

8. Голикова Т.А. Основные тенденции формирования современной русской политической картины мира. // Междунар. науч. жур. «Язык и текст». Т.6. № 3, 2019. 43 - 50 с.

9. Boucher G. The Charmed Circle of Ideology: A Critique of Laclau and Mouffe, Butler and Žižek. Re.Press, 2009. 275 p.

КЛЕТОЧНАЯ ПАРАДИГМА ВЕЧНОСТИ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И НОВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ НАУКИ

И.Д. Волотовский

*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Беларусь*

Какой будет биологическая наука через 25 лет? На какие рубежи выйдет биология? Если бросить ретроспективный взгляд, то мы можем наглядно представить, что произошло с биологией, например, за последние 20 лет. Она радикально изменилась. И это касается в первую очередь физико-химической биологии, изучающей молекулярные, мембранные и клеточные механизмы функционирования биологических систем животного и растительного происхождения и разного уровня организации. Изучено детальное строение и механизмы функционирования большинства внутриклеточных систем, благодаря которым живые организмы функционируют как слаженные четко отрегулированные системы. Расшифрован генетический код. Представлены прорывные разработки, которые рассматриваются в качестве выдающихся достижений биологической науки начала XXI столетия.

Ключевые слова: *биологическая наука; новые достижения; прорывные разработки; наследственные заболевания.*

Прежде чем перейти к изложению моего выступления я хотел бы поблагодарить организаторов семинара за приглашение принять в нем участие. Речь идет о стратегии развития науки Республики Беларусь. Сначала я хотел бы поставить вопрос: «А какой будет биологическая наука через 25 лет?» На какие рубежи выйдет биология? Если бросить ретроспективный взгляд, то мы можем наглядно представить, что произошло с биологией, например, за последние 20 лет. Она радикально изменилась. И это касается в первую очередь физико-химической биологии, изучающей молекулярные, мембранные и клеточные механизмы

функционирования биологических систем животного и растительного происхождения и разного уровня организации. Изучено детальное строение и механизмы функционирования большинства внутриклеточных систем, благодаря которым живые организмы функционируют как слаженные четко отрегулированные системы. Расшифрован генетический код. Получен ответ на вопрос, почему количество генов в геноме человека не превышает 29000, а число белков составляет сотни тысяч, хотя всегда считалось, что существует правило: один ген – кодирует один белок. Можно также перечислить работы, получившие Нобелевские премии за последние 15-20 лет. Например, премия присуждена за открытие явления РНК интерференции. Две премии за работы в области стволовых клеток, эмбриональных и индуцированных плюрипотентных, премии – за установление механизмов апоптоза, за изобретение методов ядерно-магнитного резонанса и магнитно-резонансной томографии. Над стратегией будущего развития нужно еще поработать, ввести в ее те задачи, решение которых потребует разработки принципиально новых подходов.

Теперь я хотел бы перейти к изложению прорывных разработок, которые рассматриваются в качестве выдающихся достижений биологической науки начала XXI столетия. В 2008 г. журнал Science признал генетическое редактирование соматических клеток и превращение их в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (induced pluripotent stem cells) – ИПСК главным научным прорывом года. Этому заявлению, основанному на замечательных научных результатах, предшествовала большая научно-исследовательская работа, связанная с приданием обычным соматическим клеткам организма, например фибробластам, генетических и фенотипических признаков, свойственных эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК). Эмбриональные стволовые клетки, как известно, образуются путем деления внутреннего клеточного материала в бластоцисте, образующейся после оплодотворения яйцеклетки сперматозоидом на ранних стадиях развития зародыша. Оказалось, что первичные зародышевые эмбриональные клетки, получившие название стволовых, могут размножаться в культуре и превращаться (дифференцироваться) в любые клетки всех трех зародышевых листков эмбриона, т. е., обладать свойством плюрипотентности. По мере продвижения процесса эмбриогенеза к своему финишу (образованию структурно сформированного организма) клеточные участники этого процесса снижают уровень своей потентности, т. е. сужают спектр клеточного разнообразия при дифференцировке в ряду: тотипотентность →

плюрипотентность → мультипотентность → бипотентность → унипотентность. Такое поведение, как установили авторы открытия К. Такахаши и С. Яманака основывалось на контроле биосинтетических процессов особыми транскрипционными факторами – регуляторными белками, контролирующими экспрессию генов. В принципе, гены, кодирующие указанные транскрипционные факторы, в геноме клетки представлены, но их экспрессия в реальных условиях функционирования клетки репрессирована. Казалось бы, зная, какие транскрипционные факторы ответственны за дифференцировку клетки, достаточно было снять блок с их экспрессии. Как это сделать Такахаши и Яманака не знали, поэтому они пошли по другому пути, решив ввести в фибробласты мыши с помощью ретровирусных векторов новые экзогенные гены указанных белков, характеризующиеся высокой экспрессией. Так были получены стволовые клетки, которые Такахаши и Яманака называли индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками. Данные клетки имели сходную с ЭСК морфологию, ростовые свойства, экспрессировали типичные для ЭСК маркеры и, самое главное, проявляли плюрипотентность – способность дифференцироваться в любые специализированные клетки организма.

Судя по литературным данным, наиболее популярными соматическими клетками, из которых получают ИПСК, являются фибробласты кожи. Однако получить ИПСК можно из любых соматических клеток, в том числе из мезенхимальных стволовых клеток, кератиноцитов, клеток периферической крови, нейтральных стволовых клеток, гепатоцитов и др. Рассматривая механизмы индукции плюрипотентности в соматической клетке, т. е. превращение ее в подобие ЭСК, нужно ответить на два очень важных вопроса: какие события лежат в основе этого процесса и где они локализованы в клетке. Теперь совершенно ясно, что они протекают на уровне генетического аппарата соматической клетки и заключаются в запуске экспрессии генов факторов, определяющих свойства ЭСК. Методически это происходит в ходе трансфекции соматической клетки четырьмя генами транскрипционных факторов. Под влиянием продуктов этих генов «стирается» программа дифференцировки клетки. Снимаются блоки транскрипции многих генов, которые в реальных условиях специализации не транскрибируются. Чаще всего эти гены вводятся в соматическую клетку с помощью векторов на основе рекомбинантных вирусов (ретровирусов, лентивирусов, аденовирусов, бакуловирусов). Используют также и другие методы доставки генетических конструкций на

основе этих генов – трансфекцию с помощью липидов и катионных полимеров, электропорацию и нуклеофекцию.

При практически полной идентичности свойств ИПСК и ЭСК первые обладают все же одним очень важным преимуществом. ИПСК можно получить из соматических клеток пациентов, т. е. из аутологичного исходного клеточного материала. Этим они обеспечивают пациентоидентичность индуцированных клеток и полное исключение иммунологических конфликтов на уровне клеток, что может иметь место при использовании аллогенных ЭСК. Поэтому в перспективе данный момент представляется важным при использовании ИПСК в персонализированной клеточной терапии.

Где уже используются ИПСК на практике. Они используются при формировании банков индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, создании моделей заболеваний человека, скрининге лекарственных веществ, генетическом редактировании стволовых клеток с целью их применения в генной терапии наследственных заболеваний человека, в том числе для изучения молекулярных и клеточных основ данных заболеваний.

Так, например, возможность дифференцировки ИПСК, полученных от пациентов, в различные типы клеток позволяет использовать их для тестирования лекарственных соединений вместо проведения соответствующих экспериментов на животных. Как уже указывалось выше, ИПСК способны расти неограниченное время в культуре *in vitro*, благодаря чему можно накопить необходимое количество клеточного материала для любых биологических экспериментов, связанных с изучением патогенеза различных наследственных заболеваний человека.

Широкое использование ИПСК в генной терапии сдерживалось рядом объективных причин. На время открытия ИПСК и последующего бума исследований по проблеме индуцированных плюрипотентных стволовых клеток не существовало простой и эффективной технологии редактирования геномов, которая могла бы успешно применяться для корректировки мутаций в генах, удаления из генома дефектных генов или их замены на гены, не несущие в своей структуре какие-либо ошибки.

На данный момент такая технология целевого редактирования геномов разработана. Речь идет о системе CRISPR/Cas9 или, как еще ее называют, в научной среде, Криспер-системе, представляющей собой эффективный и надежный подход для прецизионного изменения генома живой клетки. Технология базируется на бактериальном CRISPR-ассоциированном ферменте – нуклеазе 9 (Cas9) из *Streptococcus pyogenes*. Данная разработка

завершила многолетние попытки исследователей подобраться вплотную к геному клетки и осуществить его редактирование.

Бактерии и археи, не имеют свойственной животным и человеку иммунной защиты. Оказалось, однако, что у бактерий имеется своя, но гораздо более простая система молекулярного иммунитета, обеспечивающая защиту бактериальной клетки от бактериофагов и других патогенов. Еще в 1989 г. японскими исследователями был обнаружен в геноме кишечной палочки участок, содержащий многочисленные палиндромные повторы. Его назвали CRISPR-локусом (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats), что можно перевести на русский язык как «скопление разделенных регулярными промежутками коротких симметричных палиндромных повторов». Структура повторов была идентична по нуклеотидным последовательностям, а вот у промежутков, или спейсеров (от англ. spacer – прокладка), как их теперь называют, она оказалась вариабельной и зачастую была гомологичной нуклеотидным последовательностям, обнаруженным в геномах бактериофагов. По сути дела, оказалось, что спейсер представляет собой генетическую память бактериальной популяции. Другими словами, в спейсерах закладывается на хранение генетическая информация о бактериофагах, с помощью которой «враг» узнается и которая используется бактериями в уникальной системе защиты от губительного действия этих патогенов. В состав защитной системы входят палиндромные повторы, спейсеры и гены специализированных нуклеаз Cas (CRISPR-associated nuclease), в том числе ген нуклеазы Cas9. Возникает вопрос, почему нуклеаза помечена цифрой 9? Действительно, их в бактериальной клетке больше 10, но наиболее подходящей для функционирования Криспер-системы оказалась Cas9. Нуклеаза Cas9 содержит два критических домена: первый, узнающий целевую нуклеотидную последовательность и второй, обладающий нуклеазной активностью. Вместе они осуществляют разрыв двух цепочек ДНК. Если в бактериальную клетку проникает бактериофаг, о котором в геноме бактерии остался след, судьба бактериофага предрешена: с высокой вероятностью он погибает.

Как же устроена система Криспер? В каждом определенном локусе все палиндромные повторы одинаковы по строению и включают в себя от 24 до 35 пар оснований. Длина спейсеров составляет 21–72 пар оснований, они разные и различаются нуклеотидной последовательностью. К CRISPR-локусу примыкает лидерная нуклеотидная последовательность и гены, кодирующие Cas-нуклеазы. Лидерная последовательность выполняет роль

промотора, запускающего транскрипцию CRISPR- локуса. Образовавшаяся в ходе транскрипции длинная РНК получила название пре-crРНК (CRISPR-РНК), а после ее процессинга – просто crРНК. При этом в каждом из их фрагментов системы содержится часть повтора и спейсер. Разрезание двойной нити ДНК осуществляется Cas9 нуклеазой под контролем некодирующих РНК: crРНК и tracrРНК. Комплекс crРНК-tracrРНК-Cas9 и есть основное оружие защитной «иммунной» системы бактерий. При создании генетических конструкций, экспрессирующих компоненты CRISPR-Cas9, используются химерные молекулы crРНК и tracrРНК, называемые РНК-гидом (single guide RNA – sgRNA). Специфичность действия CRISPR-Cas9 и зависит от наличия короткой нуклеотидной последовательности спейсера, входящего в состав crРНК бактерии или искусственной sgRNA.

Благодаря спейсерным участкам в ДНК бактериофага узнаются комплементарные им целевые нуклеотидные последовательности, после чего активированные Cas9-нуклеазы расщепляют ДНК. По сути дела, crРНК и tracrРНК выполняют роль прецизионного путевода нуклеазы Cas9 в «море» нуклеотидных последовательностей ДНК фага. После деградации ДНК каждого нового бактериофага, с которым столкнулась бактерия, ее фрагмент вставляется в качестве спейсера в Криспер-систему этой бактерии, т. е. Криспер-кассета удлиняется, пополняя бактериальный банк новой информацией. Для успешной реализации действия системы Криспер важную роль играет еще один генетический компонент – PAM (protospacer adjacent motif). Это короткая нуклеотидная последовательность, состоящая из 3 нуклеотидов, и локализованная непосредственно после сайта-мишени. Каноническая последовательность PAM – это 5-NGG-3, где N – любой нуклеотид. PAM специфичен для конкретного вида бактерий. Только при наличии PAM комплекс crРНК-tracrРНК-Cas9 распознает мишень и «разрезает» ДНК.

В 2012 г. появились первые публикации, в которых было описано применение системы. Оказалось, что компоненты системы Криспер можно адаптировать к другим геномам, введя ее в эукариотические клетки, в которых она будет работать по «навязанной» ей программе. Можно при этом с высокой точностью найти в геноме любую нуклеотидную последовательность. Например, в геноме человека насчитывается 3,2 млрд пар нуклеотидов, и на этой протяженности можно разрезать двуспиральную нить ДНК в конкретном месте, удалить или подправить «испорченный» ген, или вставить вместо него другой.

На многих примерах показано, что данный модифицированный генно-инженерный подход высокоэффективен при редактировании геномов микроорганизмов, животных и человека. При этом следует подчеркнуть главное – за определение целевой нуклеотидной последовательности в Криспер-системе отвечает небольшой участок РНК-гида, комплементарный всего лишь 20 нуклеотидам ДНК-мишени.

Каким же образом после элиминации дефекта в определенном гене и всего дефектного гена можно восстановить исходную, но уже отредактированную нуклеотидную последовательность участка ДНК? Здесь может быть, несколько вариантов, среди которых ключевое место занимают воссоединение негомологичных концов (NHEJ, от англ. non-homologous and joining) или гомологичная репарация (HDR, от англ. homology-directed repair).

Прогресс биологической науки открыл совершенно неожиданные перспективы использования Криспер-системы для решения проблемы наследственных заболеваний. При изучении того или иного наследственного заболевания обычно сталкиваются с одной непреодолимой трудностью, связанной с его экспериментальным моделированием. Как оказалось, многочисленные экспериментальные модели заболеваний на животных не воспроизводят всего комплекса генетических и фенотипических особенностей заболевания у человека. Можно думать, что система Криспер окажется очень полезной при моделировании наследственных заболеваний и в первую очередь редко встречающихся в человеческой популяции. Можно ввести в геном мыши ошибки, с которыми связано заболевание и получить его чистый вариант. После этого открывается перспектива подбора лекарства для лечения наследственного заболевания. Экспериментальные модели полигенных заболеваний, созданные с помощью Криспер-системы, дают возможность определить, нокаут каких генов приводит к тем или иным фенотипическим изменениям в клетках, как из клеток формируются разнообразные ткани с различным генетическим фоном и какие молекулярные события происходят при развитии патологического процесса. На основании этих данных разрабатываются программы создания целых органов. Также с помощью Криспер-системы можно проводить в геноме коррекцию мутаций, обуславливающих различные наследственные заболевания, например муковисцидоз, миодистрофию Дюшена, гемофилию, серповидноклеточную анемию и др. [30]. Для коррекции мутаций, которые являются причиной

заболевания, используют как соматические, так и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека.

Как я уже упоминал выше, ИПСК могут быть получены из любой соматической клетки больного наследственным заболеванием. После индукции плюрипотентности эти клетки можно дифференцировать в различном направлении, т. е. превратить в любую клетку организма. Иными словами, в нашем распоряжении может оказаться универсальная модельная система, с помощью которой можно анализировать патогенез конкретного наследственного заболевания и отрабатывать тактику его лечения, то есть исправлять генетические дефекты в модели *in vitro* и использовать полученную информацию при разработке методов терапии заболевания.

Главное преимущество этого подхода заключается в том, что он позволяет исключить вклад в получаемые результаты генетического полиморфизма, свойственного любому организму. Криспер-система открыла широкие перспективы в решении вопросов повышения результативности генной терапии при лечении наследственных и приобретенных социально-значимых заболеваний человека.

Изобретение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и Криспер-системы – это выдающееся достижение биологической науки, развивающейся в тесном сопряжении с медициной, и существенный прорыв в системе наших знаний, значимость которого становится все более очевидной. Можно не сомневаться, что начавшаяся массированная атака на наследственные заболевания человека в ближайшие годы принесет положительные результаты.

КРИЗИС ТЕХНОГЕННОЙ ЦИВИЛИЗАЦИИ: БУДУЩЕЕ КАК ВЫЗОВ

П.А. Водопьянов

*Белорусский государственный технологический университет,
Ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Беларусь*

Рассмотрен комплекс глобальных проблем современности. Это касается промышленного развития, бережного сохранения природных невозобновляемых ресурсов. Первая четверть XXI века в мире характеризуется глобальной нестабильностью. Отмечается экспоненциальный рост численности населения, недостаток природных ресурсов и жизненного пространства, загрязнение