч.-практ. конф. (Санкт-Петербург, 22–23 сентября 2021 г.). СПб.: ГНИИИВМ, 2021. С. 226–232.
- Киселевский Д.Б., Шагдарова Б.Ц., Варламов В.П. и др. Действие низкомолекулярного хитозана на клетки эпидермиса из листьев гороха // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2021. Т. 76 (1). С. 18–23.
- Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Чита: Экспресс-издательство, 2010. 832 с.
- Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Исследование гемостатических свойств препарата на основе хитозана // Биофарм. журн. 2022а. Т. 14 (1). С. 3–7.
- Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Шубина Т.А. Влияние хитозана на свертывание крови гепаринизированных крыс // Изв. РАН. Сер. биол. 2022б. № 6. С. 636–641.
- Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Шубина Т.А., Оберган Т.Ю. Основы физиологии и биохимии свертывания крови. М.: МГУ, 2023. 159 с.
- Шубина Т.А., Оберган Т.Ю., Ляпина Л.А., Григорьева М.Е. Влияние полисахарида хитозана на плазменный гемостаз: исследование *in vitro* // Тромбоз, гемостаз и реология. 2022. № 4. С. 30–34.
- Aktop S., Emekli-Alturfan E., Ozer C. et al. Effects of ankaferd blood stopper and celox on the tissue factor activities of warfarin-treated rats // Clin. Appl. Thromb. Hemost. 2014. V. 20 (1). P. 16–21.
- Capodanno D., Angiolillo D. Aspirin for primary cardiovascular risk prevention and beyond in diabetes mellitus // Circulation. 2016. V. 134 (20). P. 1579–1594.
- Cassano R., Di Gioia M.L., Mellace S. et al. Hemostatic gauze based on chitosan and hydroquinone: preparation, characterization and blood coagulation evaluation // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2017. V. 28 (12). P. 190–199.
- Gheorghijă D., Moldovan H., Robu A. et al. Chitosan-based biomaterials for hemostatic applications: a review of

- recent advances // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24 (13). P. 10540.
- Chou T.-C., Fu E., Wu C.-J., Yen J.-H.* Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 302 (3). P. 480–483.
- Lee V.K., Lee T., Ghosh A. et al.* An architecturally rational hemostat for rapid stopping of massive bleeding on anticoagulation therapy // *PNAS USA*. 2024. V. 121 (5). P. e2316170121.
- Lichtenberger L.M., Vijayan K.V.* Are platelets the primary target of aspirin's remarkable anticancer activity? // *Cancer Res.* 2019. V. 79 (15). P. 3820–3823.
- Malik A., Rehman F.U., Shah K.U. et al.* Hemostatic strategies for uncontrolled bleeding: a comprehensive update // *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2021. V. 109. P. 1465–1477.
- Murphy E., Curneen J.M.G., McEvoy J.W.* Aspirin in the modern era of cardiovascular disease prevention // *Methodist Debakey Cardiovasc. J.* 2021. V. 17 (4). P. 36–47.
- Neveleff D.J., Kraiss L.W., Schulman C.S.* Implementing methods to improve perioperative hemostasis in the surgical and trauma setting // *AORN J.* 2010. V. 92 (5). P. S1–S15.
- Periyah M.H., Halim A.S., Yaacob N.S. et al.* Glycoprotein IIb/IIIa and P2Y12 induction by oligochitosan accelerates platelet aggregation // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 653149.
- Pereira B.M., Bortoto J.B., Fraga G.P.* Topical hemostatic agents in surgery: review and prospects // *Rev. Col. Bras. Cir.* 2018. V. 45 (5). P. e1900.
- Rodriguez-Merchan E.C.* Local fibrin glue and chitosan-based dressings in haemophilia surgery // *Blood Coagul. Fibrinol.* 2012. V. 23 (6). P. 473–476.
- Sheppard O.O., Foje N.A.* Topical coagulant agents // *Surg. Clin. North Am.* 2022. V. 102 (1). P. 65–83.
- Undas A., Brummel-Ziedins K., Mann K.* Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions // *Blood.* 2007. V. 107. P. 2285–2292.
- Wang W., Xue C., Mao X.* Chitosan: structural modification, biological activity and application // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 164. P. 4532–4546.
- Zhang W., Zhong D., Liu Q. et al.* Effect of chitosan and carboxymethyl chitosan on fibrinogen structure and blood coagulation // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2013. V. 24 (13). P. 1549–1563.
- Zheng S.L., Roddick A.J.* Association of aspirin use for primary prevention with cardiovascular events and bleeding events: a systematic review and meta-analysis // *JAMA.* 2019. V. 321 (3). P. 277–287.

## Restoration of Normal Blood Coagulation with Chitosan in the Simulation of Hypocoagulation with Aspirin

M. E. Grigorjeva<sup>a,\*</sup>, T. Y. Obergan<sup>a</sup>, L. A. Lyapina<sup>a</sup>, T. A. Shubina<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

\*e-mail: mgrigorjeva@mail.ru

The study of changes in blood clotting parameters under in vitro conditions with different incubation durations (5 min and 30 min) of chitosan with normal and with hypocoagulation plasma of rats was carried out. The addition of chitosan to the plasma of normal animals led to an increase in its procoagulant activity regardless of the duration of incubation. However, an increase in the incubation time to 30 min contributed to a more significant decrease in the fibrin-depolymerization activity of the blood. Incubation of chitosan with hypocoagulation plasma obtained after administration of acetylsalicylic acid (aspirin) to animals (once, orally at a dose of 2 mg / kg) for both 5 minutes and 30 minutes led to pronounced activation of blood clotting. Under these conditions, the lengthening of the incubation time caused more pronounced effects of this drug: a significant increase in the concentration of fibrinogen, ADP-dependent platelet aggregation, the degree of fibrin polymerization and a decrease in non-enzymatic fibrinolysis. At the same time, most of the studied hemostasis parameters approached values corresponding to the normal level. The results obtained in this work indicate the high effectiveness of chitosan as a means of restoring normal blood clotting, blocking the phenomena of bleeding in hypocoagulation conditions.

**Keywords:** acetylsalicylic acid, chitosan, fibrin stabilizing factor, fibrin polymerization, hemostasis system, hypocoagulation, platelet aggregation

УДК 636.934.55:591.51

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПОВЕДЕНИЯ ФЕРМЕРСКИХ СОБОЛЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

© 2024 г. Е. Г. Сергеев

Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского, Москва, Россия

e-mail: seg06@rambler.ru

Поступила в редакцию 15.05.2024 г.

После доработки 15.05.2024 г.

Принята к публикации 15.05.2024 г.

В статье представлен обзор научных публикаций по этологии фермерских соболей с 1970 по 2023 г. В исследованиях авторы использовали не идентичные методы тестирования и шкалы оценок для определения поведенческой реакции зверей разного возраста. В связи с этим предложена унификация результатов тестирования. В статье приведен поведенческий репертуар фермерских соболей, проявляющих различную реакцию на человека при проведении теста. На основании тестирования более 13 тысяч зверей сделано заключение об изменчивости поведенческой реакции соболей на видовом уровне. У большинства половозрелых соболей отмечена нейтральная (избегание контакта, трусливая) реакция на человека (от 40 до 60% в разных исследованиях). На втором месте по частоте случаев зафиксирована спокойная (исследовательская) реакция по отношению к человеку (от 26 до 49%). Относительно редко наблюдалась агрессивная (злобная) реакция на контакт (от 5 до 25%).

**Ключевые слова:** соболь, этология, поведенческий репертуар, тестирование, оборонительная реакция

DOI: 10.31857/S0042132424040088, EDN: PPBINR

### ВВЕДЕНИЕ

Термин “этология” взят из греческого языка: древнегреческое слово ἦθος (этос) означает нравы, характер, привычка, обычай. Термин ввел в 1859 г. французский зоолог Изидор Жоффруа Сент-Илер (1805–1861). Позднее его стали употреблять для того, чтобы отделить специалистов по изучению животных в естественных условиях от сравнительных психологов и бихевиористов, работавших преимущественно аналитическими методами в лабораториях. Современная этология — междисциплинарная наука, она включает в себя физиологическую и эволюционную составляющие, наследие бихевиоризма.

Еще с середины XVII в. европейские натуралисты-естествоиспытатели изучали поведение животных. Французский ученый Жорж-Луи Бюффон (1707–1788) был одним из первых натуралистов, в трудах которого содержится подробное рассмотрение особенностей восприятия, эмоций и обучения животных. Становление этологии связывают, главным образом, с работами ее признанных основоположников: австрий-

ского зоолога Конрада Лоренца (1903–1989) и нидерландского зоолога Николаса Тинбергена (1907–1988), хотя они сами первоначально не называли себя этологами. Этологическое направление в изучении поведения развивалось в значительной степени как результат полемики с бихевиористами, объясняющими поведение как приобретенный индивидуальный опыт, отрицая значение врожденных факторов (Шовен, 2009).

Синтез разных областей науки: классической этологии, ставившей во главу угла непосредственное наблюдение за животными, и классической зоопсихологии, ищущей общие для всех видов законы поведения и научения, — стал фундаментом современной науки о поведении животных (Дьюсбери, 1981).

В 1911 г. Оскар Хейнрот определил этологию как изучение “языка и ритуалов” животных, объединенных им в понятие “система коммуникации”. Затем Джулиан Хаксли ввел понятие ритуализации, показав, что социальное поведение животных координируется с помощью сигналов,

символизирующих определенную форму поведения, которая должна последовать за данной демонстрацией. Иначе говоря, демонстрация побуждений и намерений животного превращается в знак, указывающий на возможности развития поведения обоих участников (Фридман, 2009).

В качестве самостоятельного научного направления, отличного от физиологических и психологических школ исследования поведения (зоопсихология, бихевиоризм и пр.), этология окончательно сформировалась в 1930-е гг. на базе полевой зоологии и эволюционной теории как наука о сравнительном описании поведения особи (Зорина и др., 2002).

В России основоположником научного изучения поведения животных следует назвать Карла Францовича Рулье (1814–1858), который считал необходимым изучать различные формы поведения, в том числе инстинкты, наравне с анатомией и физиологией животных. Конкретные источники происхождения различных инстинктов он видел в изменчивости и наследственности (Тинберген, 1993).

Наблюдать за животными в клетках и вольерах значительно проще, чем в природе. Однако сам факт помещения животного в ограниченное небольшое пространство и постоянное влияние комплекса условий окружающей среды существенно сокращает количество демонстрируемых элементов поведения, характерных для данного вида (Попов, Ильченко, 1990).

Разведение зверей в клетках (в очень ограниченном пространстве), когда животное часто и не по своей воле контактирует с человеком, находится практически на расстоянии вытянутой руки от него, ведет к естественному отбору на стрессоустойчивость. Это является причиной возрастания на фермах числа адаптированных к таким условиям особей, у которых происходит в ряду поколений перестройка типа высшей нервной деятельности. Вследствие этого в зверохозяйствах постоянно растет доля животных с положительной реакцией на человека (Трапезов, 2007).

В 1990-е гг. в обществе большое внимания стали уделять безопасности и комфорту содержания животных, в том числе и пушных зверей. В связи с этим в ряде европейских стран были проведены работы по созданию систем оценки состояния животных, содержащихся на фермах. Одним из показателей благополучия был признан антропогенный фактор, критерием которого стала поведенческая реакция зверей на человека. Для этого был использован тест “на палочку”: в выгул через сетку просовывают

деревянную палочку и по реакции зверя определяют его поведение. Оценка проходит по трем градациям: реакция избегания, исследовательская реакция и агрессивная реакция (Сергеев, 2022а).

В 2006 г. сотрудники ВНИИ охотничьего хозяйства и звероводства им. проф. Б.М. Житкова подготовили “Методику оценки поведения клеточных пушных зверей”, в которую вошли методики “Регистрация и анализ элементов поведения” и “Тестирование зверей по поведению”.

В основу первой методики положены результаты круглосуточных (с 15-минутными интервалами) видеонаблюдений за зверями, находящимися в обычных клетках и в клетках с улучшенным комфортом (укрытия, полочки для отдыха, игрушки и т.д.). По итогам наблюдений было зарегистрировано 170 элементов поведения, из которых максимально часто отмечались 35.

Во второй методике предусмотрено тестирование зверей “на руку”: через открытую дверь в клетку просовывают руку в специальной рукавице и фиксируют реакцию зверя. По результатам тестирования у животного отмечают трусливое, спокойное или агрессивное поведение. Каждую форму поведения оценивают по разработанной шкале: спокойные — от +1 до +5 баллов, агрессивные — от –1 до –4 баллов, трусливые — 0 баллов (Плотников и др., 2006).

В 2010 г. опубликована работа, в которой предложен еще один метод оценки поведения пушных зверей, получивший название “эмпатичный тест”. При его разработке за основу была взята методика, предложенная Л. Гацеком и Б. Барабашем (Гацек, Барабаш, 2000). Суть теста — наблюдение за ответной реакцией зверя на просунутый через ячейку сетки выгула эластичный прут с привязанным на конце бантиком. В клетке прут медленно вращают, удерживая его на расстоянии около 30 см от животного в течение 15–20 с. Ответная реакция животного оценивается по одному из четырех типов поведения: агрессивный, спокойный, трусливый и нервный (Плотников и др., 2010).

При изучении этологии наиболее распространенных видов диких и сельскохозяйственных животных проведено множество научных исследований. Гораздо меньше работ посвящено поведению клеточных пушных зверей, а по такому виду как соболь существуют всего несколько десятков работ. Одно из направлений этологических исследований этого вида — определение типа поведения соболей и присущих ему видоспецифичных элементов.

В одной из первых работ по этологии соболя приведены результаты наблюдений за фор-

мированием оборонительного поведения щенков с рождения до пяти месяцев (Терновская, Беляев, 1972). Слепые новорожденные щенки не реагируют на человека. В месячном возрасте, когда начинают открываться глаза, у некоторых щенков проявляется пассивно-оборонительная реакция. До 40 дней большинство щенков не боятся человека. К 50-ти дням у всех щенков наблюдается пассивно-оборонительное поведение. Активно-оборонительная реакция появляется постепенно и значительно позднее. Ее усиление совпадает с полной заменой у соболей молочных зубов на постоянные — в 4.5 месяца (Терновская, 1974).

### РАЗЛИЧНЫЕ МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ ПОВЕДЕНИЯ СОБОЛЕЙ

Для изучения типа поведения соболей в первую очередь необходимо проведение тестирования в целях определения реакции зверя на человека. В первых работах на соболях исследователи применяли модифицированную методику Л.В. Крушинского, разработанную для собак. Регистрировали трехкратную (с интервалом в 3 дня) реакцию животного на приближение человека к клетке и на движение руки вдоль клетки во время утреннего и вечернего кормления. Авторы (Терновская, 1970, 1974; Беляев, Терновская, 1973) считают, что в это время у зверей проявляется “выравненная пищевая возбудимость”. По нашему мнению, воздействие этой возбудимости во время тестирования животного может исказить демонстрируемую реакцию на тест. Поэтому правильнее тестировать зверей через некоторое время после кормления.

По результатам исследований определены две формы поведения: пассивно- и активно-оборонительная. По проявленной реакции животных отнесли к одному из пяти типов:

**А** — агрессивные (злые) — звери бросаются навстречу человеку и стараются укусить руку через сетку клетки.

**П** — трусливые — звери возбужденно бегут по клетке, забиваются в дальний угол выгула, прячутся в домик; некоторые приближаются к человеку, но при движении руки, убегают; внутри этой категории выделяют особей с сильной, средней и слабой степенью реакции.

**О** — спокойные — соболи легко подходят к человеку, обнюхивают протянутую руку, не делая попытки укусить; некоторые интересуются человеком, следуя за движением его руки, некоторые быстро отходят, переключая внимание на что-либо другое.

**АП** — злобно-трусливые — соболи боялись подходить к человеку, но, когда приближались, проявляли признаки агрессивной реакции.

**Л** — лабильные — меняющие свое поведение при повторных тестированиях.

Исследовали 4000 соболей в зверохозяйствах “Пушкинский” и “Лесной”. Зверей разделили по возрасту на 5 групп: 1) сеголетки (молодняк текущего года рождения); 2) однолетние; 3) двухлетние; 4) 3–5 лет; 5) 6 лет и старше.

Распределение самок по типу поведения в “Пушкинском” и “Лесном” хозяйствах было примерно одинаковым и составляло, соответственно, агрессивных — 16 и 15%, трусливых — по 40%, спокойных — 32 и 30%, злобно-трусливых — по 8%, меняющих реакцию поведения — 4 и 7% (Терновская, 1984). В целом по двум хозяйствам среди фермерских соболей преобладают трусливые звери — 40%, спокойных — 32%, агрессивных — 16%, злобно-трусливых — 8%, меняющих поведение — 4% (Терновская, 1970; Беляев, Терновская, 1973).

В работе по изучению оборонительного поведения соболей (Терновская, 1970) вышеописанным методом было протестировано 1922 головы. Зверей по результатам теста разделили на две группы: с активной реакцией (184 головы) и с пассивной реакцией (149 голов). Учитывали степень выраженности реакции: слабая, средняя и сильная. Среди активных соболей со слабой реакцией было 3% зверей, со средней — 85% и с сильной — 12%. Среди пассивных соболей — 5, 91 и 4% соответственно.

Проведено тестирование (Павлюченко, Кудина, 1984) 628 самок соболей основного стада и 195 однолетних самок в осенне-зимний период и в период лактации. В осенне-зимний период оценивали оборонительную реакцию на человека и исследовательскую активность на выкладывание красного пластикового кубика (60×60×60 мм) на верх выгула. Взрослых самок тестировали дважды по 3 мин, молодых — 3 раза по 5 мин. Тестирование в период лактации проводили на 5–7 день после щенения у 314 соболей. В этом случае кубик помещали в выгул на 5 мин. Учитывали следующие элементы поведения: активное избегание, затаивание, агрессивность, волнение, задержка исследовательской реакции, исследовательская активность, игра, контактность. Степень реакции оценивали как слабую, среднюю и сильную. По полученным результатам выделено 4 типа поведения: трусливость, агрессивность, любопытство и контактность, оценивалась степень проявления каждого типа по 5-балльной шкале.

В осенне-зимний период не зависимо от возраста с учетом степени проявления всех элементов поведения в комплексе соболей дифференцировали на 7 групп, из которых три отнесли к основным: трусливые ( $26.7 \pm 1.8\%$ ), агрессивные ( $4.8 \pm 0.9\%$ ) и любопытные ( $26.9 \pm 1.8\%$ ), а три — к переходным: трусливо-агрессивные ( $1.3 \pm 0.5\%$ ), трусливо-любопытные ( $17.2 \pm 1.5\%$ ) и агрессивно-любопытные ( $9.6 \pm 1.1\%$ ). Седьмую группу составили звери, у которых не была отмечена какая-либо преобладающая форма активности ( $13.5 \pm 1.4\%$ ). Следовательно, среди протестированных самок наиболее многочисленными в этот период являются соболей, отнесенные к основным группам: любопытные (спокойные) и трусливые (не идущие на контакт).

В период лактации дифференцировали 4 типа поведения:

1) самка не отходит от щенков — сильный материнский инстинкт ( $36.0 \pm 2.7\%$ );

2) самка выходит из домика, обследует кубик и возвращается в домик до конца тестирования — уравновешенное поведение ( $27.4 \pm 2.5\%$ );

3) самка проявляет повышенный интерес к кубику, играет с ним, к щенкам не возвращается — исследовательское поведение ( $25.5 \pm 2.4\%$ );

4) самка сразу выходит из домика, бежит, волнуется, кубиком не интересуется, в домик не возвращается — волнение ( $11.1 \pm 1.8\%$ ).

Таким образом, из числа протестированных самок соболей преобладают звери с сильным материнским инстинктом, однако данные статистически не достоверны.

### ШКАЛА ОЦЕНКИ РЕАКЦИИ СОБОЛЕЙ, ПОВЕДЕНЧЕСКИЙ РЕПЕРТУАР

В исследованиях Сергеева (2003–2022 гг.) тестирование соболей на реакцию на человека проводили по методу, вошедшему в англоязычную литературу под названием *hand catch test* (Трапезов и др., 2008; Trapezov et al., 2012). Тестировали зверей в течение всего дня с перерывами на кормление. Метод заключается в следующем: экспериментатор, находясь напротив клетки, открывает дверцу, просовывает в выгул руку в толстой рукавице и в течение 1–1.5 мин наблюдает за реакцией зверя. В зависимости от ее проявления соболей относили к одной из трех категорий: нейтральные (избегающие пассивно или активно контакта), агрессивные (злые) и спокойные (дружелюбные).

Была разработана балльная шкала оценки реакции соболей на внешний раздражитель. Балл “0” получали нейтральные звери. Общим в поведении у таких зверей было одно: всеми

возможными способами находиться как можно дальше от внешнего раздражителя — руки человека (Сергеев, 2005).

Зверей, идущих на контакт (рис. 1), демонстрировавших спокойную (положительная реакция) форму контакта, оценивали по пяти баллам:

+1 — незавершенный контакт: звери осторожно (через 10–15 с после начала теста) подходят почти вплотную к рукавице, тянутся к ней мордочкой, интенсивно принюхиваются, но рукавицы не касаются;

+2 — настороженный контакт: животные сразу или через 20–30 с подходят к рукавице, обнюхивают ее 2–3 с и отходят в сторону;

+3 — спокойная реакция на человека: звери медленно подходят к рукавице, 10–15 с ее обнюхивают, позволяют до себя дотронуться;

+4 — активный контакт: сразу после предъявления рукавицы, звери подходят к ней, опираясь на нее передними лапами долго обнюхивают, допускают поглаживание;

+5 — очень плотный контакт: животные долго обнюхивают рукавицу, не отходят от нее, позволяют себя гладить, брать на руку.

Зверей, демонстрировавших агрессивную (отрицательная реакция) форму контакта, оценивали по четырем баллам:

–1 — выражение угрозы: при предъявлении рукавицы звери, не приближаясь к ней, кричат или шипят, делают угрожающие выпады в сторону рукавицы;

–2 — нанесение укусов: животные нападают на рукавицу, кусают ее и отбегают;

–3 — активное нападение: звери впиваются зубами в рукавицу, треплют и тянут ее на себя, издавая угрожающие звуки;

–4 — проявление злобности: при приближении оператора к клетке, звери сильно возбуждаются, бросаются на сетку, кусают ее и яростно рычат; запрыгивают на кормовой столик и, при открывании дверцы, атакуют рукавицу.

Следует принять во внимание обширный поведенческий репертуар соболей, проявляемый при проведении тестирования. Всех зверей можно разделить на четыре группы: нейтральные (“0”): активно (“0”А) или пассивно (“0”П) избегающие контакта, с положительной (“+”) или отрицательной (“–”) реакцией.

В группу нейтральных попадают животные с широким спектром поведения: они могли перемещаться по выгулу (активно или медленно), прятаться в домике, забиваться в дальний угол выгула или не обращать внимания на руку оператора.



Рис. 1. Проявление дружелюбного поведения соболя (Фото О.В. Трапезова).

Спокойных (дружелюбных, группа “+”) и агрессивных (злых, группа “–”) соболей условно можно отнести к категории идущих на контакт в той или иной форме.

У зверей, отнесенных к группе “0”П, отмечен следующий поведенческий репертуар:

1. Сидит в домике, не высовываясь.
2. Стоит на задних лапах, прижимаясь спиной к задней стенке выгула.
3. Висит на лапах в верхнем, дальнем углу выгула.
4. Игнорирует подставленную рукавицу, обходя ее при перемещении по выгулу или у входа в домик.
5. Стоя на месте, выгибает спину (горбится).
6. Лежит, прижавшись к полу выгула у задней стенки.

Звери, отнесенные к группе “0”А, демонстрировали следующие элементы поведения:

1. Медленно ходит вдоль задней стенки выгула.
2. Рыскает в обе стороны вдоль длинной или задней стенки выгула.

3. Бегаёт по выгулу по диагонали.

4. Бегаёт из домика к дальней стенке выгула и обратно в домик.

5. Бегаёт по выгулу зигзагами.

6. Скачет или бегаёт кругами вдоль задней стенки выгула.

7. Скачет или бегаёт посередине выгула в поперечной плоскости.

8. Скачет или бегаёт посередине выгула в продольной плоскости.

9. Подпрыгивает на месте.

10. Прыгает или бегаёт вдоль длинной стенки выгула.

11. Прыгает по выгулу, отталкиваясь от протянутой рукавицы.

12. Прыгает по выгулу с короткими (на 1–3 с) или с длительными (на 10–15 с) остановками.

13. Прыгает по выгулу, изменяя характер движения.

14. Прыгает по выгулу, постоянно повторяя один из элементов движения.

Звери, идущие на контакт (проявляющие исследовательскую активность), демонстрировали спокойную (положительная реакция “+”) или агрессивную (отрицательная реакция “–”) формы контакта.

У зверей, отнесенных к группе спокойных (группа “+”), отмечен следующий поведенческий репертуар:

1. На безопасном расстоянии, вытянувшись телом, тянется к рукавице, интенсивно нюхает воздух, делает несколько шагов к ней и снова отступает, так и не решаясь подойти вплотную.

2. Находясь в домике, высовывает голову из лаза, проявляет интерес к рукавице, но при ее приближении прячется в домик.

3. Находясь в домике, высовывает голову из лаза, проявляет интерес к рукавице, все больше высовываясь из домика, и при ее отдалении тянется за ней, обнюхивает рукавицу и отходит в домик.

4. На безопасном расстоянии, вытянувшись к рукавице, интенсивно нюхает воздух, постепенно приближается и, коснувшись рукавицы носом, отбегает.

5. Подходит к рукавице настороженно через 20–30 с после начала теста, 2–3 с обнюхивает ее и отбегает.

6. Подходит к рукавице не сразу, а через 10–15 с, обнюхивает рукавицу несколько секунд и медленно отходит в сторону.

7. При открывании дверцы клетки, сразу подходит к рукавице и обнюхивает ее короткое или продолжительное время.

8. При открывании дверцы клетки, сразу подходит к рукавице, встает на задние лапы, передними опирается на нее и обнюхивает рукавицу короткое или продолжительное время.

9. При приближении экспериментатора к клетке забирается на кормовую полочку у дверки, при предъявлении рукавицы сразу идет на контакт разный по длительности (от 2–3 до 10–15 с), бывает сильно возбужден.

10. Во время длительного контакта позволяет погладить себя.

Агрессивные звери (группа “–”) демонстрировали следующие элементы поведения:

1. Находясь в домике, при приближении рукавицы к лазу:

а) издает шипящие звуки, делает угрожающие выпады в сторону рукавицы, но не кусает ее;

б) издает шипящие звуки, наносит короткие укусы рукавице и отбегает;

в) вцепляется зубами в рукавицу и тянет ее к себе.

2. Находясь в выгуле на безопасном расстоянии, делает угрожающие выпады в сторону рукавицы.

3. При приближении экспериментатора к клетке прыгает на кормовую полочку у дверки, сильно возбужден; при открывании дверцы и предъявлении рукавицы сразу набрасывается на нее и кусает.

4. При приближении экспериментатора к клетке прыгает на сетку выгула, сильно возбужден; при приближении рукавицы к сетке старается укусить ее через сетку.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕСТИРОВАНИЯ ПОВЕДЕНЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ФЕРМЕРСКИХ СОБОЛЕЙ

Работу по изучению этологии соболей проводили в трех звероводческих хозяйствах Московской обл., организованных в разные годы, исходя из предположения, что различная продолжительность существования хозяйств (разное число поколений животных, длительность domestikации) могла повлиять на уровень адаптации соболей к месту содержания и на проявление их реакции на людей.

В 1929 г. первой была организована соболиная ферма в зверосовхозе “Пушкинский” (в н. в. зверохозяйство “Русский соболь”). В период исследований имелось 6230 самок основного стада, зверохозяйство функционировало 74 года. В 1948 г. была создана соболиная ферма в зверосовхозе “Салтыковский”, в период эксперимента хозяйству было 55 лет, насчитывалось 2925 самок основного стада. В зверохозяйство “Родники” соболи были привезены в 1990 г., в период наблюдений было 750 самок основного стада, хозяйство работало 13 лет. Эти звери являлись потомками соболей из популяции з/х “Пушкинский”.

На соболиных фермах трех зверохозяйств в 2005–2008 гг. в общей сложности было протестировано методом “на руку” без учета пола 8434 головы молодняка (в возрасте от 120 до 145 дней) и 6847 взрослых зверей (Сергеев, 2005, 2017, 2022б).

Результаты тестирования показали, что как щенки, так и взрослые соболи, не зависимо от популяции, в подавляющем большинстве случаев (61.3–84.8%) демонстрируют нейтральное поведение (Сергеев, 2005, 2017, 2022б). Какой-либо четкой зависимости поведенческой реакции от принадлежности зверей к конкретной популяции не отмечено: в одних хозяйствах она наблюдается, в других — нет. Так, в старейшем з/х “Пушкинский” и у молодняка, и у взрослых

зверей зафиксировано максимальное проявление нейтрального поведения (84.8 и 79.6% соответственно) и минимальное количество агрессивных соболей (1.5 и 7.8% соответственно).

Среди молодняка в з/х “Салтыковский”, по сравнению с другими популяциями, зафиксировано наибольшее количество агрессивных соболей (7.3%) и наименьшее число спокойных (8.5%). Однако среди взрослых зверей в этой же популяции отмечено минимальное количество нейтральных соболей (61.3%) и максимальное число спокойных зверей (26.0%).

Результаты оценки поведенческого типа соболей представлены в табл. 1.

В з/х “Родники” среди молодняка отмечено максимальное число спокойных соболей (21.4%), а среди взрослых зверей — максимальное количество агрессивных (14.5%). Анализ приведенных данных показал, что зависимость между временем существования соболиных ферм и уровнем проявления различных типов поведенческой реакции у соболей является маловероятной. На рис. 2 и 3 графически показано распределение по баллам шкалы оценки типа поведения щенков и взрослых соболей в трех популяциях.

Графическое изображение показывает сходство полученных результатов тестов в разных популяциях как у молодняка, так и у взрослых соболей. Исходя из большого объема

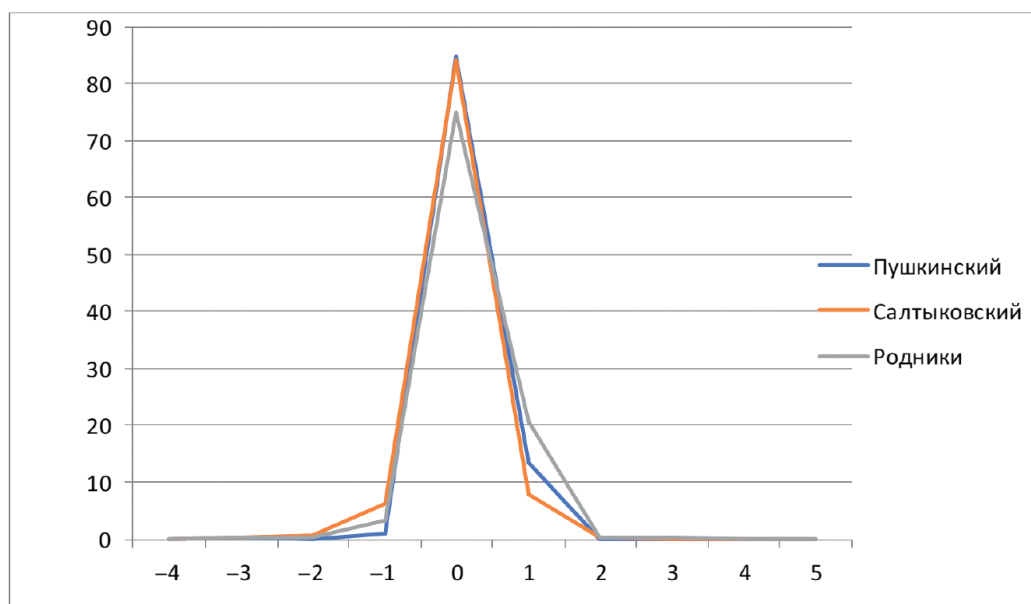
выборки, можно допустить, что представленные характеристики поведения являются видоспецифичными для соболя.

В 2019–2020 гг. в России проходила сертификация соболеводческих ферм в целях оценки благополучия содержания зверей. При этом оценивали: условия содержания (комфорт в клетках, кормление и поение), состояние пушных зверей (здоровье, поведение), гуманизация убоя. Для осуществления сертификации был разработан “Регламент проведения сертификации соболиных ферм” (Демина, Сергеев, 2022). Одним из пяти критериев этого “Регламента” была оценка поведения соболей с использованием теста “на палочку”. При этом тип поведения оценивали по 5-балльной шкале: 1 — агрессивная реакция, 2 — продолжительная (почти постоянная) вокализация, 3 — сильное возбуждение, страх, 4 — безразличное поведение, отсутствие реакции, 5 — исследовательская реакция. При сопоставлении данной шкалы с используемой оценкой тестирования “на руку” условно можно выделить три типа поведения соболей: агрессивные (1 балл), нейтральные (2–4 балла) и спокойные, с исследовательской реакцией (5 баллов). Тестирование проводили 3 раза в год (зима, лето, осень) на молодняке и взрослом поголовье. В каждом случае оценивали по 100 разных соболей. В ходе сертификации оценено 6 соболиных ферм в пяти регионах страны.

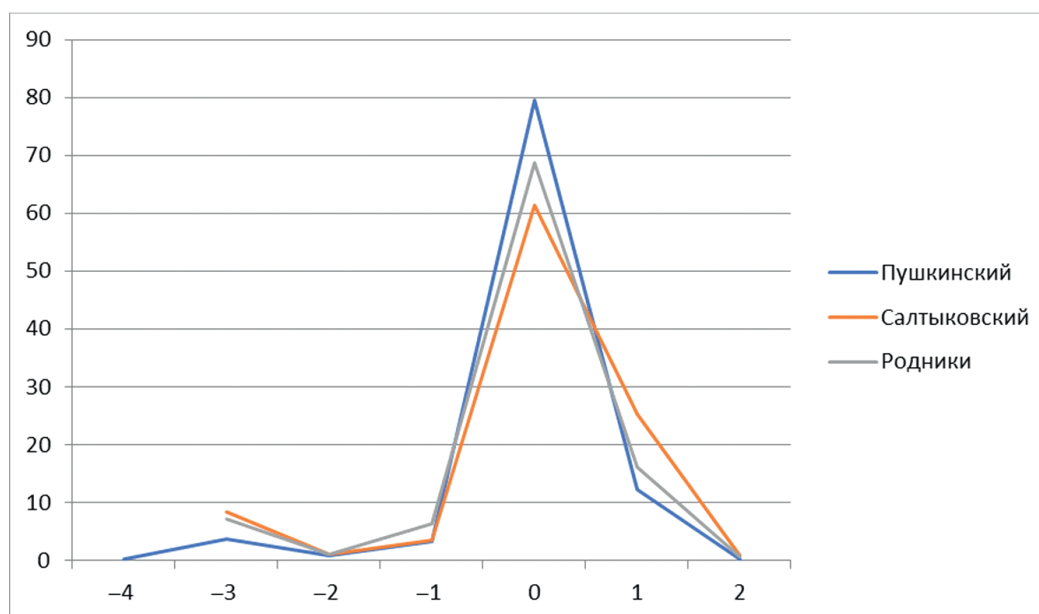
**Таблица 1.** Результаты тестирования соболей в различных хозяйствах

| Хозяйство            | Тип поведения                           |       |                      |       |                       |       | Всего<br>голов |
|----------------------|-----------------------------------------|-------|----------------------|-------|-----------------------|-------|----------------|
|                      | спокойный<br>("+" )                     |       | нейтральный<br>("0") |       | агрессивный<br>("—" ) |       |                |
|                      | голов                                   | %     | голов                | %     | голов                 | %     |                |
|                      | Щенки (120—145 дней) 2003 г.            |       |                      |       |                       |       |                |
| Пушкинский           | 199                                     | 13.7  | 1231                 | 84.8↑ | 22                    | 1.5↓  | 1452           |
| Салтыковский         | 477                                     | 8.5↓  | 4763                 | 84.2  | 413                   | 7.3↑  | 5653           |
| Родники              | 285                                     | 21.4↑ | 994                  | 74.8↓ | 50                    | 3.8   | 1329           |
| Всего по трем фермам | 961                                     | 11.4  | 6988                 | 82.8  | 485                   | 5.8   | 8434           |
|                      | Взрослые звери (старше 1.5 лет) 2004 г. |       |                      |       |                       |       |                |
| Пушкинский           | 203                                     | 12.6↓ | 1282                 | 79.6↑ | 126                   | 7.8↓  | 1611           |
| Салтыковский         | 1014                                    | 26.0↑ | 2389                 | 61.3↓ | 497                   | 12.7  | 3900           |
| Родники              | 225                                     | 16.8  | 917                  | 68.7  | 194                   | 14.5↑ | 1336           |
| Всего по трем фермам | 1398                                    | 26.2  | 4213                 | 61.5  | 68                    | 12.3  | 6847           |

Примечание: ↓ — минимальное значение, ↑ — максимальное значение.



**Рис. 2.** Распределение молодняков (%) по типу поведения на трех соболиных фермах (ось абсцисс: агрессивные от  $-4$  до  $-1$ , нейтральные от  $-1$  до  $1$ , спокойные от  $1$  до  $5$ ).



**Рис. 3.** Распределение взрослых зверей (%) по типу поведения на трех соболиных фермах (ось абсцисс: агрессивные от  $-4$  до  $-1$ , нейтральные от  $-1$  до  $1$ , спокойные от  $1$  до  $2$ ).

Отмечена (Сергеев и др., 2021) вариабельность проявления агрессивной реакции протестированных соболей в различные периоды сертификации. Так, в первый зимний период (февраль–март) число агрессивных зверей на пяти фермах было незначительным (1–5%) и только на одной

таких соболей было 25%. Во второй летний период (июнь–август) по выраженности индивидуального типа поведения только у 1–12% зверей (по разным фермам) проявлялась негативная реакция на человека. В третий осенний период (октябрь–ноябрь) численность животных

с негативной реакцией на человека находится в пределах 1–17%. Таким образом, количество агрессивных зверей (без учета возраста и пола) в шести популяциях в зависимости от сезона года колебалось в пределах 5–17%.

Примечательно также, что сходные результаты были получены при тестировании реакции “на руку” в ходе изучения антропогенного воздействия на формирование поведенческой реакции у молодых соболей фермерских популяций. Всего в ходе этого эксперимента протестировано 1010 самок и 837 самцов в 6-месячном возрасте (Сергеев, Бекетов, 2018).

### УНИФИКАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕСТИРОВАНИЯ СОБОЛЕЙ ПО РАЗНЫМ МЕТОДИКАМ

Полученные данные отличаются от опубликованных выше сведений о распределении со-

болей по проявлению поведенческих реакций. Эти различия объясняются разным методическим подходом к оценке того или иного типа поведения при формировании балльной шкалы. В данном случае при сертификации ферм в соответствии с международными требованиями использованы следующие оценки: 1) агрессивные; 2) нейтральные, избегающие контакта; 3) спокойные, с исследовательской реакцией. В других более ранних исследованиях оперировали следующими категориями: 1) нейтральные (как активно, так и пассивно); 2) агрессивные (злобные); 3) спокойные (дружелюбные). Полученные в вышеизложенных исследованиях результаты по проявлению поведенческих реакций взрослых соболей сведены в табл. 2.

Вследствие использования авторами исследований различных методов тестирования и подходов к дифференцированию полученных результатов возникают трудности при их со-

**Таблица 2.** Вариабельность распределения соболей старше 1.5 лет по типу поведения

| Источник                 | Авторские данные      |                           |      | Унифицированные данные |                           |      |
|--------------------------|-----------------------|---------------------------|------|------------------------|---------------------------|------|
|                          | категория             | количе-<br>ство<br>зверей | %    | категория              | количе-<br>ство<br>зверей | %    |
| Беляев, Терновская, 1973 | Агрессивные (злобные) | 4000                      | 16   | Агрессивные            | 3840                      | 25   |
|                          | Трусливые             |                           | 40   | Нейтральные            |                           | 42   |
|                          | Спокойные             |                           | 32   |                        |                           |      |
|                          | Злобно-трусливые      |                           | 8    | Дружелюбные            |                           | 33   |
|                          | Меняющие поведение    |                           | 4    |                        |                           |      |
| Терновская, 1974         | Активные: слабые      | 184                       | 3    | Агрессивные            | 333                       | 6.6  |
|                          | средние               |                           | 85   |                        |                           |      |
|                          | сильные               |                           | 12   | Нейтральные            |                           | 44.4 |
|                          | Пассивные: слабые     | 149                       | 5    |                        |                           |      |
|                          | средние               |                           | 91   | Дружелюбные            |                           | 49.0 |
|                          | сильные               |                           | 4    |                        |                           |      |
| Павлюченко, Кудина, 1984 | Трусливые             | 823                       | 26.7 | Агрессивные            | 712                       | 16.6 |
|                          | Агрессивные           |                           | 4.8  |                        |                           |      |
|                          | Любопытные            |                           | 26.9 |                        |                           |      |
|                          | Трусливо-агрессивные  |                           | 1.3  | Нейтральные            |                           | 52.4 |
|                          | Трусливо-любопытные   |                           | 17.2 |                        |                           |      |
|                          | Агрессивно-любопытные |                           | 9.6  | Дружелюбные            |                           | 31.0 |
|                          | Неопределенные        |                           | 13.5 |                        |                           |      |
| Сергеев, 2005            | Агрессивные           | 6847                      | 12.3 | Агрессивные            | 6847                      | 12.3 |
|                          | Нейтральные           |                           | 61.5 | Нейтральные            |                           | 61.5 |
|                          | Спокойные             |                           | 26.2 | Дружелюбные            |                           | 26.2 |

поставлении. Чтобы этого избежать, перечисленные в работах оценочные категории были приведены к единым показателям (в скобках приведены ссылки на первоисточник с упоминанием такой оценки).

К “агрессивным” отнести зверей со следующими характеристиками: злобные (Терновская, 1970, 1974; Беляев, Терновская, 1973), злобно-трусливые (Терновская, 1970, 1974; Беляев, Терновская, 1973), активные (Терновская, 1974), агрессивно-любопытные (Павлюченко, Кудина, 1984).

К “дружелюбным” — соболей, проявляющих спокойное поведение (Терновская, 1970, 1974; Беляев, Терновская, 1973), любопытных (Павлюченко, Кудина, 1984).

К “нейтральным” — животных, оцененных как трусливые (Терновская, 1970, 1974; Беляев, Терновская, 1973; Павлюченко, Кудина, 1984), пассивные (Терновская, 1974), трусливо-любопытные и трусливо-агрессивные (Павлюченко, Кудина, 1984). Соболей с лабильным и неопределяемым типом поведения не учитывали. Результаты такой коррекции представлены в табл. 2.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, принимая во внимание суммарную численность протестированного поголовья (старше 1.5 лет) у различных исследователей (более 13 тыс. голов), можно говорить об изменчивости поведенческих реакций соболей на видовом уровне. У большинства половозрелых соболей отмечена нейтральная (избегание контакта, трусливая) реакция на человека — в среднем 50.1% (от 40 до 60% в разных исследованиях). На втором месте по частоте случаев зафиксирована спокойная (исследовательская) реакция по отношению к человеку 34.8% (от 26 до 49%). Относительно редко наблюдалась агрессивная (злобная) реакция на контакт — 15.1% (от 5 до 25%).

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Московского государственного университета технологий и управления им. К.Г. Разумовского. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор информирует об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беляев Д.К., Терновская Ю.Г. Поведение и воспроизводительная функция животных. Сообщение 4: Корреляция оборонительного поведения соболей с их воспроизводительной способностью // Генетика. 1973. Т. 9 (3). С. 53–62.
- Гацек Л., Барабаш Б. Новый тест для голубых песцов // Кроликовод. зверовод. 2000. Т. 4. С. 10.
- Демина Т.М., Сергеев Е.Г. Регламент проведения сертификации соболиных ферм. М.: 2022. 34 с. (рукопись)
- Дьюсбери Д. Поведение животных. Сравнительные аспекты. М.: Мир, 1981. 480 с.
- Зорина З.А., Полетаева И.И., Резникова Ж.И. Основы этологии и генетики поведения. М.: МГУ, 2002. 383 с.
- Павлюченко С.В., Кудина Н.И. Зависимость воспроизводительной способности самок соболей от характера их поведенческих реакций в осенне-зимний сезон и период лактации // Тр. НИИПЗК. 1984. Т. 31. С. 135–141.
- Плотников И.А., Евенко О.Е., Беспярых О.Ю. Методика оценки поведения клеточных пушных зверей. Киров: ВНИИОЗ, 2006. 23 с.
- Плотников И.А., Газизов В.З., Беспярых О.Ю., Евенко О.Е. Этологические исследования в пушном звероводстве. Киров: ВГСХА, 2010. 30 с.
- Попов С.В., Ильченко О.Г. Методические рекомендации по этологическим наблюдениям за млекопитающими в неволе. М.: Московский зоопарк, 1990. 76 с.
- Сергеев Е.Г. Изменчивость реакции молодых соболей клеточного содержания на внешний раздражитель // Поведение и поведенческая экология млекопитающих / Мат. науч. конф. (Черноголовка, 4–5 октября 2005 г.). М.: КМК, 2005. С. 50–52.
- Сергеев Е.Г. Влияние некоторых факторов на формирование поведенческих реакций молодых соболей фермерских популяций // Поведение и поведенческая экология млекопитающих / Мат. III науч. конф. (Черноголовка, 14–18 апреля 2014 г.). М.: КМК, 2014. С. 115.
- Сергеев Е.Г. Изменчивость поведенческих реакций у молодняка соболей клеточного содержания // Кроликовод. зверовод. 2017. № 3. С. 82–85.
- Сергеев Е.Г. Формирование международных требований к оценке благополучия пушных зверей на фермах в Европе // Дельта науки. 2022а. № 1. С. 50–54.
- Сергеев Е.Г. Наследование типа поведения у фермерских соболей // Генет. развед. животн. 2022б. № 2. С. 13–26.
- Сергеев Е.Г., Бекетов С.В. Влияние антропогенного фактора на поведенческие реакции молодняка соболей

- фермерских популяций // Пробл. биол. продукт. животн. 2018. № 3. С. 87–95.
- Сергеев Е.Г., Демина Т.М., Куликов В.Н. Итоги сертификации соболиных ферм // Кроликовод. зверовод. 2021. № 4. С. 14–19.
- Терновская Ю.Г. О популяционном полиморфизме оборонительного поведения // Популяционная структура вида у млекопитающих / Мат. совещ. (Москва, 25–27 декабря 1970 г.). М.: 1970. С. 151–152.
- Терновская Ю.Г. Онтогенез оборонительного поведения кунцеобразных в условиях эксперимента // Экологические и эволюционные аспекты поведения животных / Ред. Б.П. Мантейфель. М.: Наука, 1974. С. 109–119.
- Терновская Ю.Г. Роль оборонительного поведения в размножении хищников из семейства Mustelidae // Автор. дис... канд. биол. наук. Новосибирск: БИ СО АН СССР, 1984. 20 с.
- Терновская Ю.Г., Беляев Д.К. Онтогенез оборонительного поведения некоторых хищников // Реф. докл. 1 Всесоюз. совещ. “Экологические и эволюционные аспекты поведения животных”. М.: Наука, 1972. С. 236–237.
- Тинберген Н. Поведение животных. М.: Мир, 1993. 34 с.
- Трапезов О.В. Поведенческий полиморфизм при содержании в неволе разных видов кунных // Мат. IV Всерос. конф. по поведению животных (Москва, 29 октября–1 ноября 2007 г.). М.: КМК, 2007. С. 569–570.
- Трапезов О.В., Трапезова Л.И., Сергеев Е.Г. Влияние мутаций, затрагивающих окраску меха, на поведенческий полиморфизм в промышленных популяциях американской норки (*Mustela vison* Schreber, 1777) и соболя (*Martes zibellina* Linnaeus, 1758) // Генетика. 2008. Т. 44 (4). С. 516–523.
- Фридман В.С. Коммуникация животных: от стимула к символу // Химия и жизнь. 2009. № 10. С. 12–18.
- Шовен Р. Поведение животных. М.: Мир, 2009. 487 с.
- Trapezov O.V., Trapezova L.I., Sergeev E.G. Coat color mutations and defensive reaction towards man in farm-bred minks and sables // Proc. X<sup>th</sup> Int. Sci. Congr. in fur animal production (Kopenhagen, August 21–24, 2012). Kopenhagen: Wageningen Acad. Publ., 2012. P. 396–403.

## The Variability of the Behavior of Farm Sables of Different Ages

E. G. Sergeev

*Razumovsky Moscow State University of Technologies and Management,  
Moscow, Russia*

*e-mail: seg06@rambler.ru*

The article presents a review of scientific publications on the ethology of farm sables from 1970 to 2023. In the studies, the authors used different testing methods and rating scales to determine the behavioral response of animals of different ages. In this regard, the unification of the test results is proposed. The article presents the behavioral repertoire of farm sables that exhibit different reactions to humans during the test. Based on testing of more than 13 thousand animals, a conclusion was made about the variability of the behavioral response of sables at the species level. Most mature sables have a neutral (avoiding contact, cowardly) reaction to humans (from 40 to 60% in different studies). In the second place in terms of the frequency of cases, a calm (exploratory) reaction towards a person was recorded (from 26 to 49%). An aggressive (malicious) reaction to contact was relatively rare (from 5 to 25%).

**Keywords:** sable, ethology, behavioral repertoire, testing, defensive reaction

УДК 615:210.15+575:599.323.591

## ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО МИМЕТИКА NGF ДИПЕПТИДА ГК-2 НА ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ АУТБРЕДНЫХ ЛИНИЙ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ВЕСУ МОЗГА

© 2024 г. О. В. Перепелкина<sup>1</sup>, И. И. Полетаева<sup>1, \*</sup>, П. Ю. Поварнина<sup>2</sup>, Т. А. Гудашева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, Москва, Россия

\*e-mail: ingapoletaeva@mail.ru

Поступила в редакцию 16.03.2024 г.

После доработки 28.04.2024 г.

Принята к публикации 1.05.2024 г.

Проведен анализ ноотропных эффектов димерного дипептидного миметика фактора роста нервов — соединения ГК-2 — в когнитивном тесте у мышей двух линий, селективированных на большой и малый относительный вес мозга. Влияние введения ГК-2 на решение когнитивного теста не одинаково у мышей разных генотипов, но малый размер групп не позволяет выявить значимые отличия от контроля, лишь дает возможность констатировать наличие ряда тенденций. В тесте на неофагофобию введение дипептида вызвало у всех мышей более активную реакцию на новую пищу. Показаны также возрастные различия в решении данного теста как в контроле, так и после дипептида. Продемонстрированные генотип-зависимые изменения поведения мышей после введения ГК-2 — результат, важный для более полной характеристики его фармакологических эффектов как потенциального лекарственного препарата.

**Ключевые слова:** фактор роста нервов, дипептидный миметик, когнитивные способности, неофагофобия, генотип, вес мозга, мыши

DOI: 10.31857/S0042132424040095, EDN: PPAEIX

### ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные препараты пептидной природы становятся все более популярными, в частности в невропатологии. Преимущества пептидных препаратов перед непептидными — их высокая активность, отсутствие токсичности, определяемое метаболизмом до эндогенных аминокислот, отсутствие грубых побочных эффектов благодаря регуляторному механизму действия и т.п. Дипептидные препараты, в свою очередь, во многих случаях оказываются более эффективными, по сравнению с олигопептидными, поскольку обладают повышенной энзиматической стабильностью и способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, что дает возможность их перорального применения (Gudasheva et al., 2018).

Фактор роста нервов NGF (nerve growth factor) — член семейства нейротрофинов, эндогенных белков, которые поддерживают жизнеспособность нейронов, регулируют синапти-

ческую пластичность, нейро- и синаптогенез. Аномалии экспрессии NGF отмечены при ряде нейродегенеративных и психических заболеваний, стрессе и возрастных изменениях (Aloe et al., 2001; Terry et al., 2011; Ciafrè et al., 2020). Клиническое применение полноразмерного NGF ограничено его слабой способностью проникать через биологические барьеры, быстрой биodeградацией и нежелательными побочными эффектами, основные из которых — гиперальгезия и потеря веса (Rocco et al., 2018).

В Федеральном исследовательском центре оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий с использованием оригинального подхода (Гудашева и др., 2010), базирующегося на предположении, что основными фармакофорами при взаимодействии с Trk-рецепторами являются наиболее экспонированные дипептидные фрагменты  $\beta$ -изгибов шпилькообразных петель нейротрофинов, получен димерный дипептид-

ный миметик 4-й петли NGF — соединение ГК-2 — гексаметилендиамид бис-(моносукцинил-L-глутамил-L-лизина) (Середенин, Гудашева, 2011; Seredenin, Gudasheva, 2016, 2018, 2019). В экспериментах *in vitro* ГК-2, как и полноразмерный NGF, проявляет нейротрофическую активность на культуре мышечных гиппокампальных нейронов линии HT-22 и культуре клеток феохромоцитомы крысы линии PC-12 в концентрациях  $10^{-9}$ – $10^{-5}$  М (модели окислительного стресса, глутаматной и МФТП-индуцированной токсичности) (Антипова и др., 2010). С помощью вестерн-блот анализа *in vitro* установлено с использованием клеток линии HT-22, что ГК-2 активирует специфические для полноразмерного NGF тирозинкиназные TrkA-рецепторы и их PI3K/Akt и PLC- $\gamma$  пострецепторные пути трансдукции сигнала (Gudasheva et al., 2015). Селективность взаимодействия ГК-2 с TrkA-рецепторами подтверждена с помощью анализа клеток гиппокампа мыши линии HT-22, нокаутных по генам *trka* и *trkb* (Антипова и др., 2022).

В экспериментах *in vivo* на крысах у ГК-2 выявлена нейротрофическая активность на моделях травмы мозга (Genrikhs et al., 2018) и ишемического инсульта (Середенин и др., 2018), а также определено корректирующее влияние на память на моделях болезни Альцгеймера (Поварнина и др., 2013; Волкова и др., 2023). При этом ГК-2 лишен основных побочных эффектов полноразмерного NGF — не вызывает гипералгезии и потери веса (Gudasheva et al., 2015).

В настоящей работе возможные ноотропные эффекты дипептида ГК-2 проанализированы у мышей двух линий, ранее селектированных на большой и малый относительный вес мозга (линии БМ и ММ). Оценены показатели решения когнитивного теста на поиск входа в укрытие, выполнение которого требует от животного оперировать правилом неискренности, и теста на неофагофобию, в котором оценивается реакция животного на новую пищу в новой обстановке (в предположении, что при этом усиливается тревожность животного). Отдельная задача настоящей работы — оценка влияния возраста мышей БМ и ММ на выполнение теста на поиск входа в укрытие в связи с эффектами ГК-2. В настоящее время мыши БМ и ММ разводятся без поддерживающего отбора на относительный вес мозга, при этом различия в весе мозга и в поведении сохраняются (Перепелкина и др., 2021). У мышей БМ и ММ исследованного поколения (БМ,  $n = 37$ , ММ,  $n = 42$ ) различия в весе мозга достоверны, как для относительного веса мозга (вес мозга, мг/вес тела, г): БМ —  $17.9 \pm 0.2$ , ММ —  $15.6 \pm 0.2$  ( $p < 0.001$ ), так и для абсолютных его

значений: БМ —  $476.9 \pm 2.1$  г, ММ —  $414.1 \pm 2.0$  г ( $p < 0.01$ ).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Экспериментальные животные

Данные получены на мышах-самцах 2 генотипов и 2 возрастов.

Мыши линии БМ —  $n = 64$ .

3-месячные мыши —  $n = 24$ : введение дипептида —  $n = 8$ , введение физиологического раствора —  $n = 8$ , интактные —  $n = 8$ .

8-месячные мыши —  $n = 24$ : введение дипептида —  $n = 11$ , введение физиологического раствора —  $n = 13$ .

Мыши линии ММ —  $n = 55$ .

3-месячные мыши —  $n = 24$ : введение дипептида —  $n = 8$ , введение физиологического раствора —  $n = 8$ , интактные —  $n = 8$ .

8-месячные мыши —  $n = 17$ : введение дипептида —  $n = 7$ , введение физиологического раствора —  $n = 10$ .

Животных содержали в стандартных пластиковых клетках (размером  $33 \times 22 \times 8$  см), по 5–6 мышей в каждой, с водой и кормом (“Лабораторкорм”, Россия) *ad lib*. Исключение — тест на неофагофобию (реакция животного на новую пищу в новой обстановке), когда животных лишали пищи (но не воды) на 16–18 ч. Условия содержания животных и проведения тестов находятся в соответствии с требованиями Директивы 2010/63 ЕС от 22 сентября 2010 г.

### Введение дипептида

Дипептид ГК-2 — это гексаметилендиамид бис-(моносукцинил-L-глутамил-L-лизина) (молекулярная масса 830.92, чистота 97.4%) — синтезирован в отделе химии лекарственных средств Федерального исследовательского центра оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий (Сазонова и др., 2015). Дипептид растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривентриально (в/в) мышам в возрасте 3 и 8 месяцев (линии БМ и ММ) в дозе 0.5 мг/кг в течение 5 дней. Предпоследнее введение было за сутки до теста на поиск входа в укрытие, после которого делали еще одно введение для тестирования реакции неофагофобии. Дозы ГК-2 выбраны на основании ранее проведенных экспериментов (Середенин и др., 2018; Волкова и др., 2023; Genrikhs et al., 2018). Контрольным мышам вводили физиологический раствор в том же режиме. Объем введения — 0.5 мл на мышь.

*Тест на поиск входа в укрытие*

Данный когнитивный тест (Ben Abdallah et al., 2011) позволяет оценить способность к оперированию правилом неисчезаемости (т. е. животное понимает, что недоступный более восприятию объект продолжает существовать и его можно отыскать).

Экспериментальная камера для проведения теста имеет 2 отделения, одно из которых ярко освещено (размер 30×28×27.5 см), а второе темное (14×28×27.5 см). Отделения соединяются углубленным в пол лазом (глубина 1.5 см, ширина 4.5 см, длина 11.5 см), через который мышь может перейти из светлого отсека, куда ее изначально помещают, в темный отсек. Мыши дается 4 предъявления теста: в первом — лаз открыт, во втором — лаз замаскирован стружкой, в третьем и четвертом — лаз закрыт легкой пластиковой пробкой с прикрепленной картонкой, за которую пробку легко ухватить зубами и вынуть (рис. 1).

Оценивается (вручную) время решения теста — латентный период (ЛП) перехода мыши в темный отсек, число подходов к лазу, число стоек и эпизодов груминга. Оценивается также число эпизодов замирания, которые учи-

тываются не просто по сохранению животным неподвижности, но и по наличию коротких (несколько секунд) эпизодов отсутствия движения вибрисс. Отдельно определяется доля мышей (%), решивших тест в каждом из предъявлений. Для предъявлений теста с открытым лазом и с лазом, замаскированным стружкой, мыши дается 180 с, после чего тест считается решенным или нерешенным. В предъявлениях теста с лазом, закрытым пробкой, это время равно 240 с.

*Реакция на новую пищу в новой обстановке.  
Неофагофобия*

Данный тест (Deacon, 2011) основан на подавлении пищевого поведения животных в новой обстановке, что расценивается как тревожное поведение. Тест проведен на мышах линий БМ и ММ в возрасте 3 и 8 месяцев, которых лишали пищи (но не воды) за 16–18 ч до теста. Новая пища — кубики твердого сыра (1×1 мм), помещавшиеся в плоской чашечке в центр цилиндрической камеры (диаметр 40 см, высота стенок 35 см). В пластиковом полу камеры — отверстия (диаметр 7 мм). Регистрируется: количество съеденного сыра за 5 мин теста; число подходов к кормушке; время (с), занятое едой;



Рис. 1. Мышь вынимает пробку, закрывающую лаз в темное отделение экспериментальной камеры.

число вертикальных стоек, заглядываний в отверстия; число болюсов дефекации; число эпизодов замирания.

#### Статистическая обработка

Статистическая обработка данных проведена (с оценкой нормальности распределения и гомогенности выборок) с использованием двухфакторного ANOVA (с post hoc LSD анализом по Фишеру) — для показателей быстроты выполнения теста на поиск входа в укрытие (ЛП) и показателей теста на неофагофобию. Для оценки различий в долях животных, которые смогли выполнить тест при лазе, закрытом пробкой, использован метод углового преобразования  $\phi$  по Фишеру.

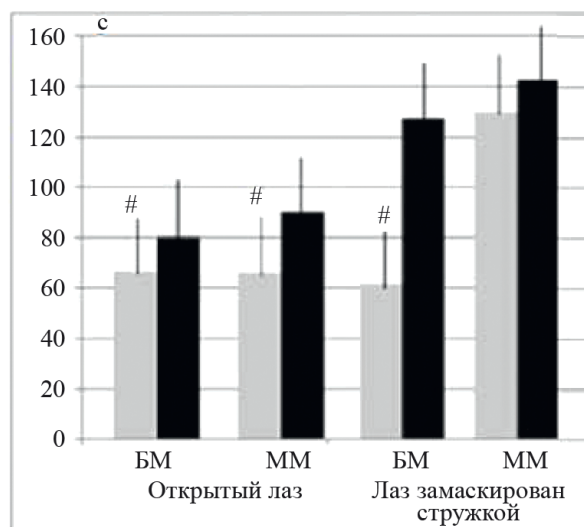
## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Тест на поиск входа в укрытие

Мыши линий БМ и ММ, возраст 3 месяца (пятидневное введение ГК-2). Статистически значимых межгрупповых различий по ЛП перехода в темный отсек установки при открытом лазе не выявлено, однако тенденция к более короткому ЛП при введении ГК-2, по сравнению с контрольной группой, обнаружена ( $p = 0.08$  для мышей линии ММ и  $p = 0.09$  для мышей линии БМ) (рис. 2).

При лазе, замаскированном стружкой, двухфакторный ANOVA показывает достоверное влияние фактора “линия” ( $F_{1-2} = 6.7645$ ,  $p = 0.012$ ), и тенденцию во влиянии фактора “воздействие” ( $F_{1-2} = 2.5684$ ,  $p = 0.089$ ). У мышей БМ в предъявлении теста с лазом, замаскированным стружкой, ЛП перехода в темный отсек камеры после дипептида короче, чем в контроле (тенденция) (после ГК-2 —  $61.9 \pm 23.1$  с, в контроле —  $127.1 \pm 23.1$  с,  $p = 0.053$ ), тогда как у мышей ММ различия в ЛП недостоверны (после ГК-2 —  $130.0 \pm 12.5$  с, в контроле —  $142.6 \pm 12.5$  с) (рис. 2).

Величины ЛП решения теста для предъявлений с лазом, закрытым пробкой, не полностью отражают успешность решения теста, поскольку для случаев нерешения (которых могло быть разное число в разных группах) ЛП принимается равным 240 с, что может сказаться на абсолютной величине среднего ЛП. Более объективную картину и межлинейных различий, и влияния воздействия ГК-2 на решение этих этапов теста дает сравнение долей животных, успешно решивших тест.



**Рис. 2.** ЛП (с) решения теста на поиск входа в укрытие у 3-месячных мышей линий БМ и ММ в первом (открытый лаз) и втором (лаз замаскирован стружкой) предъявлениях теста. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. Серые столбики — введение дипептида (5 дней); черные столбики — контроль (введение физиологического раствора); # — тенденция ( $p < 0.1$ ), по сравнению с контрольными группами той же линии (двухфакторный ANOVA, post hoc LSD-тест по Фишеру).

У 3-месячных мышей доли решения теста с пробкой (суммарно по двум предъявлениям) у групп контроль и дипептид достоверно не различались. В контрольных группах они равны 16.2% и 18.7% соответственно для мышей БМ и ММ. После получения дипептида мыши БМ смогли решить тест в 25% случаев (4 раза из 16 предъявлений), мыши ММ — в 12.5% (2 раза из 16). Таким образом, влияние дипептида на решение теста на поиск входа в укрытие у мышей этого возраста незначительно и в целом перекрывается межлинейными различиями.

Мыши линий БМ и ММ, возраст 8 месяцев. У 8-месячных мышей по показателям ЛП решения теста с открытым лазом выявлено двухфакторным ANOVA достоверное влияние фактора “линия” ( $F_{1-2} = 9.008$ ,  $p = 0.00479$ ) с более быстрой реакцией у мышей БМ. После введения дипептида у мышей обеих линий ЛП решения незначимо ниже, по сравнению с контролем, т. е. картина сходна с таковой у 3-месячных мышей и свидетельствует об отсутствии эффекта дипептида на ЛП решения этого этапа теста (рис. 3).

При втором предъявлении теста (лаз закрыт стружкой) фактор “линия” также оказывает значимое влияние ( $F = 17.689$ ,  $p = 0.000158$ ), а влия-

ние дипептида недостоверно, как и в случае открытого лаза (рис. 3).

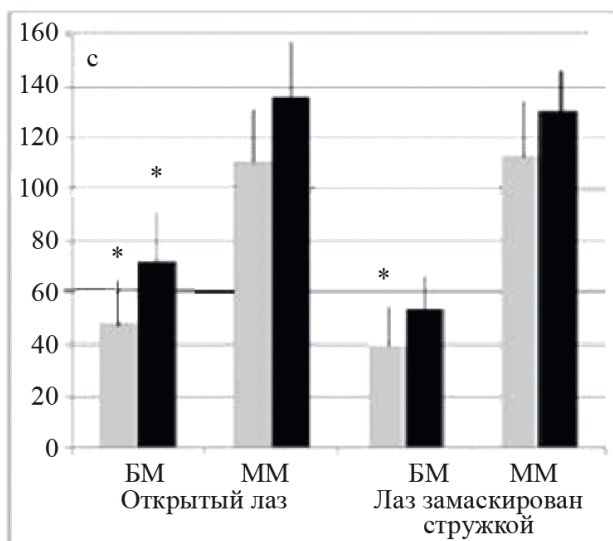
Влияние возраста на величины ЛП решения теста с лазом, замаскированным стружкой (двухфакторный ANOVA, факторы “линия” и “возраст”), для всех групп мышей БМ и ММ (контрольных и получавших дипептид) суммарно выявлено на уровне тенденции ( $F_2 = 3.6667$ ,  $p = 0.060126$ ). Анализ post hoc LSD по Фишеру показывает значимые возрастные различия у мышей БМ: у 3-месячных мышей (и контроль, и дипептид) ЛП решения теста значимо ( $p < 0.05$ ) длиннее, чем у 8-месячных —  $94.5 \pm 15.31$  и  $47.5 \pm 12.5$  с соответственно, тогда как у мышей ММ различия не достоверны —  $133.1 \pm 16.4$  и  $123.5 \pm 14.8$  с соответственно. В каждой из групп доли мышей, решивших тесты с пробкой, представлены на рис. 4 (суммарно по двум предъявлениям теста с пробками). Если у 3-месячных мышей доли таких животных приблизительно одинаковы и очень малы, то у 8-месячных — не только эти доли значимо больше у мышей обеих линий, но также выявлены различия между группами. 8-месячные мыши БМ контрольные решают тест более успешно — в 76.6% случаев, чем после дипептида — в 54.6% (ф, угловой метод Фишера, поскольку различия достоверны при  $t = 2.02$ , а в данном случае

$t = 2.002$ , можно говорить лишь о тенденции). Показатели контрольных мышей БМ выше, чем животных остальных групп (рис. 4).

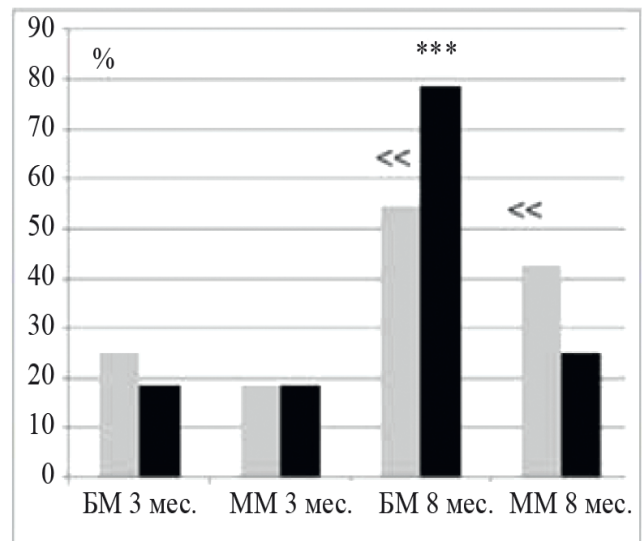
В то же время у мышей линии ММ после дипептида больше (на уровне тенденции) решений, чем в контроле — 42.8 и 25% соответственно).

Таким образом, различия в успешности решения теста при лазе, закрытом пробкой, в группах дипептид и контроль противоположны по знаку у мышей БМ и ММ. Малый размер групп животных, видимо, является причиной отсутствия статистически значимых эффектов дипептида у 8-месячных мышей (по долям успешных решений), полученных по угловому методу Фишера, поскольку по  $\chi^2$ -критерию различия между группами достоверны ( $p < 0.001$ ).

Интегральное сравнение долей 3- и 8-месячных мышей двух линий (данные по группам контроль и дипептид), решивших тест на поиск входа в укрытие с лазом, закрытым пробкой, выявило возрастные различия у мышей БМ. Доля решений теста у мышей БМ 8-месячного возраста больше ( $p < 0.001$ ), чем у 3-месячных — 66.7 и 21.9% соответственно. Для мышей ММ не выявлено статистически значимых различий, но у 8-месячных мышей ММ доля решений этого



**Рис. 3.** ЛП (с) решения теста на поиск входа в укрытие у 8-месячных мышей линий БМ и ММ в первом (открытый лаз) и втором (лаз замаскирован стружкой) предъявлениях теста. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. Серые столбики — введение дипептида (однократно), черные столбики — контроль (введение физиологического раствора); \* — значимое ( $p < 0.05$ ) отличие от такой же группы линии ММ (двухфакторный ANOVA, post hoc LSD-тест по Фишеру).



**Рис. 4.** Доли (%) успешных решений теста на поиск входа в укрытие у 8-месячных мышей линий БМ и ММ при лазе, закрытом пробкой (суммарно по двум предъявлениям). Данные представлены в виде средних. Серые столбики — введение дипептида, черные столбики — контроль (введение физиологического раствора); \*\*\* — значимое ( $p < 0.001$ ) отличие от такой же группы линии ММ; << — различия между группой после дипептида и контрольной группой приближаются к достоверности (метод ф по Фишеру,  $t = 1.8$  и  $t = 1.83$ , тогда как  $p < 0.05$  при  $t = 2.0$ ).

этапа теста несколько больше, у 3-месячных — 32.3 и 15.6 %, т. е. знак различий аналогичен БМ.

Сравнение долей 3-месячных интактных мышей (не получавших инъекций ни дипептида, ни физиологического раствора), решивших тест на поиск входа в укрытие с лазом, закрытым пробкой, показывает более успешное ( $p < 0.01$ ) решение его мышами БМ, чем ММ — 43.7% и 6.25% соответственно (угловой метод Фишера), что подтверждает полученные ранее данные (Перепелкина и др., 2021).

Малый размер групп животных не позволяет делать уверенное заключение о влиянии пятикратной болевой стимуляции (при ГК-2 и физиологическом растворе) и хэндлинга (взятия в руки) на поведение мышей в данном тесте. Однако нельзя исключить, что экспериментальные манипуляции с животными при серийных инъекциях могли оказать влияние на их поведение в этом тесте, причем оно (предположительно) может быть разнонаправленным у БМ и ММ.

Эти данные могут означать, что менее успешное выполнение теста с пробкой у мышей БМ после 5 дней введения дипептида (при сравнении с контролем и ММ), которое можно трактовать как отсутствие его ноотропного эффекта, может быть результатом влияния ГК-2 на исследовательское поведение мышей этой линии. Возможно, что влияние дипептида на мышей БМ выразилось в акцентуации их исследовательского поведения, сопряженного со снижением тревожности при пребывании на ярко освещенной площадке. Непрямое подтверждение этого предположения — описанный нами ранее дифференциальный эффект введения атомоксетина (блокатора обратного захвата норадреналина) на мышей БМ и ММ (Perpelkina, Poletaeva, 2023).

Таким образом, предполагавшееся влияние ГК-2 на решение теста на поиск входа в укрытие обнаружено, но сложно по своему рисунку, поскольку при этом выявлены и межлинейные, и возрастные различия в поведении, что, по всей видимости, отражается в невысоком уровне статистической значимости различий.

#### *ЛП первого подхода к лазу*

Исследовательскую активность мышей в данном тесте можно оценивать по ЛП первого подхода к лазу, а также по числу вертикальных стоек, совершенных мышью до решения, однако второй показатель мало информативен, поскольку в разных группах мышей время (ЛП) решения теста разное, и это сравнение затруднительно. В группах 3-месячных мышей значимых различий между группами по ЛП первого под-

хода к лазу не выявлено. В группах 8-месячных мышей в тех предъявлениях теста, когда лаз был открыт или замаскирован стружкой, ЛП у групп дипептид и контроль у обеих линий различается мало (данные *post hoc* LSD тест по Фишеру), но у мышей линии БМ более короткие ЛП первого подхода к лазу — двухфакторный ANOVA показывает высоко достоверное влияние фактора “линия” (для открытого лаза —  $F_{1-2} = 11.3$ ,  $p = 0.002$ , для лаза, закрытого стружкой, —  $F_{1-2} = 12.5$ ,  $p = 0.001$ ).

Межлинейные различия по ЛП первого подхода к лазу, когда он был закрыт пробкой, также выявлены, но на грани достоверности, т. е. могут быть проинтерпретированы как тенденция ( $p = 0.056$  для первого теста с пробкой и  $p = 0.058$  — для второго). Выявлены различия между группами дипептид и контроль для ЛП первого подхода к лазу, закрытому пробкой, но из-за высокого разброса данных при малых размерах групп они недостоверны. Так, например, у мышей БМ после дипептида для первого предъявления теста с пробкой ЛП первого подхода к лазу  $23.0 \pm 18.8$  с, а в контроле —  $45.9 \pm 17.3$  с, для мышей ММ:  $53.4 \pm 27.9$  и  $101.1 \pm 20.8$  с соответственно. Высокий разброс данных по этому показателю может быть связан с влиянием спонтанных перемещений мыши по освещенной части камеры, когда животное может быстро подойти к лазу (не исследуя его), однако общая тенденция различий позволяет осторожно предположить, что введение дипептида несколько усилило исследовательское поведение мышей.

#### *Число эпизодов замирания*

Поскольку выявление реакции замирания по отсутствию движения вибрисс при визуальном наблюдении не может быть достаточно надежным, пересчет зафиксированного суммарного числа замираний с учетом разной латентности выполнения теста (или его невыполнения) дает нечеткие результаты, следовательно, выводы о влиянии введения дипептида на этот показатель нельзя считать надежными. Эти данные в работе не представлены, можно отметить незначимое увеличение числа этих эпизодов у мышей обеих линий. Влияние дипептида на реакцию замирания следует анализировать в специальных экспериментах, поскольку при фармакологических и иных воздействиях у животных усиливается настороженность, которая также проявляется в замирании. Это состояние, вызванное попаданием животного в новую обстановку, можно, разумеется, прямолинейно (в соответствии с общепринятой точкой зрения) интерпретировать как усиление тревожности,

однако оно может быть вызвано и повышением внимания животного к новой обстановке.

Интерпретация нейрофизиологического смысла выявленных различий достаточно трудна. Можно предположить, что дипептидный миметик NGF ГК-2 может оказывать активирующее влияние на глутаматергические синапсы, что известно для полноразмерного NGF (Liu et al., 2001; Paredes et al., 2007), и это согласуется с ноотропными свойствами как полноразмерного нейротрофина (Fischer et al., 1991; Eu et al., 2021), так и ГК-2 (Волкова и др., 2022). Показано, что блокада NMDA-рецепторов (неонатальное введение МК-801) изменяет исследовательское поведение и тревожность взрослых мышей генотип-зависимым образом (Akillioglu et al., 2012), т. е. генетические особенности поведения могут влиять на эффект фармакологического воздействия. Введение классического ноотропного препарата ноопепта взрослым мышам BALB/c и C57BL/6J также обнаруживает генотип-зависимые изменения в тревожности и исследовательской активности, ассоциированные с разнонаправленной модуляцией активности глутаматергической системы мозга (Васильева и др., 2020). Нейрохимические изменения в мозге чаще всего оцениваются в переднемозговых структурах, однако в среднем мозге в центральном сером веществе (ЦСВ), ответственном за проявление поведения защиты, имеется группа глутаматергических нейронов. Усиление их активности в ответ на введение ГК-2 может несколько усилить такое защитное замирание.

Показано участие глутаматных рецепторов нейронов дорсальной части ЦСВ в реализации реакций страха и тревоги (Fendt, 2000; Reimer et al., 2012; Rozeske et al., 2018).

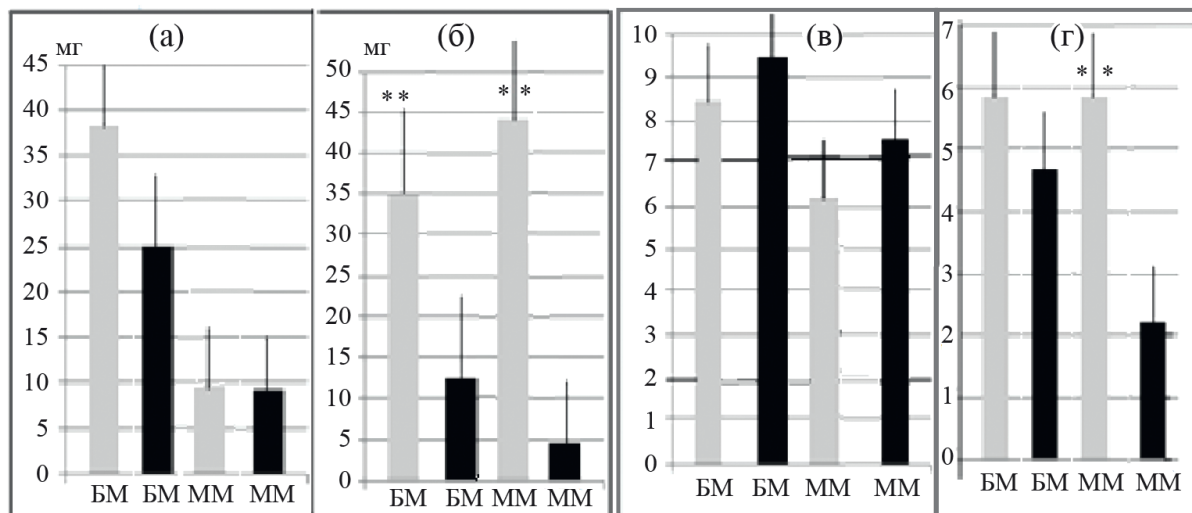
#### Тест на неофагофобию

Наиболее информативным показателем дифференциальной реакции мышей этих линий на новую пищу в новой обстановке оказывается количество пищи, съеденной за 5 мин. теста.

У 3-месячных мышей двухфакторным ANOVA выявлено достоверное влияние и линии ( $F_{1-2} = 5.3$ ,  $p = 0.02$ ), и воздействия ( $F_{1-2} = 4.823$ ,  $p = 0.05$ ), однако *post hoc* LSD-тест по Фишеру не обнаруживает достоверных межгрупповых различий дипептид/контроль (рис. 5).

Мышами БМ после дипептида съедено новой пищи несколько больше, чем контрольными ( $38.4 \pm 7.9$  мг/ $25.1 \pm 7.9$  мг), тогда как у мышей ММ различий практически нет ( $9.6 \pm 7.9$  мг/ $9.1 \pm 7.9$  мг).

У 8-месячных мышей БМ и ММ после введения ГК-2 количество съеденной новой пищи в течение 5 мин. теста находится под достоверным влиянием фактора воздействия ( $F_{1-2} = 6.94$ ,  $p = 0.014$ ). Мышами обеих линий после введения дипептида съедено сыра достоверно больше (рис. 5). Этот эффект следует отнести к ноотропным эффектам ГК-2, поскольку другие показатели поведения не позволяют объяснить этот эффект изменением тревожности (число эпизо-



**Рис. 5.** Реакция на новую пищу в новой (не пугающей) обстановке у мышей БМ и ММ двух возрастных групп при действии пептида (серые столбики) и после введения физиологического раствора (черные столбики). Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. (а) — количество съеденного сыра 3-месячными мышами за 5 мин. теста; (б) — количество съеденного сыра 8-месячными мышами за 5 мин. теста; (в) — число подходов 3-месячных мышей к кормушке с новой пищей; (г) — число подходов 8-месячных мышей к кормушке с новой пищей; \*\* — статистически значимое отличие ( $p < 0.01$ ) от показателей соответствующей контрольной группы (двухфакторный ANOVA, *post hoc* LSD-тест по Фишеру).

дов неподвижности с прекращением движения вибрисс после введения ГК-2 больше у мышей обеих линий). Двухфакторный ANOVA выявляет достоверное влияние введения дипептида ( $F_{1-2} = 5.02, p = 0.034$ ) с большим числом замираний после его инъекций. По LSD-тесту по Фишеру у мышей ММ различия в числе этих эпизодов достоверны (дипептид  $4.5 \pm 0.7$ , контроль  $1.9 \pm 0.7, p < 0.05$ ). Это не подтверждает предположение о снижении тревожности/настороженности после введения дипептида.

На число вертикальных стоек за 5 мин теста (как проявление исследовательской активности), по данным двухфакторного ANOVA, влияет и генотип ( $F_{1-2} = 7.9, p = 0.008$ ), и введение дипептида ( $F_{1-2} = 6.8, p = 0.003$ ). После введения дипептида стойки реже, в особенности у мышей ММ (дипептид —  $8.9 \pm 3.6$ , контроль —  $24.2 \pm 3.6, p < 0.01$ ), у БМ различия меньше по размаху и незначимы (что может определяться их большим вниманием к кормушке с новой пищей).

Таким образом, количество съеденной новой пищи в новой (но не пугающей животное) обстановке в качестве показателя позитивной реакции мыши на новизну в целом выше после введения дипептида, что можно трактовать как проявление влияния этого соединения на один из показателей когнитивных способностей животного — реакцию на новое (Perpelkina, Poletaeva, 2022). Возрастные различия в эффекте дипептида на этот параметр у БМ и ММ неодинаковы. У мышей линии БМ после введения дипептида количество съеденной новой пищи одинаково в обеих возрастных группах (между контрольными группами также нет достоверных различий). Мышами ММ после введения дипептида в 8-месячном возрасте съедено сыра больше ( $p < 0.05$ ), тогда как в контрольных группах эта величина у ММ недостоверно меньше, чем у БМ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показатели веса мозга у животных близких таксономических групп в сравнительных исследованиях связывают с уровнем эволюционного развития вида (Rensch, 1956; Kruska, 1975, 2005). Очевидно, что на вес мозга влияют как генетические факторы, так и экологические условия, а выявляемые взаимодействия между этими факторами говорят о сложной природе этого признака (Henderson, 1973; Markina et al., 2001). Воздействие ряда физических и химических агентов в пренатальный период значительно снижают вес мозга лабораторных грызунов (Wahlsten et al., 1993; Rosenzweig, Bennet, 1996). В целом ряде исследований проводился анализ особенностей поведения мышей, селектиро-

ванных на большой и малый относительный вес мозга. Практически во всех случаях расхождение линий по этому признаку происходит довольно быстро (обнаруживается уже в третьем-четвертом поколениях селекции), и при этом констатируются межлинейные различия в поведении (Перепелкина и др., 2006; Roderick et al., 1973; Fuller, 1979; Poletaeva et al., 1993; Markina et al., 2001). Практически во всех случаях обучение мышей и при пищевом, и при болевом подкреплении более успешно у мышей с большим относительным весом мозга (Попова и др., 1981; Маркина и др., 1999а; Elias, 1969; Gonsiorek et al., 1974). В экспериментах с мышами линий БМ и ММ различия обнаружены также в показателях исследовательского поведения, стресс-реактивности и тревожности (Маркина и др., 1999б). Следует отметить, что ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина) также проявляет в когнитивных тестах генотип-зависимые ноотропные свойства у мышей инбредных линий (Бельник и др., 2007б). Описано генотип-зависимое влияние ноопепта на поведение мышей инбредных линий в условиях ряда лабораторных тестов, в частности в тестах на тревожность и исследовательское поведение (Бельник и др., 2007а; Васильева и др., 2012; Ковалев и др., 2014).

Полученные в настоящей работе данные показывают, что изучение влияния низкомолекулярных миметиков нейротрофинов на разные формы поведения мышей — важное нейробиологическое направление исследований. Эти сведения важны для более полной информации об этих соединениях, которые могут быть потенциальными лекарственными препаратами.

Благодаря проведенной работе можно сформулировать следующие выводы.

1. Показаны межлинейные различия в решении теста на неисчезаемость (по Ж. Пиаже) как в контроле, так и после 5 дней введения дипептида ГК-2 (миметик NGF) у 3- и 8-месячных мышей двух линий, ранее селектированных на большой и малый относительный вес мозга (линии БМ и ММ).

2. После введения дипептида латентные периоды решения теста на поиск входа в укрытие более короткие и у БМ, и у ММ с более четкими различиями в 8-месячном возрасте.

3. Доли животных БМ после введения пептида, решивших тест при блокировке пробкой входа в темную комфортную часть установки, ниже, а у мышей ММ — выше, чем в контроле, но при малом размере групп эффект определяется на границе статистической значимости.

4. В тесте на новую пищу в новой обстановке у БМ и ММ введение пептида вызывает более активную реакцию на новую пищу, причем у мышей БМ этот эффект выражен более четко в 8-месячном возрасте, хотя число эпизодов замирания также выше в группах после введения дипептида, что не позволяет объяснить этот эффект снижением тревожности.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование осуществлено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-25-00042.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования на мышах проведены в соответствии с требованиями Директивы 2010/63 ЕС от 22 сентября 2010 г.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Исследование *in vitro* нейропротективных свойств нового оригинального миметика фактора роста нервов ГК-2 // Бюл. эксп. биол. мед. 2010. Т. 150 (11). С. 538–541.
- Антипова Т.А., Деев И.Е., Гудашева Т.А. и др. Доказательство селективности взаимодействия дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 с TrkA-рецептором с использованием нокаутных по генам *Trka* и *Trkb* клеток линии НТ-22 // Хим. фарм. журн. 2022. Т. 56 (12). С. 18–22.  
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2022-56-12-18-22>
- Бельник А.П., Островская Р.У., Поletaева И.И. Зависимые от генотипа изменения поведения мышей под влиянием ноопепта // Журн. высш. нерв. деят. 2007а. Т. 57 (5). С. 613–617.
- Бельник А.П., Островская Р.У., Поletaева И.И. Зависимые от генотипа особенности поведения мышей в когнитивных тестах. Влияние ноопепта // Журн. высш. нерв. деят. 2007б. Т. 57 (6). С. 717–724.
- Васильева Е.В., Салимов Р.М., Ковалев Г.И. Влияние ноотропных средств на поведение мышей BALB/сi C57BL/6 в крестообразном лабиринте // Эксп. клин. фармакол. 2012. Т. 75 (7). С. 3–7.
- Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., Абдуллина А.А. и др. Преобладание ноотропного или анксиолитического эффекта пептидов селанк, семакс и ноопепт в зависимости от пути их введения мышам BALB/сi и C57BL/6 // Нейрохимия. 2020. Т. 37 (3). С. 208–219.  
<https://doi.org/10.31857/S1027813320030115>
- Волкова А.А., Поварнина П.Ю., Никифоров Д.М. и др. Сравнительное изучение мнемотропной активности димерных дипептидных миметиков отдельных петель NGF и BDNF в тесте распознавания нового объекта у крыс // Хим. фарм. журн. 2022. Т. 56 (4). С. 3–6.  
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2022-56-4-3-6>
- Волкова А.А., Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А. Ноотропное действие дипептидного миметика NGF на модели болезни Альцгеймера // Вопр. биол. мед. фарм. химии. 2023. Т. 26 (11). С. 3–11.  
<https://doi.org/10.29296/25877313-2023-11-10>
- Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов // Докл. АН. 2010. Т. 4 (1). С. 549–552.
- Ковалев Г.И., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М., Незнамов Г.Г. Динамика поведенческих и нейрохимических эффектов после длительного введения ноопепта мышам C57BL/6 и BALB/с // Эксп. клин. фармакол. 2014. Т. 77 (12). С. 3–9.
- Маркина Н.В., Попова Н.В., Поletaева И.И. Межлинейные различия в поведении мышей, селективированных на большую и малую массу мозга // Журн. высш. нервн. деят. 1999а. Т. 49 (1). С. 59–67.
- Маркина Н.В., Попова Н.В., Салимов Р.М. и др. Сравнение уровней тревожности и стресс-реактивности у мышей, селективированных на большой и малый вес мозга // Журн. высш. нервн. деят. 1999б. Т. 49 (5). С. 789–798.
- Переделкина О.В., Маркина Н.В., Поletaева И.И. Способность к экстраполяции направления движения у мышей, селективированных на большой и малый вес мозга: влияние пребывания в обогащенной среде // Журн. высш. нерв. деят. 2006. Т. 56 (2). С. 282–286.
- Переделкина О.В., Огиенко Н.А., Сулейманова А.Д., Поletaева И.И. Стресс иммобилизации и поведение мышей с разным весом мозга // Журн. высш. нерв. деят. 2021. Т. 71 (1). С. 104–112.  
<https://doi.org/10.31857/S0044467721010081>
- Поварнина П.Ю., Воронцова О.Н., Гудашева Т.А. и др. Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 восстанавливает нарушенные когнитивные функции в крысиных моделях болезни Альцгеймера // Acta Naturae. 2013. Т. 5 (3). С. 88–95.
- Попова Н.В., Поletaева И.И., Романова Л.Г. Способность к обучению и экстраполяции у мышей, селективированных на разный вес мозга // Журн. высш. нервн. деят. 1981. Т. 31 (3). С. 550–555.
- Сазонова Н.М., Тарасюк А.В., Курилов Д.В. и др. Синтез димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2, потенциального нейропротективного препарата // Хим. фарм. журн. 2015. Т. 49 (7). С. 10–19.
- Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF. Патент РФ № 2410392. 2011. Дата приоритета 16.02.2009.
- Середенин С.Б., Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А. Экспериментальная оценка терапевтического окна нейропротективной активности препарата ГК-2, низкомолекулярного миметика фактора роста нервов //

- Журн. неврол. психиатр. 2018. Т. 118 (7). С. 49–53.  
<http://doi.org/10.17116/jnevro20181187149>
- Akillioglu K., Babar Melik E., Melik E., Kocahan S. The investigation of neonatal MK-801 administration and physical environmental enrichment on emotional and cognitive functions in adult Balb/c mice // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2012. V. 102 (3). P. 407–414.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.06.006>
- Aloe L., Tirassa P., Bracci-Laudiero L. Nerve growth factor in neurological and non-neurological diseases: basic findings and emerging pharmacological perspectives // *Curr. Pharm. Des.* 2001. V. 7 (2). P. 113–123.  
<https://doi.org/10.2174/1381612013398383>
- Ben Abdallah N.M., Fuss J., Trusel M. et al. The puzzle box as a simple and efficient behavioral test for exploring impairments of general cognition and executive functions in mouse models of schizophrenia // *Exp. Neurol.* 2011. V. 227 (1). P. 42–52.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.09.008>
- Ciafrè S., Ferraguti G., Tirassa P. et al. Nerve growth factor in the psychiatric brain // *Riv. Psichiatr.* 2020. V. 55 (1). P. 4–15.  
<https://doi.org/10.1708/3301.32713>
- Deacon R.M. Hyponeophagia: a measure of anxiety in the mouse // *J. Vis. Exp.* 2011. V. 51. P. 2613.  
<https://doi.org/10.3791/2613>
- Elias M.F. Differences in spatial discrimination reversal learning for mice genetically selected for high brain weight and unselected controls // *Percept. Mot. Skills.* 1969. V. 28. P. 707–712.  
<https://doi.org/10.2466/pms.1969.28.3.707>
- Eu W.Z., Chen Y.J., Chen W.T. et al. The effect of nerve growth factor on supporting spatial memory depends upon hippocampal cholinergic innervation // *Transl. Psychiatry.* 2021. V. 11 (1). P. 162.  
<https://doi.org/10.1038/s41398-021-01280-3>
- Fendt M. Expression and conditioned inhibition of fear-potentiated startle after stimulation and blockade of AMPA/Kainate and GABA(A) receptors in the dorsal periaqueductal gray // *Brain Res.* 2000. V. 880 (1–2). P. 1–10.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02665-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02665-2)
- Fischer W., Björklund A., Chen K., Gage F.H. NGF improves spatial memory in aged rodents as a function of age // *J. Neurosci.* 1991. V. 11 (7). P. 1889–1906.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-07-01889.1991>
- Fuller J.L. Fuller BWS lines: history and results // *Development and evolution of brain size* / Eds M.E. Hahn, C. Jensen, B.C. Dudek. N.Y.: Acad. Press, 1979. P. 518–539.
- Genrikhs E.E., Voronkov D.N., Kapkaeva M.R. et al. The delayed protective effect of GK-2, a dipeptide mimetic of nerve growth factor, in a model of rat traumatic brain injury // *Brain Res. Bull.* 2018. V. 140. P. 148–153.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.05.002>
- Gonsiorek J.C., Donovick P.J., Burright R.G., Fuller J.L. Aggression in low and high brain weight mice following septal lesions // *Physiol. Behav.* 1974. V. 12. P. 813–818.  
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(74\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(74)90018-3)
- Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Antipova T.A. et al. Dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor Loop 4 and Loop 1 activate TRKA with different patterns of intracellular signal transduction // *J. Biomed. Sci.* 2015. V. 22. P. 106.  
<https://doi.org/10.1186/s12929-015-0198-z>
- Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Seredenin S.B. Novel technologies for dipeptide drugs design and their implantation // *Curr. Pharm. Des.* 2018. V. 24 (26). P. 3020–3027.  
<https://doi.org/10.2174/1381612824666181008105641>
- Henderson N.D. Brain weight changes resulting from enriched rearing conditions. A diallel analysis // *Develop. Psychobiol.* 1973. V. 6. P. 367–376.  
<https://doi.org/10.1002/dev.420060410>
- Kruska D.C. Comparative quantitative study on brains of wild and laboratory rats. I. Comparison of volume of total brain and classical brain parts // *J. Hirnforsch.* 1975. V. 16. P. 469–483.
- Kruska D.C. On the evolutionary significance of encephalization in some eutherian mammals: effects of adaptive radiation, domestication, and feralization // *Brain Behav. Evol.* 2005. V. 65. P. 73–108.  
<https://doi.org/10.1159/000082979>
- Liu A., Prenger M.S., Norton D.D. et al. Nerve growth factor uses Ras/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase cascades to up-regulate the N-methyl-D-aspartate receptor 1 promoter // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276 (48). P. 45372–45379.
- Markina N.V., Salimov R.M., Poletaeva I.I. Behavioral screening of two mouse lines selected for different brain weight // *Prog. Neuropsychopharm. Biol. Psych.* 2001. V. 25 (5). P. 1083–1109.  
[https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(01\)00169-5](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(01)00169-5)
- Paredes D., Granholm A.C., Bickford P.C. Effects of NGF and BDNF on baseline glutamate and dopamine release in the hippocampal formation of the adult rat // *Brain Res.* 2007. V. 1141. P. 56–64.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.018>
- Perepelkina O.V., Poletaeva I.I. Selection of mice for object permanence cognitive task solution // *Neurol. Int.* 2022. V. 14 (3). P. 696–706.  
<https://doi.org/10.3390/neurolint14030058> PMID: 36135993
- Perepelkina O.V., Poletaeva I.I. Cognitive test solution in mice with different brain weights after atomoxetine // *Neurol. Int.* 2023. V. 15 (2). P. 649–660.  
<https://doi.org/10.3390/neurolint15020041>
- Poletaeva I.I., Popova N.V., Romanova L.G. Genetic aspects of animal reasoning // *Behav. Genet.* 1993. V. 23 (5). P. 467–475.  
<https://doi.org/10.1007/BF01067982>
- Reimer A.E., De Oliveira A.R., Brandão M.L. Glutamatergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray matter modulate the expression of conditioned freezing and fear-potentiated startle // *Neuroscience.* 2012. V. 219. P. 72–81.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.06.005>

- Rensch B.* Increase in learning capability with increase of brain-size // *Amer. Natur.* 1956. V. 90. P. 81–96.
- Roderick T.H., Wimer R.E., Wimer C.C., Schwartzkroin B.* Genetic and phenotypic variation in weight of brain and spinal cord between inbred strains of mice // *Brain Res.* 1973. V. 64. P. 345–353.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90188-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90188-1)
- Rocco M.L., Soligo M., Manni L., Aloe L.* Nerve growth factor: early studies and recent clinical trials // *Curr. Neuropharmacol.* 2018. V. 16 (10). P. 1455–1465.  
<https://doi.org/10.2174/1570159X16666180412092859>
- Rosenzweig M.R., Bennet E.L.* Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior // *Behav. Brain Res.* 1996. V. 78. P. 57–65.  
[https://doi.org/10.1016/0166-4328\(95\)00216-2](https://doi.org/10.1016/0166-4328(95)00216-2)
- Rozeske R.R., Jercog D., Karalis N. et al.* Prefrontal-periaqueductal gray-projecting neurons mediate context fear discrimination // *Neuron.* 2018. V. 97 (4). P. 898–910.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.044>
- Seredenin S.B., Gudasheva T.A.* Dipeptide mimetics of NGF and BDNF neurotrophins. Patent China. 102365294B. 2016. Priority date 16.02.2009.
- Seredenin S.B., Gudasheva T.A.* Dipeptide mimetics of NGF and BDNF neurotrophins. Patent India. 296506. 2018. Priority date 16.02.2009.
- Seredenin S.B., Gudasheva T.A.* Dipeptide mimetics of NGF and BDNF neurotrophins. Patent EP 2397488B1. 2019. Priority date 16.02.2009.
- Terry A.V. Jr., Kutiyanawalla A., Pillai A.* Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory in rats // *Physiol. Behav.* 2011. V. 102 (2). P. 149–157.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.11.005>
- Wahlsten D., Bulman-Fleming B., Wainwright P.E. et al.* Effects of environmental enrichment on cortical depth and Morris-maze performance in B6D2F2 mice exposed to ethanol // *Neurotoxicol. Teratol.* 1993. V. 15. P. 11–20.  
[https://doi.org/10.1016/0892-0362\(93\)90040-u](https://doi.org/10.1016/0892-0362(93)90040-u)

## The Influence of Low-Molecular NGF Mimetic Dipeptide GK-2 Behavior of Mice from Two Outbred Strains Differing by Brain Weight

O. V. Perepelkina<sup>a</sup>, I. I. Poletaeva<sup>a, \*</sup>, P. Yu. Povarnina<sup>b</sup>, T. A. Gudasheva<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

<sup>b</sup>*Federal Center for Original and Perspective Technologies Investigations, Moscow, Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: ingapoletaeva@mail.ru*

The investigation includes the analysis of nootropic effects of dimeric dipeptide, substance GK-2, nerve growth factor mimetic, in the cognitive test (elementary logic task) in mice of two strains selected for large and small relative brain weight (strains LB and SB). The influence of dipeptide (0.5 mg/kg, injected i.p., sub chronically) on cognitive test solution in mice of different genotypes had been opposite by “sign” — the proportion of mice, which solved the test successfully in LB strain was lower than that in controls, while it was higher in SB mice. It was also demonstrated that in neophagophobia test the dipeptide infusion induce more active reaction to the novel food with more clear cut reaction in LB mice. The data on genotype-dependent changes in behavior after GK-2 infusion are important for more extensive characteristic of GK-2 pharmacological properties as the plausible therapeutic drug.

**Keywords:** nerve growth factor, dipeptide mimetic, cognitive abilities, hyponeophagia, genotype, brain weight, mice

УДК 597.6;598.1(470.620)

**РЕЦЕНЗИЯ НА КНИГУ: С. В. ОСТРОВСКИХ, О. Н. БЫХАЛОВА.  
ЗЕМНОВОДНЫЕ И ПРЕСМЫКАЮЩИЕСЯ ЗАПОВЕДНИКА “УТРИШ”.  
ОПРЕДЕЛИТЕЛЬ. НОВОРОССИЙСК: ВАРИАНТ, 2022. 160 с.  
ISSN 978-5-6048605-1-9**

© 2024 г. В. В. Бобров (<https://orcid.org/0000-0001-6756-516X>)

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия*

*e-mail: vladimir.v.bobrov@gmail.com*

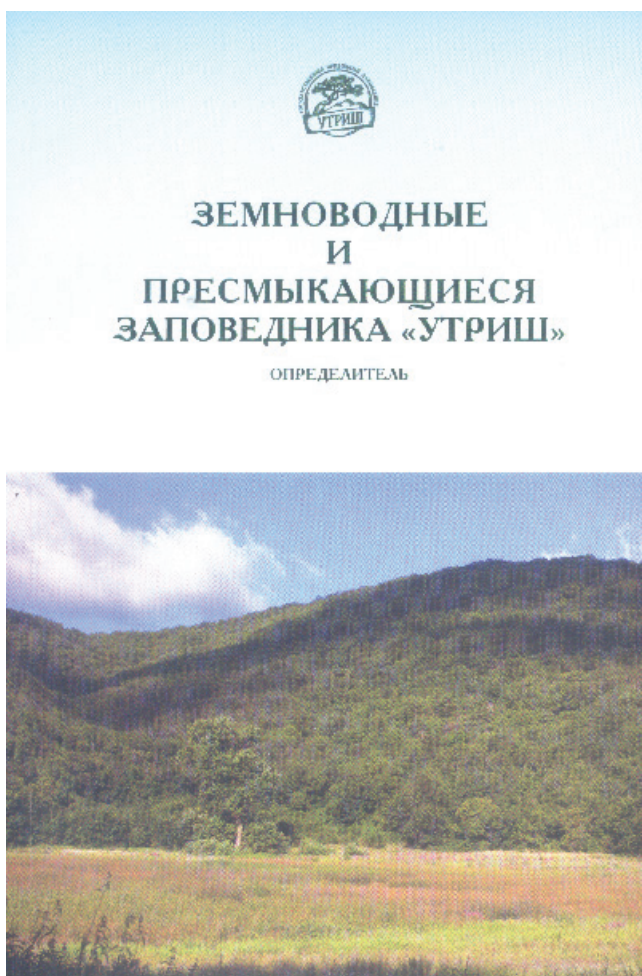
Поступила в редакцию 02.04.2024 г.

Рецензия на книгу. Разбираются достоинства и недостатки. Отмечен высокий уровень представления материала, высокое качество и наглядность иллюстраций. Книга может служить образцом для будущих подобных изданий по другим заповедникам.

**Ключевые слова:** земноводные, пресмыкающиеся, заповедник “Утриш”

**DOI:** 10.31857/S0042132424040102, **EDN:** POZPNT

Отечественная герпетологическая литература пополнилась замечательной книгой, посвященной герпетофауне заповедника “Утриш”, расположенного на п-ове Абрау (Краснодарский край). К 100-летию заповедной системы России нами была проведена оценка состояния герпетологических исследований в отечественных заповедниках (Бобров, 2018). Анализ литературы и информации, содержащейся на их сайтах, показал, что даже просто списки герпетофауны для своей территории имеют далеко не все заповедники, а работы экологического характера проводились и вовсе на территории весьма ограниченного числа заповедников, в основном в тех, где в штате были профессиональные герпетологи. В большинстве случаев это краткая информация, опубликованная в сериях “Заповедники СССР” и “Флора и фауна заповедников”. Редкая особо охраняемая природная территория (ООПТ) может похвастаться полноценной статьей, опубликованной либо в своих трудах, либо в тематическом сборнике. Некоторые заповедники издали буклеты с кратким описанием и отличительными особенностями населяющих их территорию видов. В частности, в создании такого буклета по пресмыкающимся Приокско-Террасного заповедника по просьбе руководства этой ООПТ довелось принять участие и автору настоящей рецензии (Бобров, 2008). А уж книгой, полностью посвященной герпетофауне, могут похвастать единичные заповедники, в частности Кавказский (Иваненко, Ковалев, 2019), а также



национальный парк “Земля леопарда” (Маслова и др., 2016).

Глава 1 посвящена описанию истории изучения земноводных и пресмыкающихся п-ова Абрау, которая насчитывает более 115 лет. Перед глазами возникает картина кропотливого сбора сведений еще задолго до организации здесь заповедника. Авторы отмечают, что некоторые виды в предыдущих публикациях указаны ошибочно, в то же время перечисляют виды, нахождение которых в этом районе весьма вероятно.

Большую ценность имеет глава 2, где изложены рекомендации по определению животных, что продемонстрировано на примере конкретной особи зеленой жабы.

А в главе 3 приведен собственно определитель, причем авторы подробно иллюстрируют, на какие части тела следует обращать внимание при определении разных семейств, родов и видов. Все это настолько наглядно, что пользоваться определителем сможет и неспециалист, а не только профессиональный герпетолог. Самое главное, если исследователь обладает современной фототехникой, ему необязательно отлавливать встреченную особь (что, собственно, и запрещено делать на территории ООПТ), а, сделав качественные снимки указанных частей тела, предоставить их специалисту для подтверждения правильности определения. Поскольку во многих заповедниках герпетологов нет, а то и никогда не было в штате, подобный подход пригодился бы каждому ООПТ. Автору данной статьи много раз доводилось читать в “Летописях природы” такие фразы: “первая в году встреча лягушки”, “последняя в году встреча ящерицы” и т.п. Какой лягушки, если их в фауне заповедника, скажем, четыре вида? Какой ящерицы? Если бы были приведены конкретные виды, можно было бы проследить многолетнюю фенологию, а также изменения в видовом составе, в численности и т.д.

И, наконец, глава 4 — главная в книге, в которой приводятся подробные описания 8 видов земноводных и 17 видов пресмыкающихся, населяющих территорию заповедника и его окрестностей. Каждый очерк построен по единой схеме и имеет несколько разделов.

— “Замечания по таксономии”: обсуждается современный систематический статус, история его изменения, наличие подвидов.

— “Глобальный ареал”: приводится в общих чертах, при этом дает понять, насколько широко распространен данный вид (или подвид).

— “Региональный ареал”: описывается распространение в пределах Кавказа.

— “Распространение в пределах заповедника и у его границ”: перечисляются урочища, водотоки, в которых был обнаружен данный вид, приводятся вертикальные границы распространения, даются прогнозы о возможных местах обнаружения.

— “Особенности внешнего облика”: приводится описание каждого вида, размеры, окраска и т.п.

— “Особенности экологии”: описывается биотопическая приуроченность, убежища.

— “Особенности биологии”: описывается жизненный цикл, сезон размножения, кормовые объекты, численность.

— “Лимитирующие факторы и угрозы”: дается перечень, особо указана опасность, прежде всего для земноводных, инвазионного вида енота-полоскуна.

— “Охранный статус”: указано включение (если есть) в Красные книги РФ и Краснодарского края, а также категория в Красном списке Международного союза охраны животных (МСОП), если таковая имеется.

— “Источники информации”: перечень публикаций, из которых взяты сведения.

Впечатляет общий список литературы, состоящий из 195 наименований, в том числе 65 — на английском языке. Книга великолепно иллюстрирована, причем и рисунками, и фотографиями (для каждого вида — по несколько фото).

Из замечаний, которые правильнее назвать предложениями (в том числе для авторов будущих аналогичных изданий), можно назвать следующие. Хотелось бы, чтобы авторы привели подробную картосхему заповедника с показом различных биотопов. Также жалко, что нет точечных карт распространения по территории заповедника каждого вида. Название урочища, где найден тот или иной вид, человеку, который не бывал в заповеднике, ни о чем не говорит, а точка находки, наложенная на карту биотопов, сразу наглядно даст понять его привязку к местности.

Резюмируя, следует сказать, что авторы книги задали очень высокую планку для будущих публикаций по герпетофауне других заповедников и национальных парков нашей страны. Понятно, что ООПТ, в фауне которых есть только единичные виды земноводных и пресмыкающихся, вряд ли смогут создать что-то столь же масштабное. Но у нас в стране есть несколько заповедников, обладающих такой же богатой герпетофауной, а также достаточно заповедников, история существования которых насчитывает много де-

сятилетий, и которые ждут своих исследователей для создания подобных книг.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бобров В.В. Пресмыкающиеся Приокско-Террасного заповедника. Серия: Познавательная серия для детей и взрослых. Всё о Приокско-Террасном государственном природном биосферном заповеднике. Вып. 7. Данки: Биопресс, 2008. Б/с.

Бобров В.В. Герпетологические исследования в заповедниках России: современное состояние и перспективы развития // Соц. эк. технол. 2018. № 3. С. 43–61.

Иваненко А.М., Ковалев В.В. Амфибии и рептилии Кавказского заповедника. Майкоп: НАБУ-Кавказ, 2019. 86 с.

Маслова И.В., Утицких А.С., Пичугина В.Г. Амфибии и рептилии на Земле леопарда. Владивосток: Объединенная дирекция государственного природного биосферного заповедника “Кедровая падь” и национального парка “Земля леопарда”, 2016. 35 с.

### **Book Review: S. V. Ostrovskih, O. N. Byhalova. Amphibians and Reptiles of Nature Reserve “Utrish”. Key. Novorossiysk: Variant, 2022. 160 p. ISSN 978-5-6048605-1-9**

**V. V. Bobrov**

*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow*

*e-mail: vladimir.v.bobrov@gmail.com*

Book review. Advantages and disadvantages are discussed. A high level of presentation of the material, high quality and clarity of illustrations were noted. The book can serve as a model for future similar publications on other reserves.

**Keywords:** amphibians, reptiles, “Utrish” Nature reserve

Свидетельство о регистрации средства массовой информации  
ПИ № ФС 77-66717 от 28 июля 2016 г., выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,  
информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

---

|                    |    |                                            |              |             |
|--------------------|----|--------------------------------------------|--------------|-------------|
| Подписано к печати | г. | Формат 60 × 88 <sup>1</sup> / <sub>8</sub> | Усл. печ. л. | Уч.-изд. л. |
|--------------------|----|--------------------------------------------|--------------|-------------|

|       |      |      |                |
|-------|------|------|----------------|
| Тираж | экз. | Зак. | Цена свободная |
|-------|------|------|----------------|

---

Учредитель: Российская академия наук

---

Издатель: Российская академия наук, 119991 Москва, Ленинский просп., 14  
Исполнитель по контракту № 4У-ЕП-039-24 ФГБУ «Издательство «Наука»  
121099, Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1  
Отпечатано в ФГБУ «Издательство «Наука»  
121099, Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1

**Журналы РАН, выходящие в свет на русском языке**

|                                                                                |                                                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Автоматика и телемеханика                                                      | Лесоведение                                                         |
| Агрохимия                                                                      | Литология и полезные ископаемые                                     |
| Азия и Африка сегодня                                                          | Мембраны и мембранные технологии                                    |
| Акустический журнал                                                            | Металлы                                                             |
| Астрономический вестник. Исследования солнечной системы                        | Микология и фитопатология                                           |
| Астрономический журнал                                                         | Микробиология                                                       |
| Биологические мембраны                                                         | Микроэлектроника                                                    |
| Биология внутренних вод                                                        | Молекулярная биология                                               |
| Биология моря                                                                  | Наука Юга России                                                    |
| Биоорганическая химия                                                          | Нейрохимия                                                          |
| Биофизика                                                                      | Неорганические материалы                                            |
| Биохимия                                                                       | Нефтехимия                                                          |
| Ботанический журнал                                                            | Новая и новейшая история                                            |
| Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук                    | Общественные науки и современность                                  |
| Вестник древней истории                                                        | Общество и экономика                                                |
| Вестник Российской академии наук                                               | Океанология                                                         |
| Вестник российской сельскохозяйственной науки                                  | Онтогенез                                                           |
| Водные ресурсы                                                                 | Палеонтологический журнал                                           |
| Вопросы истории естествознания и техники                                       | Паразитология                                                       |
| Вопросы ихтиологии                                                             | Петрология                                                          |
| Вопросы языкознания                                                            | Письма в Астрономический журнал                                     |
| Вулканология и сейсмология                                                     | Письма в Журнал экспериментальной и теоретической физики            |
| Высокомолекулярные соединения. Серия А                                         | Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования |
| Высокомолекулярные соединения. Серия Б                                         | Почвоведение                                                        |
| Высокомолекулярные соединения. Серия С                                         | Приборы и техника эксперимента                                      |
| Генетика                                                                       | Прикладная биохимия и микробиология                                 |
| Геология рудных месторождений                                                  | Прикладная математика и механика                                    |
| Геомагнетизм и аэрономия                                                       | Природа                                                             |
| Геоморфология и палеогеография                                                 | Проблемы Дальнего Востока                                           |
| Геотектоника                                                                   | Проблемы машиностроения и надежности машин                          |
| Геохимия                                                                       | Проблемы передачи информации                                        |
| Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геокриология                  | Программирование                                                    |
| Государство и право                                                            | Психологический журнал                                              |
| Дефектоскопия                                                                  | Радиационная биология. Радиоэкология                                |
| Дифференциальные уравнения                                                     | Радиотехника и электроника                                          |
| Доклады Российской академии наук. Математика, информатика, процессы управления | Радиохимия                                                          |
| Доклады Российской академии наук. Науки о жизни                                | Расплавы                                                            |
| Доклады Российской академии наук. Науки о Земле                                | Растительные ресурсы                                                |
| Доклады Российской академии наук. Физика, технические науки                    | Российская археология                                               |
| Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах                    | Российская история                                                  |
| Журнал аналитической химии                                                     | Российская сельскохозяйственная наука                               |
| Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова                            | Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова                 |
| Журнал вычислительной математики и математической физики                       | Русская литература                                                  |
| Журнал неорганической химии                                                    | Русская речь                                                        |
| Журнал общей биологии                                                          | Сенсорные системы                                                   |
| Журнал общей химии                                                             | Славяноведение                                                      |
| Журнал органической химии                                                      | Современная Европа                                                  |
| Журнал прикладной химии                                                        | Социологические исследования                                        |
| Журнал физической химии                                                        | Стратиграфия. Геологическая корреляция                              |
| Журнал эволюционной биохимии и физиологии                                      | США и Канада: экономика, политика, культура                         |
| Журнал экспериментальной и теоретической физики                                | Теоретические основы химической технологии                          |
| Записки Российского минералогического общества                                 | Теплофизика высоких температур                                      |
| Земля и Вселенная                                                              | Успехи современной биологии                                         |
| Зоологический журнал                                                           | Успехи физиологических наук                                         |
| Известия Российской академии наук. Механика жидкости и газа                    | Физика Земли                                                        |
| Известия Российской академии наук. Механика твердого тела                      | Физика и химия стекла                                               |
| Известия Российской академии наук. Серия биологическая                         | Физика металлов и металловедение                                    |
| Известия Российской академии наук. Серия географическая                        | Физика плазмы                                                       |
| Известия Российской академии наук. Серия литературы и языка                    | Физикохимия поверхности и защита материалов                         |
| Известия Российской академии наук. Серия физическая                            | Физиология растений                                                 |
| Известия Российской академии наук. Теория и системы управления                 | Физиология человека                                                 |
| Известия Российской академии наук. Физика атмосферы и океана                   | Химическая физика                                                   |
| Известия Российской академии наук. Энергетика                                  | Химия высоких энергий                                               |
| Известия Русского географического общества                                     | Химия твердого топлива                                              |
| Исследование Земли из Космоса                                                  | Цитология                                                           |
| Кинетика и катализ                                                             | Человек                                                             |
| Коллоидный журнал                                                              | Экология                                                            |
| Координационная химия                                                          | Экономика и математические методы                                   |
| Космические исследования                                                       | Электрохимия                                                        |
| Кристаллография                                                                | Энергия: экономика, техника, экология                               |
| Латинская Америка                                                              | Энтомологическое обозрение                                          |
| Лёд и Снег                                                                     | Этнографическое обозрение                                           |
|                                                                                | Ядерная физика                                                      |