

TISSUE AND ORGAN REGENERATION

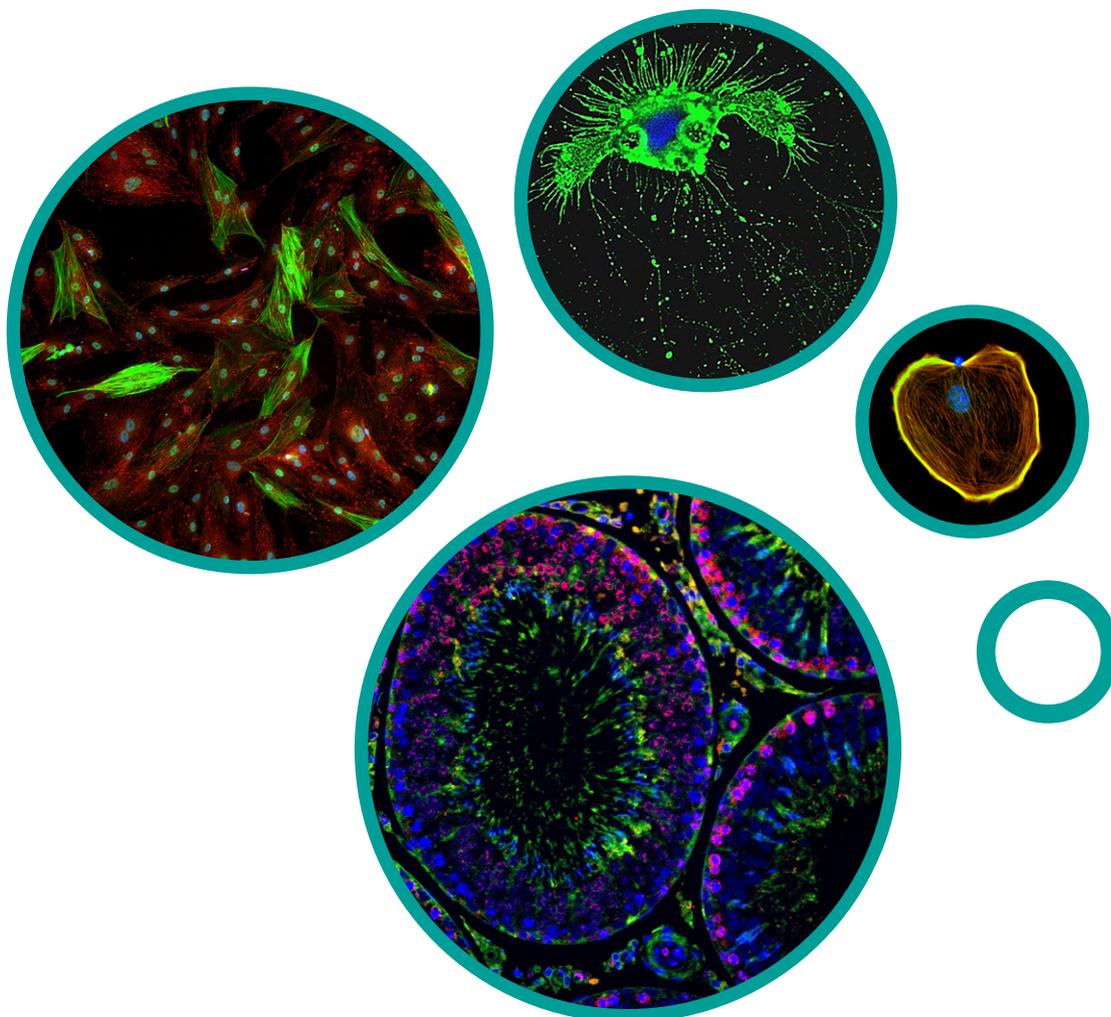
РЕГЕНЕРАЦИЯ

органов и тканей

Регенеративная биомедицина Евразии

1

Том (Vol.) 2
2024



ОБЩЕСТВО
РЕГЕНЕРАТИВНОЙ
МЕДИЦИНЫ

ISSN 2949-5938

Цели и задачи

Ключевой задачей журнала является создание площадки для освещения и диалога об основных достижениях, проблемах и задачах регенеративной биомедицины, а также обобщение современных представлений о фундаментальных механизмах регенерации тканей и органов.

Концепция журнала предусматривает всестороннее освещение вопросов, связанных с выяснением механизмов регенерации и обновления тканей, а также с возможностью разработки и практического применения подходов регенеративной биомедицины. Важным аспектом также является формирование и развитие этой отрасли науки как самостоятельного направления на стыке физиологии, клеточной биологии, биологии развития, биохимии и наук о материалах.

Главный редактор

В.А. Ткачук, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, декан Факультета фундаментальной медицины, директор Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5515-4266

Заместитель главного редактора

П.И. Макаревич, канд. мед. наук, заведующий лабораторией генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 7259-9180

Редактор выпуска

В.А. Ткачук, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, декан Факультета фундаментальной медицины, директор Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5515-4266

Редакционная коллегия

В.В. Белоусов, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, генеральный директор ФБГУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 6517-8373

Л.Б. Буравкова, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заместитель директора по научной работе ФГБУ «ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 8594-2532

Д.В. Бутнару, канд. мед. наук, доцент, проректор по международной деятельности, заместитель директора по научной работе ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2408-5133

М.В. Воронцова, канд. мед. наук, заместитель декана по науке Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 4168-6851

Е.А. Воротеляк, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, руководитель лаборатории клеточной биологии ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2310-9118

М.М. Галагудза, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия) eLibrary SPIN: 2485-4176

И.И. Еремин, канд. мед. наук, заместитель директора по научной работе ФГБУН «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 6098-7226

А.Ю. Ефименко, канд. мед. наук, заведующий лабораторией репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5110-5998

М.Н. Карагяур, канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9504-4257

М.А. Лагарькова, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, генеральный директор ФГБУ «ФНКЦ физико-химической медицины им. акад. Ю.М. Лопухина ФМБА России» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 4315-1701

М.А. Масчан, д-р мед. наук, профессор, заместитель генерального директора-директор Института молекулярной и экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия) Scopus Author ID: 562880

К.А. Рубина, д-р биол. наук, профессор РАН, руководитель лаборатории морфогенеза и репарации тканей Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9471-2511

Е.В. Семина, д-р биол. наук, заместитель руководителя по развитию и проектной деятельности ОНК «Институт медицины и наук о жизни» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» (Калининград, Россия) eLibrary SPIN: 4586-4001

В.И. Севастьянов, д-р мед. наук, профессор, директор АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2895-1090

Н.С. Сергеева, д-р биол. наук, профессор, заведующая отделением прогноза эффективности консервативного лечения МНИОИ имени П.А. Герцена — филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 1805-8141

О.В. Степанова, канд. биол. наук, руководитель лаборатории клеточной биологии и регенеративной медицины отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 8229-8935

А.Н. Томилин, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, директор ФГБУН Институт цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия) eLibrary SPIN: 8079-5581

Редакционный совет

А.В. Васильев, д-р биол. наук, профессор, чл.-корр. РАН, директор ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 7050-9087

В.В. Власов, д-р хим. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН» (Новосибирск, Россия) eLibrary SPIN: 6416-3640

С.В. Готье, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5969-5749

Н.И. Дризе, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией физиологии кроветворения ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 1705-2900

С.М. Закиян, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией эпигенетики развития ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск, Россия) eLibrary SPIN: 7274-2622

А.Д. Каприн, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 1759-8101

С.А. Лукьянов, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, Ректор ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2920-8861

Е.В. Парфенова, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, Заместитель генерального директора — директор НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9042-7848

Г.Т. Сухих, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9374-5710

В.П. Чехонин, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заведующий отделом медицинских нанобиотехнологий НИИ трансляционной медицины ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 8292-2807

Е.Л. Чойнзонов, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» (Томск, Россия) eLibrary SPIN: 2240-8730

Е.В. Шляхто, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия) eLibrary SPIN: 6679-7621

К.Н. Ярыгин, д-р биол. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заведующий лабораторией клеточной биологии ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 7567-1230

Периодичность	выходит 4 раза в год
Префикс DOI	https://doi.org/10.60043
ISSN	2949-5938
Свидетельство о регистрации средства массовой информации	Серия Эл № ФС77-83582 от 13 июля 2022 г. выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
Учредитель, издатель, редакция	Региональная общественная организация «Общество регенеративной медицины» (ОГРН 1187700008165)
Адрес	119991, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 27, к. 1
Телефон редакции	+7 (999) 922-41-19
Сайт	https://regmed-journal.ru/
e-mail	journal@regmedru.com
Выход в свет	31.03.2024
Копирайт	© Региональная общественная организация «Общество регенеративной медицины», оформление, 2024
Журнал открыт для ознакомления на сайте	https://regmed-journal.ru
Цена	распространяется бесплатно
Условия распространения материалов:	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.
Редакторы-корректоры	И.С. Пигулевская, Л.А. Зелексон
Верстка	О.В. Храмова

В оформлении обложки использованы микрофотографии, полученные д.б.н. Е.В. Семиной и к.б.н. Н.А. Басаловой.

Aims and scope

The key objective of the journal is to create a platform for coverage and dialogue about the main achievements, problems and tasks of regenerative biomedicine, as well as to summarize modern ideas about the fundamental mechanisms of tissue and organ regeneration.

The concept of the journal provides comprehensive coverage of issues related to elucidating the mechanisms of tissue regeneration and renewal, as well as the possibility of developing and practical application of regenerative biomedicine approaches. An important aspect is also the formation and development of this branch of science as an independent direction at the intersection of physiology, cell biology, developmental biology, biochemistry and materials sciences.

Editor-in-Chief

Vsevolod A. Tkachuk, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Dean of Faculty of medicine, Director of Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5515-4266

Deputy Editor-in-Chief

Pavel I. Makarevich, MD, PhD, Head of the Laboratory of Gene and Cell Therapy, Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 7259-9180

Editor of the Issue

Vsevolod A. Tkachuk, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Dean of Faculty of medicine, Director of Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5515-4266

Editorial board

Vsevolod V. Belousov, D.Sc., Corresponding Member of RAS, General Director of the Federal Center for Brain and Neurotechnologies FMBA of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 6517-8373

Lyudmila B. Buravkova, D.Sc., Professor, Corresponding Member of RAS, Deputy Director, Institute of Medical and Biological Problems of RAS (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 8594-2532

Denis V. Butnaru, MD, PhD, Associate Professor, Vice-Rector for International Affairs, Deputy Director for Scientific Work of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Ministry of Health of Russia (Sechenov University), (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2408-5133

Maria V. Vorontsova, MD, PhD, Deputy Dean for Science, Faculty of Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 4168-6851

Ekaterina A. Vorotelyak, D.Sc., Corresponding Member of RAS, Head of the laboratory of cell biology of the Federal State Budgetary Institution Institute of Developmental Biology named after N.K. Koltsov of RAS (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2310-9118

Mikhail M. Galagudza, D.Sc., Professor, Corresponding Member of RAS, Director of the Institute of Experimental Medicine of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center named after V. A. Almazov, Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia) eLibrary SPIN: 2485-4176

Ilya I. Eremin, MD, PhD, Deputy Director for Scientific Work of the Federal State Budgetary Institution Russian Scientific Center for Chemistry named after Academician B.V. Petrovsky (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 6098-7226

Anastasia Yu. Efimenko, MD, PhD, Head of the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration, Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5110-5998

Maxim N. Karagyaur, MD, PhD, Associate Professor of the Department of Biochemistry and Regenerative Medicine, Faculty of Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9504-4257

Maria A. Lagarkova, D.Sc., Corresponding Member of RAS, Director General of the Federal State Budgetary Institution Federal Research Center for Physical and Chemical Medicine, Federal Medical and Biological Agency (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 4315-1701

Mikhail A. Maschan, MD, D.Sc., Professor, Deputy Director General, Director of the Institute of Molecular and Experimental Medicine of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) Scopus Author ID: 562880

Ksenia A. Rubina, D.Sc., Professor of RAS, Head of the Laboratory of Morphogenesis and Tissue Reparation, Faculty of Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9471-2511

Ekaterina V. Semina, D.Sc., Deputy Head for Development and Project Activities at the Institute of Medicine and Life Sciences, Immanuel Kant Baltic Federal University (Kaliningrad, Russia) eLibrary SPIN: 4586-4001

Viktor I. Sevastyanov, D.Sc., Professor, Director of the Institute of Biomedical Research and Technology (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2895-1090

Natalya S. Sergeeva, D.Sc., Professor, Head of the Department of Prediction of the Effectiveness of Conservative Treatment, Moscow Research Institute named after P.A. Herzen — branch of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 1805-8141

Olga V. Stepanova, PhD, Head of the Laboratory of Cell Biology and Regenerative Medicine, Department of Fundamental and Applied Neurobiology Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology named after V.P. Serbsky, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 8229-8935

Alexei N. Tomilin, D.Sc., Corresponding Member of RAS, Director of the Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Cytology RAS (Saint Petersburg, Russia) eLibrary SPIN: 8079-5581

Editorial Council

Andrey V. Vasiliev, D.Sc., Professor, Corresponding Member of RAS, Director of the Federal State Budgetary Institution Institute of Developmental Biology named after N.K. Koltsov RAS (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 7050-9087

Valentin V. Vlasov, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Scientific Director of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of SB RAS (Novosibirsk, Russia) eLibrary SPIN: 6416-3640

Sergey V. Gauthier, MD, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Director of the National Medical Research Center for Transplantation and Artificial Organs named after Academician V.I. Shumakov, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5969-5749

Nina I. Drize, D.Sc., Professor, Head of the Laboratory of Physiology of Hematopoiesis, National Medical Research Center of Hematology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 1705-2900

Suren M. Zakiyan, D.Sc., Professor, Head of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SB RAS (Novosibirsk, Russia) eLibrary SPIN: 7274-2622

Andrey D. Kaprin, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Director General of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 1759-8101

Sergey A. Lukyanov, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Rector of the Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2920-8861

Yelena V. Parfyonova, D.Sc., Professor, Corresponding Member of RAS, Deputy General Director – Director of the Research Institute of Experimental Cardiology, Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Cardiology named after Academician E.I. Chazov of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9042-7848

Gennady T. Sukhikh, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Director of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9374-5710

Vladimir P. Chekhonin, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Head of the Department of Medical Nanobiotechnologies, Research Institute of Translational Medicine, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 8292-2807

Evgeny L. Choinzonov, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Director of the Oncology Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia) eLibrary SPIN: 2240-8730

Evgeny V. Shlyakhto, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Director General of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center named after V.A. Almazov, Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia) eLibrary SPIN: 6679-7621

Konstantin N. Yarygin, D.Sc., Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Laboratory of Cell Biology, Research Institute of Biomedical Chemistry named after V.N. Orekhovich (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 7567-1230

Frequency	quarterly
DOI Prefix	https://doi.org/10.60043
ISSN	2949-5938
Certificate and Registry	Certificate of mass media registration series EI No. FS77-83582 dated July 13, 2022 issued by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Communications (Roskomnadzor)
Founder, publisher, editorial office	Regional public organization “Society of Regenerative Medicine” (OGRN 1187700008165)
Address	119991, Moscow, Lomonosovsky Prospekt, 27, building 1
Editorial phone	+7 (999) 922-41-19
Website	https://regmedjournal.ru/
e-mail	journal@regmedru.com
The publication	31.03.2024
Copyright	© Regional public organization “Society of Regenerative Medicine”, layout, 2024
Online open access:	https://regmed-journal.ru
Price	free
Distribution	The content is distributed under the Creative Common License CC BY
Editors and proofreaders	Irina S. Pigulevskaya, Lev A. Zelexon
Layout	Olga V. Khramova

- 6** **ОТ РЕДАКЦИИ**
Программа развития научно-практического журнала «Регенерация органов и тканей»
П.И. Макаревич, Е.В. Тарасова, А.Ю. Ефименко, Ж.А. Акопян, В.А. Ткачук
- 16** **ОБЗОРЫ И КОММЕНТАРИИ**
Метод Golden gate в биологии и медицине
М.И. Антипина, В.А. Ли, Е.Е. Попова, Е.В. Семина
- 29** **РЕВЬЮ И КОММЕНТАРИИ**
Методы экстракции морского коллагена для решения задач регенеративной медицины
Ю.В. Куликова, С.А. Сухих, О.О. Бабич
- 46** **ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ЛАНДШАФТ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ**
Эпиморфная регенерация дистальной фаланги пальца у млекопитающих
Ю.Г. Антропова, Р.Ю. Еремичев, П.И. Макаревич, Н.И. Калинина
- 54** **ТЕХНОЛОГИИ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ**
Genome editing technologies and prospects for their use in biomedicine
М.Н. Карагяур, А.Л. Примак, С.С. Джауари, К.Д. Бозов, Ю.В. Макусъ
- EDITORIAL**
Development program of the scientific journal "Tissue and organ regeneration"
Pavel I. Makarevich, Elena V. Tarasova, Anastasia Yu. Efimenko, Zhanna A. Akopyan, Vsevolod A. Tkachuk
- REVIEWS AND COMMENTS**
Golden gate method in biology and medicine
Maria I. Antipina, Vladislav A. Li, Elizaveta E. Popova, Ekaterina V. Semina
- REVIEW AND COMMENT**
Marine collagen extraction methods for solving regenerative medicine problems
Yuliya V. Kulikova, Stanislav A. Sukhikh, Olga O. Babich
- THE EDUCATIONAL LANDSCAPE OF REGENERATIVE MEDICINE**
Epimorphic regeneration of mammalian digit tip
Julia G. Antropova, Roman Yu. Eremichev, Pavel I. Makarevich, Natalia I. Kalinina

Программа развития научно-практического журнала «Регенерация органов и тканей»

П.И. Макаревич^{1,2}, Е.В. Тарасова^{1,2}, А.Ю. Ефименко^{1,2}, Ж.А. Акопян^{1,2}, В.А. Ткачук^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
119234, Москва, Ленинские горы, 1, Россия

² РОО «Общество регенеративной медицины», 119192 Москва, Ломоносовский проспект,
27, к. 1, Россия

Адрес для корреспонденции: ETarasova@mc.msu.ru

Аннотация

В статье описаны предпосылки и опыт создания, а также современный этап развития нового отечественного научно-практического журнала «Регенерация органов и тканей», определено его место в публикационном ландшафте в России, обоснована необходимость разработки программы развития журнала как необходимого этапа для повышения качества содержания издания и его представленности в академическом сообществе. Реализация предлагаемой программы, на наш взгляд, будет способствовать оптимизации и повышению эффективности деятельности редколлегии по дальнейшему научно-му развитию издания, что в перспективе позволит ему войти в российские и международные наукометрические базы.

Ключевые слова: научная периодика, научная коммуникация, регенеративная медицина, регенерация органов и тканей, программа развития научного журнала, наука, наукометрия

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Макаревич П.И., Тарасова Е.В., Ефименко А.Ю., Акопян Ж.А., Ткачук В.А. Программа развития научно-практического журнала «Регенерация органов и тканей». *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(1):6–15. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-6-15>

Поступила 01.03.2024

Обработана 18.03.2024

Принята к публикации 29.03.2024

Development program of the scientific journal "Tissue and organ regeneration"

Pavel I. Makarevich^{1,2}, Elena V. Tarasova^{1,2}, Anastasia Yu. Efimenko^{1,2},
Zhanna A. Akopyan^{1,2}, Vsevolod A. Tkachuk^{1,2}

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Leninskie Gory, 1, Russia 119234

² Society for regenerative medicine, Moscow, Lomonosovsky prospect 27, b.1, Russia 119192

Correspondence address: ETarasova@mc.msu.ru

Abstract

The article describes the prerequisites and experience of creation, as well as the current stage of development of the new scientific journal "Tissue and Organ Regeneration", determines its place in the publication landscape in Russia, justifies the need to develop a program for the development of the journal as a necessary stage for improving the quality of the content of the journal and its representation in the academic community.

The implementation of the proposed program, in our opinion, will help optimize and increase the efficiency of the editorial board's activities for the further scientific development of journal, and in the future will allow it to be included in Russian and international scientometric databases.

Keywords: scientific periodicals, scientific communication, regenerative medicine, tissue and organ regeneration, scientific journal development program, science; scientometrics

Conflict of interests: the authors declare no conflict of interests.

For citation: Makarevich P.I., Tarasova E.V., Efimenko A.Yu., Akopyan Zh.A., Tkachuk V.A. Development program of the scientific journal "Tissue and organ regeneration". *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(1):6-15. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-6-15>

Received 01.03.2024

Revised 18.03.2024

Accepted 29.03.2024

Введение

Регенеративная биомедицина представляет собой принципиально новое направление современной медицинской науки, в рамках которого разрабатываются различные подходы к лечению и профилактике заболеваний с помощью стимуляции эндогенных процессов регенерации или трансплантации клеток, а также тканеинженерных конструкций для восстановления утраченной структуры и функции органов и тканей. Данная отрасль науки является одним из приоритетных направлений, предусмотренных Стратегией научно-технологического развития Российской Федерации, утвержденной Указом Президента РФ от 28.02.2024 (п. 21): «Переход к персонализированной, предиктивной и профилактической медицине, высоко-

технологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных) и использования генетических данных и технологий».

Развитие регенеративной биомедицины и создание новых технологий лечения и профилактики социально значимых или неизлечимых заболеваний влечет за собой прорывы во многих сферах человеческой деятельности, включая здравоохранение, образование, промышленность и обеспечение безопасности страны. В России исследования в области регенеративной биомедицины опираются на результаты работ в области биологии развития, клеточной

и молекулярной биологии, физиологии и биохимии. По сравнению с мировыми исследованиями и клиническим опытом в России регенеративная биомедицина представляет собой относительно новую область научных и трансляционных исследований, серьезный интерес к которой появился всего 10–15 лет назад.

За данный период регенеративная биомедицина в России получила свою законодательную базу, началось формирование профессионального сообщества. Можно выделить несколько ключевых событий, которые предопределили направления развития регенеративной биомедицины в нашей стране.

- В 2016 году был принят Федеральный закон № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».
- В 2018 году было создано Общество регенеративной медицины, объединившее ученых и клиницистов, которые исследуют фундаментальные механизмы регенерации тканей и органов.
- В 2019 году впервые прошли выборы в Российскую академию наук по новой специальности «Клеточная биология и регенеративная медицина», что свидетельствовало о признании учеными нового раздела биомедицинской науки.
- В 2021 году состоялось заседание Президиума РАН, в ходе которого Президиум постановил считать регенеративную биомедицину важнейшим направлением современной медицинской науки, заслуживающей специальной поддержки на уровне РАН, Минздрава России и высшей школы РФ. Было рекомендовано создавать профильные научно-медицинские учреждения, а также готовить специалистов в этой области в нашей стране.
- С 2022 года в рамках Федерального проекта «Медицинская наука для человека» Министерство здравоохранения Российской Федерации ведет финансирование разработок клеточных продуктов и продуктов тканевой инженерии, а также лекарственных препаратов, основанных на клеточных технологиях.

Включение этих разработок в федеральный проект стало уникальным прецедентом и будет способствовать увеличению эффективности

внедрения фундаментальных и прикладных научных исследований в области регенеративной биомедицины, что неизбежно приведет к увеличению количества научных публикаций. В ответ на данную потребность Общество регенеративной медицины в 2022 году создало профильный журнал «Регенерация органов и тканей», нацеленный на публикацию научных статей, представляющих результаты исследований и разработок новейших технологий клеточной терапии, тканевой инженерии, редактирования генома, генной терапии и фундаментальных механизмов регуляции регенеративных процессов. Формирование программы развития журнала является необходимым этапом и позволит научному изданию своевременно войти в российские наукометрические базы, а со временем и в международные, тем самым увеличив свой научный рейтинг и привлекательность для ученых.

Публикационный ландшафт в области регенеративной биомедицины

В публикационном поле позиции российской науки значительно улучшились, однако отставание от ведущей пятерки стран отражает недостаточную конкурентоспособность большинства исследований. Так, пятерка ведущих стран по числу публикаций в области регенеративной биомедицины, согласно данным базы индексирования Scopus, выглядит следующим образом: США (119 986), Китай (77 730), Германия (29 981), Великобритания (29 411) и Япония (28 092). Российская Федерация в этом списке занимает 17-е место с 7295 публикациями, уступая Южной Корее, Ирану, Бразилии и Индии.

Развитие российских научных журналов является критическим аспектом обеспечения научно-технологического суверенитета страны. В настоящее время в России существует небольшое количество узкопрофильных журналов, где ученые, работающие в области регенеративной биомедицины, могут опубликовать результаты своих исследований наряду с исследованиями смежных тематик (табл.). Учитывая невысокую периодичность этих журналов и конкуренцию с другими научными тематиками, для развития и становления отрасли необходимо создание и развитие журналов, нацеленных всецело на публикацию исследований в области регенеративной биомедицины.

Таблица. Перечень журналов, принимающих к публикации статьи с результатами исследований в области регенеративной биомедицины

№	Название журнала	Профиль журнала	Периодичность	Индексация*
1	Acta Naturae https://actanaturae.ru/2075-8251/index	Миссия журнала – представить научные работы и открытия в области молекулярной биологии, биохимии, биомедицинских дисциплин и биотехнологии. Acta Naturae также является периодическим изданием для тех, кому интересны различные аспекты биотехнологического бизнеса, инновации в области фармацевтики, защита интеллектуальной собственности и социальные последствия научного прогресса. В журнале публикуются аналитические обзоры, ориентированные на развитие различных сфер современной науки и техники.	4 выпуска в год	Ядро РИНЦ, SCOPUS (переводная версия), Web of Science (переводная версия)
2	Архив патологии https://www.mediasphera.ru/journal/arkhiv-patologii?ysclid=lvf99fzl5j951532536	В журнале публикуются оригинальные исследования по актуальным вопросам патологической анатомии и общей патологии, освещающие важнейшие положения теории и практики различных болезней человека (онкология, инфекционные болезни, заболевания сердца и сосудов, нефропатология, профессиональная патология, гастроэнтерология и др.), а также экспериментальной и географической патологии	6 выпусков в год	Ядро РИНЦ, SCOPUS
3	Биологические мембраны https://sciencejournals.ru/journal/biomem/	Публикуются как оригинальные экспериментальные и теоретические работы, так и обзоры, в которых освещаются физико-химические аспекты мембранной и клеточной биологии: молекулярные механизмы мембранного транспорта, рецепторные системы и внутриклеточная сигнализация, клеточные функции и патологии, ассоциированные с клеточными мембранами, а также фундаментальные исследования биомедицинского характера, в том числе посвященные мембранным аспектам физиологии, фармакологии, иммунологии	6 выпусков в год	Ядро РИНЦ, Web of Science, SCOPUS
4	Биомедицинская химия http://pbmc.ibmc.msk.ru/ru/journal-ru/	Журнал публикует работы на русском и английском языках по всем разделам биомедицинской химии и смежным дисциплинам, включая геномику, транскриптомику, протеомику, метаболомику, биоинформатику, энзимологию, молекулярную биологию, биохимическую фармакологию, молекулярную и клеточную медицину, клиническую биохимию и др.	6 выпусков в год	Ядро РИНЦ, SCOPUS
5	Биофармацевтический журнал https://submit.biopharmj.ru/	Журнал освещает следующие темы: <ul style="list-style-type: none"> • фундаментальные исследования в биофармацевтике; • биофармпрепараты (рекомбинантные терапевтические белки, вакцины, белки плазмы крови, терапевтические моноклональные антитела); • биотехнология гено-инженерных эукариотических и прокариотических продуцентов; • технологические методы и аппаратное оформление процессов в биофармацевтике (культивирование, сепарация, хроматография, ультра- и микрофильтрация и т.д.); • особенности методов контроля качества биофармацевтических лекарственных препаратов (постатный контроль и контроль качества конечного продукта); 	6 выпусков в год	РИНЦ

Продолжение таблицы

№	Название журнала	Профиль журнала	Периодичность	Индексация*
		<ul style="list-style-type: none"> • специфика разработки технологий производства готовых лекарственных форм (ГЛФ) в биофарме; • особенности доклинической и клинической оценки эффективности и безопасности биофармпрепаратов; • интеллектуальная собственность; • экономика и менеджмент; • подготовка кадров (включая постдипломное образование); • практическое применение биофармацевтической продукции; • стандартизация биофармацевтических продуктов, регистрация импортных и отечественных биофармпрепаратов в РФ 		
6	Биохимия https://biochemistrymoscow.com/	В журнале публикуются исследования по всем областям биохимии, а также исследования по биохимическим аспектам молекулярной биологии, биоорганической химии, микробиологии, иммунологии, физиологии и биомедицинских наук	12 выпусков в год	Ядро РИНЦ, SCOPUS (переводная версия), Web of Science (переводная версия)
7	Бюллетень экспериментальной биологии и медицины http://iramn.ru/journals/bbm/about-bbm/?ysclid=lvhu1svs5f716495731	Журнал публикует статьи по следующим направлениям: <ul style="list-style-type: none"> • физиология; • общая патология и патологическая физиология; • биофизика и биохимия; • фармакология и токсикология; • новые лекарственные препараты; • иммунология и микробиология; • аллергология; • вирусология; • генетика; • онкология; • экология; • экспериментальные методы — клинике; • биотехнологии; • биогеронтология; • приматология; • спортивная медицина; • экспериментальная биология; • морфология и патоморфология; • методики 	12 выпусков в год	Ядро РИНЦ, SCOPUS (переводная версия), Web of Science (переводная версия)
8	Вестник трансплантологии и искусственных органов https://journal.transpl.ru/vtio	В журнале публикуются обзорные и оригинальные статьи по фундаментальным и прикладным проблемам трансплантологии, а также исследования, посвященные разработке, экспериментальному изучению и клиническому применению искусственных органов, биогибридных систем и материалов, информация о наиболее значимых научно-практических событиях в этой области	4 выпуска в год	Ядро РИНЦ, Web of Science, SCOPUS
9	Гены и клетки https://genescells.ru/2313-1829/index	Миссия журнала — на регулярной основе информировать биомедицинское научное сообщество о передовых исследованиях и достижениях в области генных и клеточных технологий, биоматериалов, фундаментальных медицинских дисциплин, тканевой инженерии и регенеративной медицины, гарантируя качество и обеспечивая доступность публикуемых данных для широкой аудитории читателей различных специальностей	4 выпуска в год	ядро РИНЦ, SCOPUS

Окончание таблицы

№	Название журнала	Профиль журнала	Периодичность	Индексация*
10	Клеточные технологии в биологии и медицине http://iramn.ru/journals/ktbm/issues/	В журнале помещаются плановые работы научно-исследовательских учреждений в виде оригинальных сообщений по актуальным вопросам биологии и медицины, содержащих новые существенные научные результаты	4 выпуска в год	Ядро РИНЦ, SCOPUS (переводная версия), Web of Science (переводная версия)
11	Морфология https://journals.eco-vector.com/1026-3543?ysclid=lvhu4qrpdy608948245	Тематики публикуемых статей: • клеточная биология, биология развития, эмбриология; • анатомия человека; • патологическая анатомия; • патология животных, морфология, физиология, • фармакология и токсикология	4 выпуска в год	Ядро РИНЦ
12	Онтогенез http://ontogenez.org/?ysclid=lvds046ou082738774	Журнал публикует экспериментальные, теоретические и обзорные статьи, посвященные исследованию механизмов индивидуального развития, дифференцировки и роста. Особое внимание уделяется исследованиям механизмов эмбрионального и постэмбрионального развития в норме и при патологии, выполненным на молекулярном, клеточном, тканевом и организменном уровнях	6 выпусков в год	Ядро РИНЦ, Web of Science (переводная версия)
13	Персонализированная медицина https://persmed.elpub.ru/jour	Журнал посвящен таким актуальным темам медицины, как генетические риски и причины заболеваний, эпигенетика, биомаркеры болезни и здоровья, микробиота и антимикробная терапия, таргетная терапия заболеваний, фармакогенетика и фармакогеномика, геномная терапия и технологии редактирования генома, искусственный интеллект и машинное обучение как инструмент персонализированной медицины	6 выпусков в год	Нет
14	Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова https://rusjphysiol.org/index.php/rusjphysiol	Журнал публикует работы по всем разделам физиологии и физиологическим аспектам смежных наук: зоологии, анатомии, гистологии, эмбриологии, молекулярной биологии, биохимии	12 выпусков в год	Ядро РИНЦ
15	Современные технологии в медицине http://www.stm-journal.ru/ru	Журнал публикует статьи по следующим направлениям: • Биомедицина; • биофизика; • генетика, клеточные технологии; • лучевая диагностика и лучевая терапия; • лечение и диагностика внутренних органов; • молекулярная хирургия; • нейробиотехнологии; • нейрофизиология; • реконструктивная хирургия; • трансплантология; • эндоваскулярная хирургия; • искусственный интеллект в диагностике и лечении	6 выпусков в год	Ядро РИНЦ, Web of Science, SCOPUS
16	Терапевтический архив https://ter-arkhiv.ru/0040-3660/index	Журнал публикует статьи по всем проблемам заболеваний внутренних органов, а также по смежным с другими медицинскими специальностями проблемам	12 выпусков в год	Ядро РИНЦ, Web of Science, SCOPUS
17	Цитология http://tsitologiya.incras.ru/	В журнале публикуются статьи по всем основным разделам клеточной биологии (морфология, физиология, иммунология, генетика, биохимия, молекулярная биология, биофизика)	6 выпусков в год	Ядро РИНЦ, SCOPUS

Примечание: * по данным Российского индекса научного цитирования.

Помимо журнала «Терапевтический архив», результаты исследований могут быть опубликованы в профильных клинических изданиях, таких как «Эндокринология», «Сахарный диабет», «Кардиология» и «Российский кардиологический журнал», «Кардиоваскулярная терапия и профилактика», «Урология» и др., однако здесь также сохраняется проблема конкуренции в публикациях с клиницистами и могут возникнуть сложности с поиском рецензентов, связанные со спецификой исследований в области регенеративной биомедицины.

Стоит особо отметить, что в настоящее время активно ведется работа по включению специальностей «Регенеративная медицина» и «Клеточная и тканевая инженерия» в номенклатуру специальностей научных работников. Как было отмечено выше, в 2019 году впервые прошли выборы в Российскую академию наук по новой специальности «Клеточная биология и регенеративная медицина», что свидетельствует о признании учеными нашей страны нового раздела биомедицинской науки.

На фоне активного развития отрасли ощущается большая нехватка специалистов. В стране появляются программы магистратуры по регенеративной биомедицине, проходят защиты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук по специальностям «биология», «биохимия», «физиология», «трансплантология» и другим смежным, а не профильным специальностям. Это приводит к постоянной необходимости уточнять соответствие содержания научных работ иной специальности и некорректно отражает содержание диссертационных исследований. В конечном счете, это сдерживает развитие отрасли и ее укрепление как самостоятельной области науки и медицины.

Современное состояние развития журнала «Регенерация органов и тканей»

Научно-практический рецензируемый журнал «Регенерация органов и тканей» (“Tissue and Organ Regeneration”) является первым профильным изданием, посвященным проблемам развития регенеративной биомедицины во всех аспектах, начиная от фундаментальных научных исследований и заканчивая вопросами этики и правового регулирования в регенеративной медицине.

Ключевой задачей журнала является создание площадки для освещения и диалога специали-

стов об основных достижениях, проблемах и задачах регенеративной биомедицины.

Концепция журнала предусматривает всестороннее освещение вопросов, связанных с выяснением механизмов регенерации и обновления тканей, а также с возможностью разработки и практического применения подходов регенеративной биомедицины. Важным аспектом также является формирование и развитие этой отрасли науки как самостоятельного направления на стыке физиологии, клеточной биологии, биологии развития, биохимии и наук о материалах.

Журналом принимаются к рассмотрению рукописи на русском и английском языках, содержащие описание оригинальных экспериментальных работ, обзорные рукописи, комментарии к ранее опубликованным статьям. В раздел «Трансляционные исследования» могут быть направлены рукописи работ по доклиническим и клиническим исследованиям, выполненным в соответствии с этическими и нормативными требованиями, действующими на территории РФ или страны, где выполнялась работа. Журнал, помимо экспериментальных работ и обзорных статей, публикует также образовательные материалы.

Общество регенеративной медицины как учредитель журнала одной из важных целей своей работы считает сохранение памяти об отечественных ученых, внесших вклад в развитие регенеративной биомедицины. В связи с этим журнал приветствует публикацию исторических очерков об ученых и/или этапах становления этой области науки и медицины.

Регенеративная биомедицина, как и любая другая новая область науки, вызывает большое количество дискуссионных вопросов. Рубрика «Форум» предоставляет возможность публиковать статьи, посвященные этическим, нормативно-правовым, регуляторным и другим вопросам, которые требуют общественного обсуждения.

С учетом потребности отрасли в научном издании, которое должно соответствовать определенным современным требованиям, для публикации научных результатов уже предпринят ряд шагов, в том числе:

- издание зарегистрировано как СМИ (электронный № ФС77-83582 от 13 июля 2022 года);

- создан сайт журнала и размещена вся официальная информация об издании;
- издание зарегистрировано в Научной электронной библиотеке Elibrary, где размещаются все выпуски журнала;
- получен международный стандартный номер сериального издания ISSN — 2949-5938;
- зарегистрирован DOI, который присваивается каждой публикации;
- ведется проверка рукописей сервисом «Антиплагиат»;
- заключаются авторские договоры с авторами рукописей и рецензентами;
- все публикации доступны в открытом доступе.

Данные мероприятия заложили надежный фундамент для дальнейшего развития журнала.

Цели и задачи программы развития журнала

Целью программы развития научного журнала «Регенерация органов и тканей» является повышение качества издания в соответствии с требованиями международных наукометрических баз данных с дальнейшей перспективой включения в эти базы, а также стимулирование интереса к журналу и его востребованности со стороны научного сообщества. В итоге должно быть обеспечено формирование и развитие журнала как главного научного издания новой отрасли науки и медицины — регенеративной биомедицины.

Для реализации данной цели необходимо:

- 1) поддержание высокого уровня научных публикаций (создание и регулярное обновление базы рецензентов, приглашение ведущих ученых стать ответственными редакторами тематических выпусков);
- 2) развитие структуры и содержания журнала (добавление новых актуальных рубрик по мере развития отрасли, формирование тематических номеров, публикация тезисов и сборников статей конференций, увеличение количества публикаций в номере);
- 3) популяризация издания (приглашение членов редколлегии и редсовета к распространению информации о журнале в своих организациях, информационные рассылки о журналах в профильных научных сообществах).

План реализации программы развития научного журнала

План реализации программы развития научного журнала «Регенерация органов и тканей» состоит из двух этапов, представляющих краткосрочные и долгосрочные планы.

Этап 1 (2024–2026 гг.)

1. Индексация в РИНЦ.
2. Включение журнала в перечень ВАК.
3. Публикация тематических выпусков с приглашенными ответственными редакторами.
4. Публикация сборников статей по результатам проведения мероприятий.
5. Создание базы данных, содержащей информацию о внешних и внутренних рецензентах.
6. Развитие, поддержка и продвижение электронной версии научного журнала.

Первый этап реализации плана включает в себя преимущественно две основные задачи: индексацию в РИНЦ и включение в перечень ВАК. Как уже было описано выше, часть шагов для реализации данных задач уже выполнены, и в настоящее время идет накопление выпусков для прохождения экспертизы РИНЦ (50 статей) и ВАК (8 выпусков за 2 года). Для поддержания высокого уровня публикаций на этом этапе планируется создание нескольких тематических выпусков с приглашением ведущих ученых в области регенеративной биомедицины в качестве ответственных редакторов. Это позволит не только осветить самые актуальные направления развития этой отрасли науки, но и привлечь широкую аудиторию врачей, ученых и молодых специалистов, способных представить с разных сторон выбранную тему. Помимо тематических выпусков, предлагается сделать несколько выпусков статей по итогам проведения значимых мероприятий отрасли, например Национального конгресса по регенеративной медицине. Кроме того, для поддержания высокого уровня публикаций журнала необходимо создать и регулярно обновлять базу рецензентов журнала.

Этап 2 (2027–2030 гг.)

1. Переход на двуязычную версию журнала.
2. Включение в состав редколлегии и редсовета зарубежных ученых.
3. Индексация в Scopus и Pubmed.

Второй этап развития журнала связан с выходом журнала в международное научное пространство, что неразделимо связано с переводом статей на английский язык, и включение в состав редколлегии зарубежных ученых. Безусловно, данные задачи будут обсуждаться и прорабатываться еще в рамках первого этапа, но получат свое развитие и будут реализованы в рамках второго этапа.

Заключение

План развития журнала был обсужден и принят на совместном заседании Редакционной коллегии и Редакционного совета журнала 28 марта 2024 года. Необходимость создания и развития профильного журнала в новой и быстро развивающейся научной отрасли не вызывает сомнений. В регенеративную биомедицину приходит все больше молодых специалистов, которым нужна платформа для публикации и обсуждения своих научных открытий и разработок, в то время как ведущим ученым необходимо представлять свое видение развития научного направления и отрасли на перспективу.

Реализация плана развития журнала позволит получить со временем индексацию как в русских, так и международных базах данных. Индексация журнала в РИНЦ и включение в перечень ВАК уже позволят журналу увеличить поток публикаций и расширить географию авторских коллективов, повышая качественный уровень издания и расширяя территориальный охват. Постепенное появление переводной версии будет, бесспорно, способствовать популяризации российских исследований за рубежом и повышению привлекательности журнала для зарубежных авторов.

Развитие журнала «Регенерация органов и тканей» позволит расширить сотрудничество с научными коллективами, укрепить научную коммуникацию между фундаментальными учеными и клиницистами, вовлечь молодых специалистов в новую отрасль, что повысит научный потенциал регенеративной биомедицины в нашей стране.

Об авторах

Макаревич Павел Игоревич — к.м.н., заместитель главного редактора журнала «Регенерация органов и тканей», зав. лабораторией генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова; доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Тарасова Елена Владимировна — к.э.н., ответственный секретарь журнала «Регенерация органов и тканей», с.н.с. отдела научных программ и инновационных технологий Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова.

Ефименко Анастасия Юрьевна — к.м.н., член редакционной коллегии журнала «Регенерация органов и тканей», заведующая лабораторией репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова; доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Акопян Жанна Алексеевна — к.м.н., заместитель директора Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. кафедрой клинического моделирования и мануальных навыков факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Ткачук Всеволод Арсеньевич — академик, главный редактор журнала «Регенерация органов и тканей», президент РОО «Общество регенеративной медицины», директор Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова; зав. кафедрой биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Authors

Pavel I. Makarevich — M.D., Ph.D., Deputy Editor-in-Chief of "Tissue and Organ Regeneration", Head of the Laboratory of Gene and Cell Therapy of the Institute for Regenerative Medicine of the Medical Research and Educational Center of Lomonosov Moscow State University; Associate Professor of the Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Elena V. Tarasova — Ph.D., Assistant Editor of "Tissue and Organ Regeneration", Senior Researcher of the Department of Scientific Programmes and Innovative Technologies of the Medical Research and Educational Center of Lomonosov Moscow State University.

Anastasia Yu. Efimenko — M.D., Ph.D., Editorial Board Member of «Tissue and Organ Regeneration», Head of the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration of the Institute for Regenerative Medicine of the Medical Research and Educational Center of Lomonosov Moscow State University; Associate Professor of the Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Zhanna A. Akopyan — M.D., Ph.D., Deputy Director of Medical of the Medical Research and Educational Center of Lomonosov Moscow State University; Chair of the Department of Clinical Simulation and Manual Skills of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Vsevolod A. Tkachuk — Full Member of RAS, Editor-in-Chief of "Tissue and Organ Regeneration", President of the Society for Regenerative Medicine, Dean of the Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Director of the Institute for Regenerative Medicine, Education and Research Medical Center, Lomonosov Moscow State University.

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-16-28>



Метод Golden Gate в биологии и медицине

М.И. Антипина, В.А. Ли, Е.Е. Попова, Е.В. Семина

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», ул. Александра Невского, д. 14, 236041, Калининград, Россия

Адрес для корреспонденции: antipinaria@gmail.com

Аннотация

Целью данного обзора было описать и сравнить методы молекулярного клонирования для сборки генетических конструкций. Генетическая терапия — одна из активно развивающихся отраслей современной медицины, поэтому особое внимание в данном обзоре уделено таким параметрам, как быстрота, точность и эффективность клонирования, так как они являются критическими факторами при создании генно-терапевтических средств. Особое внимание уделено методике Golden Gate, которая основана на использовании эндонуклеаз рестрикции типа IIS, поскольку такой подход упрощает процесс клонирования и повышает его эффективность за счет стандартизированного дизайна и минимального набора ферментов. Наряду с Golden Gate в обзоре также обсуждаются такие методы молекулярного клонирования, как Gateway и Gibson, с точки зрения перспектив их использования для решения фундаментальных и прикладных задач регенеративной медицины.

Ключевые слова: молекулярное клонирование, Golden Gate, клонирование Gateway, клонирование Gibson

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Антипина М.И., Ли В.А., Попова Е.Е., Семина Е.В. Метод Golden Gate в биологии и медицине. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(1):16–28. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-16-28>

Поступила 10.02.2024

Обработана 21.03.2024

Принята к публикации 28.03.2024

Golden gate method in biology and medicine

Maria I. Antipina, Vladislav A. Li, Elizaveta E. Popova, Ekaterina V. Semina

Immanuel Kant Baltic Federal University, Alexander Nevsky Str., 14, 236041, Kaliningrad, Russia

Correspondence address: antipinaria@gmail.com

Abstract

The aim of this review was to describe and compare molecular cloning methods for assembling genetic constructs. Genetic therapy is one of the rapidly developing fields of modern medicine, so special attention in this review is paid to parameters such as speed, accuracy, and efficiency of cloning, as these are critical factors in creating gene therapy agents. Special attention is given to the Golden Gate method, which is based on the use of type IIS restriction endonucleases, as this approach simplifies the cloning process and increases its efficiency through standardized design and a minimal set of enzymes. Alongside Golden Gate, the review also discusses more innovative molecular cloning methods, Gateway and Gibson, in terms of their potential use for addressing fundamental and applied challenges in regenerative medicine.

Keywords: molecular cloning, Golden Gate, Gateway cloning, Gibson Assembly

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For citation: Antipina M.I., Li V.A., Popova E.E., Semina E.V. Golden gate method in biology and medicine. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(1):16–28. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-16-28>

Received 10.02.2024

Revised 21.03.2024

Accepted 28.03.2024

Список сокращений

Эндонуклеазы рестрикции IIS типа — ферменты, способные разрезать цепь ДНК за пределами сайта узнавания

ПЦР — полимеразная цепная реакция

attP и attB — сайты прикрепления фага и бактерии, в результате рекомбинации между этими сайтами происходит интеграция фаговой ДНК в геном бактерии

attL и attR — левый и правый сайты рекомбинации, фланкирующие встроенную ДНК фага, создаваемые при рекомбинации сайтов attP и attB

BP клоназа — фермент, катализирующий реакцию рекомбинации по сайтам attP и attB

LR клоназа — фермент, катализирующий реакцию рекомбинации по сайтам attL и attR

ccdB — ген-киллер, экспрессирующий смертельный для бактерий токсин

CRISPR — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, особые локусы бактерий и архей, обеспечивающих адаптивный иммунитет

TALEN — эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции, представляют собой рестрикторные ферменты, которые могут быть сконструированы для разрезания определенных последовательностей ДНК

ЦНС — центральная нервная система

ИПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

МСК — мезенхимальные стволовые клетки

Введение

Огромное количество исследований в области регенеративной медицины направлено на разработку технологий генной инженерии для создания эффективных способов стимуляции регенерации органов и тканей, лечения пациентов с травмами, ожогами, генетическими патологиями.

Быстрая и корректная сборка генетических конструкций играет ключевую роль в разработке эффективных генно-терапевтических подходов, поскольку позволяет создавать специализированные последовательности, способные ускорить процессы восстановления и заживления тканей. Точность и оперативность молекулярного клонирования могут существенно повлиять на эффективность лечения нуждающихся в терапии пациентов, а также способствуют развитию персонализированной медицины и индивидуализированных подходов регенеративной медицины.

Часто ограничивающим фактором в создании сложных генетических конструкций является сложность сборки последовательностей ДНК, кодирующих несколько генетических элементов [1]. Несмотря на то что молекулярное клонирование является одной из бурно развивающихся областей науки, большая часть работы по-прежнему выполняется с использованием стандартных методик, таких как субклонирование, ПЦР-клонирование, ТА-клонирование и пр. Использование традиционных методов молекулярного клонирования трудоемко и затратно по времени и расходным материалам. Основная сложность заключается в том, что необходимо разрабатывать уникальный дизайн молекулярного конструирования практически в каждом проекте. Довольно часто это обусловлено тем, что в исходных последовательностях могут отсутствовать удобные сайты эндонуклеаз рестрикции для клонирования интересующего фрагмента или, наоборот, присутствовать нежелательные. В обоих этих случаях возникает потребность модифицировать целевые фрагменты перед сборкой, что существенно замедляет процесс. При работе с традиционными молекулярными методами сборку компонентов проводят в несколько этапов, проверяя наличие и ориентацию интересующего фрагмента ДНК на каждом этапе клонирования. При этом используется большое количество разных ферментов и буферов, что сказывается на стоимости, эф-

фективности и продолжительности выполнения всего эксперимента.

Сделать молекулярное клонирование фрагментов ДНК более эффективным можно, если рассматривать его как процесс, представляющий собой сборку дискретных функциональных генетических элементов. Взаимозаменяемость и возможность переиспользовать функциональные фрагменты ДНК, а также однотипные протоколы сборки упрощают как дизайн, так и саму процедуру клонирования. Одним из таких подходов является методика молекулярного клонирования Golden Gate, которая делает возможным универсальную и эффективную сборку генетических конструкций. В основе данного метода лежит использование эндонуклеаз рестрикции класса IIS, особенностью которых является наличие как сайта узнавания, так и сайта разрезания, а четырехбуквенные перекрытия (выступающие «липкие» концы после рестрикции) проектируются на стадии дизайна эксперимента таким образом, что сборка нескольких фрагментов ДНК будет производиться в одной, единственно верной, заранее спланированной исследователем ориентации.

Такой подход к организации молекулярного клонирования делает возможным сборку многокомпонентных последовательностей в одной пробирке, минуя такие этапы, как препаративный гель-электрофорез, экстракция ДНК из геля и дополнительные шаги по верификации на промежуточных стадиях. Преимущества данного подхода заключаются в стандартизированном дизайне, направленности клонирования, а также использовании минимального набора ферментов высокой точности, что позволяет сэкономить на затратах.

В обзоре будут рассмотрены как традиционные методики молекулярного клонирования, используемые для решения рутинных задач для сборки генетических конструкций, так и более современные и инновационные подходы, такие как Gateway, Gibson и Golden Gate

Популярные стратегии молекулярного клонирования. Сравнительная характеристика

Традиционное клонирование основано на создании рекомбинантной ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции. Такие методики являются самым простым и самым старым методом молекулярного конструирования [2], а также

заложили основу для разработки новых способов молекулярной инженерии.

1. Субклонирование

Одной из самых базовых техник молекулярного клонирования является субклонирование. Метод основан на перемещении гена интереса с родительской плазмиды-вектора на плазмиду-шаттл. Ферменты рестрикции используются для того, чтобы разрезать плазмидный вектор по двум сайтам, а также вырезать ими же вставку из исходной родительской плазмиды. Далее вектор и вставка очищаются с помощью электрофореза в агарозном геле. После выделения из геля компонентов сборки производят сшивание вектора и вставки с использованием лигазы. В итоге получают новую плазмиду, которая содержит ген интереса. Далее производят трансформацию компетентных клеток *E. coli* полученной плазмидой, отбор колоний с помощью селекции на основе резистентности к антибиотику (выращивают бактерии на среде с антибиотиком, трансформируемый вектор, в свою очередь, содержит ген устойчивости к данному антибиотику), скрининг колоний, наращивание отобранных клонов и выделение из них плазмид [3, 4].

2. Система BioBrick

Система BioBrick основана на использовании изокаудомеров, представляющих собой эндонуклеазы рестрикции, распознающие разные последовательности нуклеотидов, но образующие одинаковые концы, что позволяет легко и достаточно эффективно конструировать генетические конструкции [5]. В основе метода BioBrick лежит активность ферментов рестрикции II типа — сайт узнавания и сайт рестрикции совпадают, при расщеплении фрагмента ДНК образуются «липкие» концы. Под одним элементом этой системы подразумевается ген интереса — это может быть промотор, ДНК-кодирующая последовательность, терминатор, сигнальный пептид, сайты связывания с рибосомой и т.д. В системе сборки BioBrick все эти элементы стандартизированы и содержатся в виде библиотек, в которых каждый фрагмент находится в отдельной плазмиде, содержащей ген резистентности к антибиотику, используемому для контрселекции, и точку начала репликации. К тому же BioBrick должен быть фланкирован с обеих сторон двумя стандартными сайтами рестрикции — внутренним и внешним, при этом внутренние сайты должны являться изокаудомерами. При лигировании таких «липких» концов образуется гибридный сайт,

находящийся между двух элементов BioBrick, который более не может узнать ни один из исходных ферментов. Сайты рестрикции, фланкирующие финальную сборку, восстанавливаются. Таким образом можно собирать достаточно объемные конструкции, выбирая сайты рестрикции с совместимыми концами, при этом фланкирующие сайты можно использовать повторно для следующего раунда сборки. Это довольно простой и эффективный вариант клонирования, но необходимо иметь в виду, что на месте образования гибридного сайта появляется «шов» в несколько аминокислот, что во многих случаях недопустимо [6].

3. ПЦР-клонирование

Другой базовой техникой клонирования в синтетической биологии является метод клонирования с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) [7]. Есть два варианта ПЦР-клонирования. Первый отличается от традиционных методов тем, что позволяет избежать использования ферментов рестрикции. ПЦР используют для наработки гена интереса с родительской плазмиды, а потом готовый ампликон присоединяют к заранее линейаризованному вектору с помощью лигирования по «тупым» концам. Второй вариант ПЦР-клонирования основан на использовании сайтов рестрикции, которые добавляются к ампликону гена интереса посредством праймеров, содержащих выступающие концы (dangling ends) с сайтами рестрикции. Для линейаризации плазмидного вектора также используют эндонуклеазы рестрикции (в том числе изоизомеры или изокаудомеры), благодаря чему клонирование фрагментов происходит в необходимой ориентации. Далее вектор и ген интереса лигируются с последующей трансформацией компетентных клеток *E. coli* лигазной смесью.

4. ТА-клонирование

ТА-клонирование — еще один метод клонирования, который является более быстрым и простым, чем метод традиционного субклонирования, и также позволяет избежать работы с ферментами рестрикции [8]. В ТА-клонировании используют Taq ДНК-полимеразу, которая амплифицирует ген интереса с добавлением остатков аденина к 3'-концам ПЦР-продукта. Для создания вектора необходимо линейаризовать плазмиду-шаттл разрезанием ферментами рестрикции с образованием «тупых» концов. Далее вектор соединяется с дидезокситимидин-

трифосфатом (ddNTP) с помощью терминальной трансферазы. Затем ампликон с аденинами на 3'-концах лигируют с вектором, содержащим тимины на 3'-концах вектора, с использованием ДНК-лигазы T4 [9].

5. ТОРО ТА-клонирование

Помимо ТА-клонирования существует его разновидность — ТОРО ТА-клонирование [10]. Этот метод объединяет в себе преимущества ТА-клонирования с лигирующей активностью топоизомеразы I. А именно: биологическая роль топоизомеразы I состоит в расщеплении и повторном сшивании концов суперскрученной ДНК для облегчения репликации. Топоизомераза I, используемая в ТОРО ТА-клонировании, специфически узнает последовательность ДНК 5' — (С/Т) ССТТ — 3', которая находится на обоих концах вектора. В процессе репликации она специфически разрезает ДНК в этой области, раскручивает ДНК и лигирует ее со вставкой. Вставка, в свою очередь, должна быть наработана ПЦР амплификацией с помощью Taq ДНК-полимеразы и содержать аденин на 3'-концах ампликона. Этот метод позволяет обходиться без ДНК-лигазы, а также достаточно быстро производить прямое лигирование ПЦР-фрагментов в вектор [11, 12].

6. Клонирование по методу Gateway

Метод клонирования Gateway основан на феномене интеграции и рекомбинантного вырезания генов, которые происходят при внесении генетического материала лямбда-фага в бактерию [13]. В естественных условиях рекомбинация ДНК происходит с помощью ВР клоназы между сайтами рекомбинации attP у фага и attB у бактерии [14]. В результате реакции между сайтами attP и attB лямбда-фаг интегрируется в бактериальный геном, окруженный двумя новыми сайтами рекомбинации — attL (Left) и attR (Right). Сайты attL и attR могут также рекомбинировать, с помощью LR клоназы, что приводит к удалению фага из бактериального генома. Эти две противоположные реакции лежат в основе технологии Gateway:

а) Реакция ВР или рекомбинация сайтов attB и attP. В этом этапе ген интереса должен быть фланкирован последовательностями attB1 и attB2, а донор-вектор последовательностями attP1 и attP2, между которыми в векторе должен находиться ген *ccdB* — белок-токсин, нарушающий работу ДНК-гиразы и приводящий к смерти клетки. При добавлении в реакционную смесь ВР фермента

клоназы происходит рекомбинация по attB и attP сайтам, в результате синтезируется промежуточный клон, который содержит ген интереса, фланкированный уже сайтами attL. Побочным продуктом реакции является ген *ccdB*, который вырезается из донор-вектора и добавляется в промежуточную плазмиду;

б) Реакция LR, или реакция рекомбинации сайтов attL и attR. На данном этапе рекомбинация происходит между полученным ранее клоном с интересующей вставкой, синтезированным на предыдущем шаге, и вектором назначения, который содержит ген *ccdB*. Ген интереса фланкирован последовательностями attL1 и attL2, ген *ccdB* на векторе назначения фланкирован последовательностями attR1 и attR2. При добавлении LR клоназы происходит рекомбинация по attL и attR сайтам с восстановлением сайтов attP и attB. В результате реакции генерируется экспрессионный клон, который содержит ген интереса, фланкированный сайтами attB. Как и в предыдущей реакции, ген, кодирующий *ccdB*, вырезается из вектора назначения и добавляется в промежуточный клон.

Следующим шагом является трансформация компетентных клеток и отбор положительных клонов. Для этого проводят двойную селекцию — оба вектора имеют ген резистентности к разным антибиотикам. К тому же необходимо использовать штамм *E. coli*, чувствительный к *ccdB*, который, как было упомянуто, является цитотоксическим геном. После трансформации проводят отбор клонов, содержащих интересующий фрагмент.

7. Клонирование по методу Gibson Assembly

Сборка векторов по Гибсону была разработана в 2009 году доктором Дэниэлом Гибсоном и его коллегами из института Дж. Крейга Вентера [15]. Суть этого клонирования состоит в объединении нескольких линейных фрагментов ДНК. Весь процесс клонирования происходит в одной пробирке, минуя этапы препаративной рестрикции, электрофореза в агарозном геле, выделения из геля фрагментов, фосфорилирования или дефосфорилирования и лигирования. Для успешной сборки по методу Гибсона необходимо, чтобы фрагменты ДНК, которые впоследствии соединяются в одну молекулу, содержали перекрывающиеся комплементарные концы. Их можно добавить к гену интереса с помощью ПЦР амплификации, используя праймеры с необходимыми адаптерами. Фрагменты

ДНК с перекрывающимися концами добавляют в реакционную смесь и инкубируют от 15 минут до 1 часа при температуре 50 °С. В реакционной смеси для клонирования по Гибсону содержится нуклеаза с 5'-3' экзонуклеазной активностью, которая отщепляет нуклеотиды с 5'-конца фрагментов, создавая одноцепочечные перекрытия, которые гибридизуются друг с другом по принципу комплементарности. Также в смеси содержится ДНК-полимераза, которая достраивает цепочку, используя в качестве матрицы интактные 3'-участки, и ДНК-лигаза, которая сшивает одноцепочечные разрывы цепи ДНК. После этих манипуляций получается цельная молекула ДНК, которая далее может использоваться для постановки ПЦР или трансформации. Клонирование по Гибсону может использоваться как для сборки большого количества фрагментов в одну молекулу одновременно, так и для рутинных манипуляций [16].

8. Golden Gate

Golden Gate сегодня рассматривают как одну из эффективных стратегий клонирования [17], которая позволяет встраивать в плазмидный вектор до нескольких вставок одновременно. Технология Golden Gate основана на активности эндонуклеаз рестрикции IIS типа, особенностью которых является разрезание последовательности ДНК за пределами сайта узнавания с образованием «липких» концов. Именно эта особенность позволяет производить сборку многокомпонентных конструкций в одной пробирке — еще на этапе дизайна эксперимента исследователь может спроектировать образующиеся выступающие концы таким образом, чтобы интересующие фрагменты ДНК были клонированы в заранее определенном порядке и ориентации [18].

Методику Golden Gate используют как для клонирования моногенных последовательностей (промоторы, гены интереса, линкеры, белковые метки, терминаторы и пр.) в плазмиды-хранилища, так и для сборки мультигенных конструкций. В обобщенном варианте схема клонирования одиночной последовательности в плазмидный вектор по методике Golden Gate (рис. 1) заключается в следующем: необходимо амплифицировать ген интереса с помощью ПЦР, используя праймеры, содержащие адаптеры на своих концах. В адаптерные последовательности входит сайт узнавания используемых эндонуклеаз рестрикции и линкерный регион, по которому

и происходит расщепление. Причем необходимо спроектировать праймеры таким образом, чтобы с 5'-конца шел сначала сайт узнавания ферментов рестрикции и только после него сайт разрезания. Такой дизайн олигонуклеотидов обеспечит удаление сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции IIS типа из готовой конструкции. Плазмидный вектор должен содержать сайты узнавания ферментов рестрикции с 3'-конца относительно сайта расщепления. А также такие линкерные регионы, чтобы при обработке эндонуклеазами рестрикции IIS типа образовывались «липкие» концы, комплементарные «липким» концам, которые содержит ген интереса. Таким образом происходит встраивание гена интереса в плазмидный вектор в строго определенной ориентации. При этом сайты узнавания

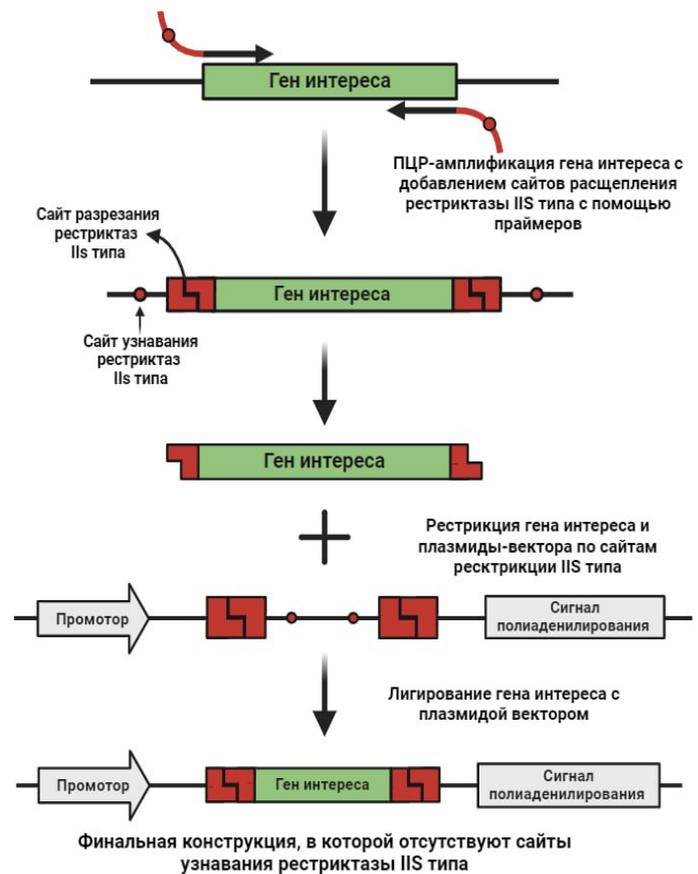


Рис. 1. Схема молекулярного конструирования моногенной последовательности по методу Golden Gate. Сайты узнавания и разрезания рестриктазы IIS типа добавляются с помощью праймеров во время ПЦР-амплификации. Сайт узнавания рестриктазы IIS типа отмечен кружком; сайт разрезания — зигзагом. После подготовки генетического фрагмента производится его клонирование с помощью реакции рестрикции-лигирования в необходимый участок по липким концам

фермента рестрикции, используемой в реакции, удаляются из готовой конструкции.

В случае сборки конструкции, которая состоит из нескольких компонентов, алгоритм сборки является аналогичным. Каждый из компонентов эукариотической экспрессионной кассеты амплифицируется ПЦР с добавлением адаптеров, содержащих сайты узнавания и расщепления эндонуклеазы рестрикции IIS типа, при этом линкерные регионы должны быть комплементарны друг другу, как указано на схеме ниже (рис. 2). В этом случае сборка компонентов эукариотической экспрессионной кассеты будет происходить в правильной ориентации и последовательности. Финальная конструкция не содержит сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции IIS типа [17].

Вставка и плазмидный вектор должны быть сконструированы таким образом [19], чтобы удовлетворять следующим условиям:

а) Вставка и вектор должны содержать гомологичные нуклеотидные последовательности в сайтах расщепления; таким образом, реакция рестрикции будет протекать с образованием «липких» концов, которые затем гибридизуются друг на друга. Более того, такая конструкция обеспечивает правильную ориентацию вставки в векторе;

б) Сайт узнавания эндонуклеаз рестрикции типа IIS должен фланкировать интересующий ген таким образом, чтобы после реакции рестрикции-лигирования он оставался

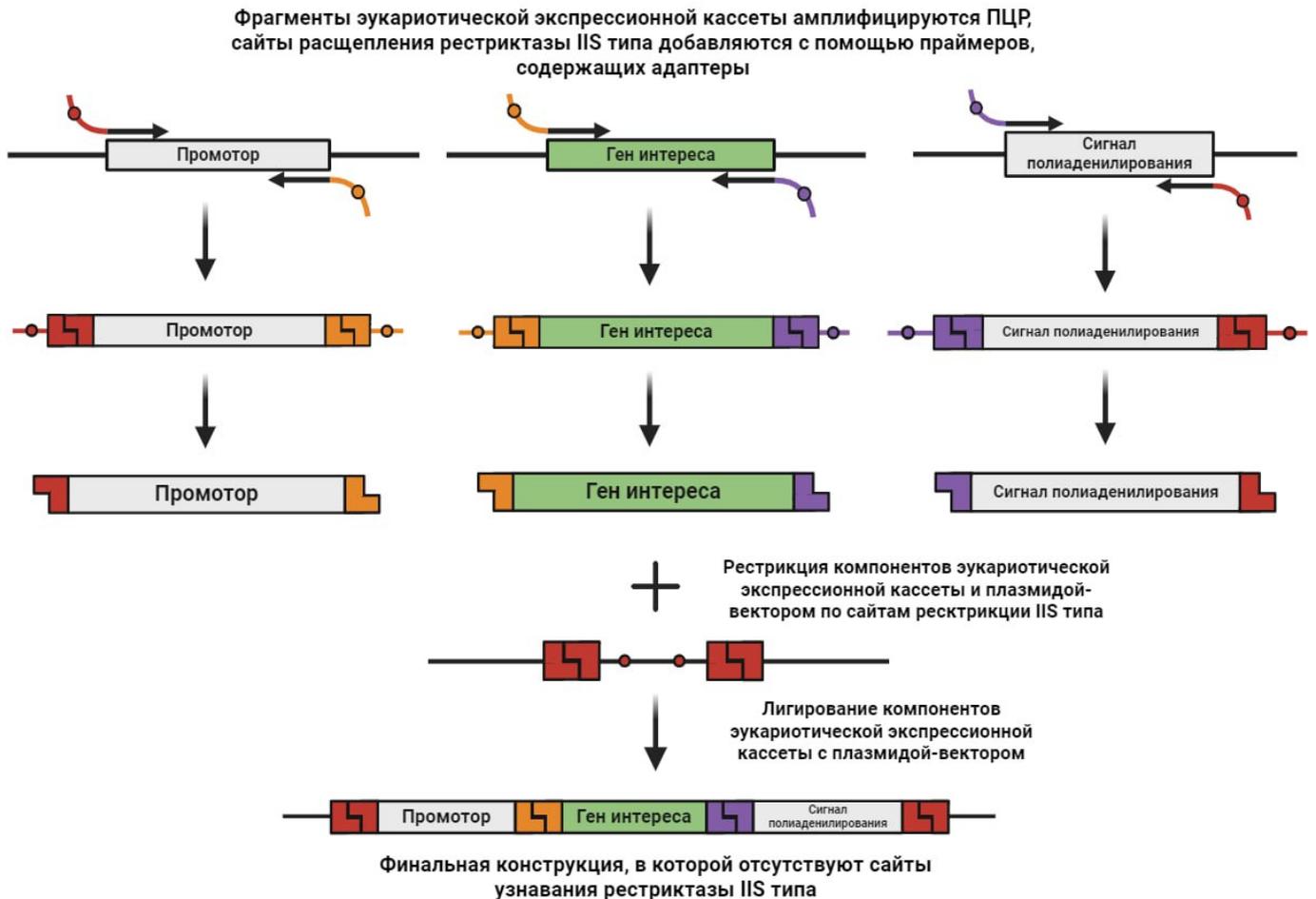


Рис. 2. Схема молекулярного клонирования Golden Gate для сборки эукариотических экспрессионных кассет. Сайты узнавания и разрезания рестриктазы IIS типа добавляются с помощью праймеров во время ПЦР-амплификации. Сайт узнавания рестриктазы IIS типа отмечен кружком; сайт разрезания – зигзагом. Клонирование мультигенной конструкции происходит аналогично моногенной за один этап реакции рестрикции-лигирования по совместимым «липким» концам, которые обеспечивают заданную ориентацию и последовательность фрагментов эукариотической экспрессионной кассеты

на плазмиде-хранилище; это необходимо для того, чтобы избежать повторной рестрикции готового продукта. Конечным результатом реакции является упорядоченная сборка фрагментов ДНК, полученная за одну совместную реакцию рестрикции-лигирования.

Молекулярное конструирование в технике Golden Gate отличает быстрота, которая связана с простотой реакционной смеси. Время, затраченное для приготовления лигазной смеси (hands-on time), может составлять 5 минут.

После того как в одной пробирке к исходному вектору и вектору назначения добавляется эндонуклеаза рестрикции IIS типа и лигаза, происходит необратимая сборка финальной конструкции. И хотя может происходить образование побочного продукта (исходный вектор лигируется со вставкой или лигирование с образованием исходной плазмиды), он будет существовать в реакционной смеси временно, так как последовательность сохраняет сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции IIS типа, и, следовательно, будет расщепляться. В результате эффективность процесса лигирования приближается к 100%.

Еще одним преимуществом клонирования по методу Golden Gate является масштабируемость. Эндонуклеазы рестрикции IIS типа отличаются тем, что производят расщепление ДНК в регионе, находящемся на несколько нуклеотидов ниже от сайта узнавания с образованием четырехнуклеотидного одноцепочечного «липкого» конца. Так как при Golden Gate может происходить конструирование нескольких фрагментов ДНК, обычно до 10, линкерные регионы можно спроектировать таким образом, чтобы сборка финальной конструкции происходила в строго определенной последовательности и ориентации. Поскольку «липкий» конец будет состоять только из четырех нуклеотидов, следовательно, существует 256 возможных вариантов проектируемых перекрытий. Количество комбинаций «липких» концов рассчитывается по формуле I^k , где I — это количество переменных позиций, а k — количество нуклеотидов в одной позиции, таким образом $I^k = 4^4$, или 256. Однако, так как исследователи избегают палиндромных последовательностей и содержания GC состава более 50–75%, то практический выбор последовательностей перекрытий ограничивается приблизительно 90 вариантами, чего более чем достаточно для клонирования [20].

В отличие от Golden Gate методы, основанные на работе экзонуклеаз, например молекулярное конструирование по Гибсону, требуют от 20 до 40 гомологичных пар нуклеотидов на концах фрагментов ДНК, которые необходимы для указания порядка сборки. В методе Golden Gate необходимо всего четыре пары нуклеотидов для гомологии. Как правило, в большинстве случаев линкерные регионы, необходимые для установления порядка конструирования в системе Golden Gate, добавляются к гену интереса посредством адаптеров на концах праймеров в полимеразной цепной реакции. Это говорит о том, что метод Golden Gate является более экономически выгодным, чем другие методы клонирования, такие как BioBrick, Gateway или Gibson.

Несмотря на все вышесказанное, у метода Golden Gate есть определенные ограничения. Во-первых, при проведении реакции необходимо убедиться, что сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции IIS типа присутствуют только там, где они нужны. Другими словами — сайты узнавания должны фланкировать ген интереса, но не находиться в нем. В противном случае будет происходить нежелательное расщепление продукта и нарушение итоговой сборки. Эту проблему можно решить ПЦР-амплификацией гена с внесением точечной мутации посредством праймеров (доместикация фрагмента) или с помощью субклонирования элементов. Во-вторых, теоретически существует ограниченное количество вариантов дизайна перекрытий — 256. И хотя данное число является достаточно большим, необходимо помнить о том, что некоторые варианты перекрытий с различием в один нуклеотид могут неспецифически лигироваться друг с другом. Этот момент должен учитываться на этапе разработки эксперимента [21, 22].

9. Сравнительная характеристика методов молекулярного клонирования

Стратегии традиционного молекулярного клонирования все еще являются наиболее распространенными на сегодняшний день. Эти сборки могут быть очень эффективными при условии, что совместимые сайты узнавания для применяемых эндонуклеаз рестрикции легко доступны в последовательностях ДНК, которые необходимо модифицировать. Однако зачастую это не так или сайт узнавания необходимой рестриктазы не является уникальным, и тогда приходится искать сложные и многоэтапные альтернативы — подбирать уникальную стратегию клони-

рования, адаптированную к конкретной конструкции и последовательности ДНК каждый раз. Также при таком подходе довольно сложно собирать одновременно множество генетических конструкций. Например, при параллельной сборке более трех генетических конструкций значительно возрастает вероятность ошибки.

Большая часть рассмотренных методов молекулярного клонирования являются финансово затратными и требуют значительного времени, при этом обладают высокой трудоемкостью и низкой эффективностью. Два из представленных методов — молекулярное клонирование по методу Gibson и Golden Gate наиболее выгодно выделяются на фоне всех рассмотренных методов, так как они дают широкие возможности для стандартизации элементов, скорости и гибкости дизайна эксперимента. Сравнительная

характеристика методов молекулярного клонирования представлена в таблице 1.

Обсуждение

Создание простых и эффективных подходов молекулярной инженерии при разработке генетических конструкций, в рамках которых для достижения желаемых терапевтических эффектов становится возможным целенаправленное изменение транскрипционного профиля клеток, в т.ч. стволовых, является важной задачей для регенеративной медицины. В последние годы использование технологий редактирования генома CRISPR и TALEN открыло новые возможности решения таких задач, в частности лечения нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний, фиброза, ожогов и др. [23]. На данный момент практически все эти примеры находятся в области

Таблица 1. Сравнительная характеристика методов молекулярного конструирования

Метод клонирования	Этапы приготовления вектора	Этапы приготовления вставки	Необходимые реагенты (в т.ч. ферменты)
Субклонирование	1. Препаративная рестрикция вектора 2. Гель-электрофорез 3. Вырезание и выделение из геля 4. Иногда дефосфорилирование вектора	1. Препаративная рестрикция вставки 2. Гель-электрофорез 3. Вырезание и выделение из геля 4. Иногда фосфорилирование вставки	Набор эндонуклеаз рестрикции (от 1 до 10) ¹ , фосфатаза, киназа, лигаза
Система BioBrick	Препаративная рестрикция вектора	Препаративная рестрикция вставки	Набор эндонуклеаз рестрикции
ПЦР-клонирование	1. Подготовка вектора посредством рестрикции 2. Гель-электрофорез 3. Вырезание и выделение из геля	1. ПЦР амплификация вставки 2. Фосфорилирование	Полимераза, набор эндонуклеаз рестрикции, фосфатаза, лигаза, киназа
TA-клонирование	1. Линеаризация вектора посредством рестрикции 2. Добавление к вектору ddTTP с помощью терминальной трансферазы	1. ПЦР амплификация вставки	Полимераза, набор эндонуклеаз рестрикции, трансфераза, лигаза
ТОРО TA-клонирование	Лигирование вектора со вставкой с помощью топоизомеразы I	ПЦР амплификация вставки	Полимераза, топоизомераза
Gateway	1. Реакция BP 2. Реакция LR	1. ПЦР амплификация вставки	BP-клоназа, LR-клоназа
Клонирование по методу Gibson	1. ПЦР амплификация фрагментов праймерами, содержащих адаптеры 2. Реакция Гибсона	1. ПЦР амплификация фрагментов праймерами, содержащими адаптеры	Полимераза, экзонуклеаза, полимеразы ² , лигаза
Клонирование по методу Golden Gate	Реакция Golden Gate		Эндонуклеаза рестрикции IIS типа, лигаза

Примечание: ¹ Количество используемых эндонуклеаз рестрикции зависит от дизайна эксперимента; ² Первая полимеразы используется для амплификации гена интереса, вторая полимеразы входит в коммерческий набор Gibson Assembly вместе с экзонуклеазой и лигазой.

экспериментальной медицины, однако уже первые результаты таких исследований выглядят многообещающе с точки зрения приложений для регенеративной медицины. Одним из ярких примеров использования технологии редактирования TALEN является стимуляция ангиогенеза. В работах Баркера и коллег [24] был использован TALEN подход для интеграции гена *PDGF-B* человека в первичные фибробласты мыши, после чего модифицированные фибробласты были введены в рану мыши *in vivo*. Использование гиперэкспрессирующих *PDGF-B* клеток сильнее симулировало заживление ран по сравнению с вводимыми фибробластами дикого типа за счет усиления васкуляризации раны. Плазмиды, кодирующие последовательности химерных нуклеаз, были созданы с помощью метода Golden Gate.

В последние годы стали использовать генетические конструкции для разработки терапий, направленных на замедление или остановку нейродегенеративных процессов. Так, в исследовании Нью и коллег было показано, что астроциты путем принудительной экспрессии фактора транскрипции *SOX2* могут быть идеальной мишенью для преобразования их в нейроны после повреждения ЦНС [25]. Плазида-шаттл, содержащая фактор транскрипции *SOX2*, была создана методом субклонирования. Результаты этих экспериментов показали принципиальную возможность использования эндогенных глиальных клеток, специфичных для пациента, как источника функциональных нейронов для лечения нейродегенеративных состояний или травм мозга.

В другом исследовании была показана возможность использования CRISPR/Cas9 технологии для исправления мутации в гене *APP^{Swe}*, что привело к снижению секреции бета-амилоида А β , это позволило авторам рассматривать такой подход для лечения болезни Альцгеймера. В данном исследовании клонирование направляющих РНК в плазмидный вектор осуществляли с помощью Golden Gate [26]. Другим примером эффективного перепрограммирования одним геном (фактором транскрипции) *NeuroD1* неактивных глиальных клеток коры головного мозга в функциональные нейроны у мышей в *in vivo* моделях травмы мозга и болезни Альцгеймера являются исследования Гуо и коллег [27], и в которых плазида была создана посредством субклонирования.

Технологии редактирования генома активно исследуются в моделях лечения фиброза. Так, Шванк и коллеги впервые сообщили об использовании системы редактирования CRISPR/Cas9 для коррекции локуса гена *CFTR* в культивируемых стволовых клетках тонкого кишечника пациентов, гомозиготных по мутации F508del [28]. Направляющие РНК для редактирования генома создавали с помощью инвертированной ПЦР с последующим субклонированием; экспрессионные кассеты, используемые для селекции клонов, создавали с помощью метода In-Fusion ПЦР. Стволовые клетки с исправленным геном *CFTR* формировали органоиды, функционально реагирующие на добавление в систему форсколина. Фирт и коллеги получили индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) из фибробластов кожи пациентов с аналогичной мутацией, где выполнили коррекцию гена *CFTR* с помощью CRISPR/Cas9. Исправленные ИПСК далее дифференцировали в зрелые эпителиальные клетки дыхательных путей и показали восстановление функции транспорта хлорида, специфичной для *CFTR* дикого типа [29]. Для исправления мутации авторами была создана система CRISPR, состоящая из двух компонентов: плазмиды, кодирующей полноразмерный белок Cas9, оптимизированный по кодонам для оптимальной экспрессии в клетках человека, и отдельной плазмиды, содержащей кассету шпильки направляющей РНК, управляемую промотором U6, обе конструкции были собраны с использованием субклонирования.

Нельзя не отметить уже большое на сегодняшний день число исследований, в которых оцениваются подходы подавления апоптоза за счет активации экспрессии антиапоптотических генов. В работах Чо и коллег продемонстрировано, что сверхэкспрессия гена *LEF1* (связывающий лимфоидный энхансер-1 фактор) в мезенхимальных стволовых клетках, полученных из пуповинной крови человека hUCB-MCK, увеличивает их пролиферацию и защищает от индуцированного перекисью водорода апоптоза *in vitro*. Более того, использование сверхэкспрессирующих *LEF1* hUCB-MCK, полученных на основе CRISPR/Cas9, и дальнейшая их трансплантация в зону инфаркта миокарда показали повышенную выживаемость стволовых клеток и кардиопротекторные эффекты на животной модели инфаркта миокарда [30].

Хочется отметить, что, несмотря на уже ставшее рутинным использование технологий TALEN

и CRISPR/Cas9, их трансляция в клиническую практику осложнена запретом на прямое редактирование генома человека [31]. Тем не менее активно исследуются модифицированные ИПСК, использование которых позволяет подбирать как персонифицированную терапию, так и в целом разрабатывать подходы для лечения большого спектра различных заболеваний: от нейродегенеративных и онкологических до заболеваний сердечно-сосудистой системы и регенерации органов и тканей [32, 33]. Огромное число исследовательских групп активно применяют различные методы сборки генетических конструкций для создания и перепрограммирования ИПСК, в т.ч. технологию Golden Gate [34–36], что значительно ускоряет скорость сборки таких конструкций, и, как следствие, стоимость оценки их эффективности и безопасности.

Заключение

Критическими параметрами для сборки генетических конструкций, используемых для генной терапии, являются точность и скорость клонирования последовательностей в вектор, количество клонов, содержащих целевую последовательность, а также эффективность экспрессии трансгена в клетках-мишенях. Использование технологии Golden Gate удовлетворяет всем этим характеристикам и представляет собой мощный инструмент для быстрого создания сложных конструкций. Более того, Golden Gate позволяет собирать мультикомпонентные конструкции в одной пробирке с высокой скоростью и надежностью, а универсальность протокола и модульность клонирования, благодаря которым возможно создавать

кастомизированные конструкции, требуемые в персонализированной медицине, выгодно отличает Golden Gate от методов классического клонирования. Также уменьшение количества необходимых ферментов и расходных материалов делает методику Golden Gate более экономичной, чем стандартные подходы, применяемые сегодня во многих лабораториях. Благодаря этим особенностям молекулярное конструирование плазмидных векторов при Golden Gate может быть автоматизировано, в том числе и с применением компьютерных алгоритмов для упрощения дизайна и контроля выполнения клонирования.

Несмотря на то что молекулярное клонирование Golden Gate накладывает некоторые ограничения на этапе дизайна стратегий сборки, они не являются критичными. Необходимость удаления сайтов узнавания используемой рестриктазы IIS типа из финальной конструкции легко решается грамотным дизайном на стадии разработки стратегии клонирования, а набор эффективных нуклеотидных перекрывающихся последовательностей, необходимых для избежания неспецифичного лигирования фрагментов, хоть и ограничен, но все же их количество [22] достаточно для сборки мультигенных конструкций.

Финансирование: Исследование поддержано из средств программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» БФУ им. Канта

Funding: This research was supported from the Russian Federal Academic Leadership Program Priority 2030 at the Immanuel Kant Baltic Federal University.

Литература

1. Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S. A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. PLOS One. 2011;6(2):e16765. DOI: 10.1371/journal.pone.0016765
2. A Quick Overview Of Molecular Cloning. <https://www.goldbio.com/articles/article/cloning-overview> [Accessed March 31, 2024].
3. Williams SA, Slatko BE, McCarrey JR. Laboratory investigations in molecular biology. Jones and Bartlett Publishers, 2007.
4. Struhl K. Subcloning of DNA fragments. Current Protocols in Molecular Biology. 1991; 13(1):3.16. DOI: 10.1002/0471142727.mb0316s13
5. Shetty RP, Endy D, Knight TF Jr. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. Journal of Biological Engineering. 2008;2(1):5. DOI: 10.1186/1754-1611-2-5
6. Sleight SC, Bartley BA, Lieviant, JA, and Sauro HM. In-Fusion BioBrick assembly and re-engineering. Nucleic Acids Research. 2010;38(8):2624–2636. DOI: 10.1093/nar/gkq179

7. Hoseini S, Sauer MG. Molecular cloning using polymerase chain reaction, an educational guide for cellular engineering. *Journal of Biological Engineering*. 2015;9(1):2. DOI: 10.1186/1754-1611-9-2
8. Motohashi K. A novel series of high-efficiency vectors for TA cloning and blunt-end cloning of PCR products. *Scientific Reports*. 2019;9(1):6417. DOI: 10.1038/s41598-019-42868-6
9. Zhou MY, Gomez-Sanchez CE. Universal TA Cloning. *Current Issues in Molecular Biology*. 2000;2:1–7. DOI: 10.21775/cimb.002.001
10. Plasmid 101: TOPO Cloning <https://blog.addgene.org/plasmids-101-topo-cloning> [Accessed April 10, 2024].
11. Shuman S. Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88(22):10104–10108. DOI: 10.1073/pnas.88.22.10104
12. Shuman S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(51):32678–32684. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)31688-0
13. Reece-Hoyes JS, Walhout AJM. Gateway recombinational cloning. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018;2018(1):pdb.top094912. DOI: 10.1101/pdb.top094912
14. Chin CF, Chee JY. Gateway cloning technology: Advantages and drawbacks. *Cloning & Transgenesis*. 2015;04(01):1-3. DOI: 10.4172/2168-9849.1000138
15. Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CAIII, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*. 2009;6(5):343–345. DOI: 10.1038/nmeth.1318
16. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang RY, Algire MA, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*. 2010;329(5987):52–56. DOI: 10.1126/science.1190719
17. Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLOS One*. 2008;3(11):e3647. DOI: 10.1371/journal.pone.0003647
18. Engler C, Marillonnet S. Combinatorial DNA assembly using Golden Gate cloning. In *Synthetic Biology*. Humana Press. 2013;1073:141-156. DOI: 10.1007/978-1-62703-625-2_12
19. Chiasson D, Giménez-Oya V, Bircheneder M, Bachmaier S, Studtrucker T, Ryan J, et al. A unified multi-kingdom Golden Gate cloning platform. *Scientific Reports*. 2019;9(1):10131. DOI: 10.1038/s41598-019-46171-2
20. Potapov V, Ong JL, Kucera RB, Langhans BW, Bilotti K, Pryor JM, et al. Comprehensive profiling of four base overhang ligation fidelity by T4 DNA ligase and application to DNA assembly. *ACS Synthetic Biology*. 2018;7(11):2665–2674. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00333
21. Plasmid 101: Golden Gate Cloning <https://blog.addgene.org/plasmids-101-golden-gate-cloning> [Accessed April 17, 2024].
22. New England BioLabs: Golden Gate Assembly <https://international.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-assembly-and-cloning/golden-gate-assembly> [Accessed April 17, 2024].
23. Kues WA, Kumar D, Selokar NL, Talluri TR. Applications of genome editing tools in stem cells towards regenerative medicine: An update. *Current Stem Cell Research & Therapy* 2022;17(3):267–279. DOI: 10.2174/1574888X16666211124095527
24. Barker JC, Barker AD, Bills J, Huang J, Wight-Carter M, Delgado I, et al. Genome Editing of Mouse Fibroblasts by Homologous Recombination for Sustained Secretion of PDGF-B and Augmentation of Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2014;134(3):389e–401e. doi: 10.1097/PRS.0000000000000427
25. Niu W, Zang T, Zou Y, Fang S, Smith DK, Bachoo R, et al. In vivo reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain. *Nature Cell Biology*. 2013;15(10):1164–1175. doi: 10.1038/ncb2843
26. György B, Lööv C, Zaborowski MP, Takeda S, Kleinstiver BP, Commins C, et al. CRISPR/Cas9 Mediated Disruption of the Swedish APP Allele as a Therapeutic Approach for Early-Onset Alzheimer's Disease. *Molecular Therapy — Nucleic Acids*. 2018;11:429–440. doi: 10.1016/j.omtn.2018.03.007
27. Guo Z, Zhang L, Wu Z, Chen Y, Wang F, Chen G. In Vivo Direct Reprogramming of Reactive Glial Cells into Functional Neurons after Brain Injury and in an Alzheimer's Disease Model. *Cell Stem Cell*. 2014;14(2):188–202. doi: 10.1016/j.stem.2013.12.001

28. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients. *Cell Stem Cell*. 2013;13(6):653–658. doi: 10.1016/j.stem.2013.11.002
29. Firth AL, Menon T, Parker GS, Qualls SJ, Lewis BM, Ke E, et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Reports*. 2015;12(9):1385–1390. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.062
30. Cho HM, Lee KH, Shen Y ming, Shin TJ, Ryu PD, Choi MC, et al. Transplantation of hMSCs Genome Edited with LEF1 Improves Cardio-Protective Effects in Myocardial Infarction. *Molecular Therapy — Nucleic Acids*. 2020;19:1186–1197. doi: 10.1016/j.omtn.2020.01.007
31. О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности: федеральный закон от 12.07.1996 № 86-ФЗ; в ред. от 29.12.2022. Собрание законодательства РФ. 1996. № 28. Ст. 3348
32. Park S, Gwon Y, Khan SA, Jang KJ, Kim J. Engineering considerations of iPSC-based personalized medicine. *Biomaterials Research*. 2023;27(1):67. doi: 10.1186/s40824-023-00382-x
33. Kim C. Disease modeling and cell based therapy with iPSC: future therapeutic option with fast and safe application. *Blood Research*. 2014;49(1):7–14. doi: 10.5045/br.2014.49.1.7
34. Gao X, Yang J, Tsang JCH, Ooi J, Wu D, Liu P. Reprogramming to Pluripotency Using Designer TALE Transcription Factors Targeting Enhancers. *Stem Cell Reports*. 2013;1(2):183–197. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.06.002
35. Weltner J, Balboa D, Katayama S, Bepalov M, Krjutškov K, Jouhilahti EM, et al. Human pluripotent reprogramming with CRISPR activators. *Nature Communications*. 2018;9(1):2643. doi: 10.1038/s41467-018-05067-x
36. Weltner J, Trokovic R. Reprogramming of Fibroblasts to Human iPSCs by CRISPR Activators. *Methods Mol Biol*. 2021;2239:175–198. doi: 10.1007/978-1-0716-1084-8_12.

Об авторах

Антипина Мария Игоревна — инженер-исследователь НИЛ трансляционных исследований ОНК «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» БФУ имени И. Канта.

Ли Владислав Артурович — студент 4-го курса специалитета по направлению «Биоинженерия и биоинформатика» ОНК «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» БФУ имени И. Канта.

Попова Елизавета Евгеньевна — студентка 4-го курса специалитета по направлению «Биоинженерия и биоинформатика» ОНК «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» БФУ имени И. Канта.

Семина Екатерина Владимировна — д.б.н., зав. лаб. НИЛ трансляционных исследований ОНК «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» БФУ имени И. Канта.

Authors

Maria I. Antipina — Research Engineer at the Translational Research Laboratory of the Institute of Medicine and Life Sciences (MEDBIO) Immanuel Kant Baltic Federal University.

Vladislav A. Li — 4th-year student specializing in Bioengineering and Bioinformatics at the Institute of Medicine and Life Sciences (MEDBIO) Immanuel Kant Baltic Federal University.

Elizaveta E. Popova — 4th-year student specializing in Bioengineering and Bioinformatics at the Institute of Medicine and Life Sciences (MEDBIO) Immanuel Kant Baltic Federal University.

Ekaterina V. Semina — Dr. Sci. (Biology), Head of the Translational Research Laboratory at the Institute of Medicine and Life Sciences (MEDBIO) Immanuel Kant Baltic Federal University.

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-29-45>



Методы экстракции морского коллагена для решения задач регенеративной медицины

Ю.В. Куликова, С.А. Сухих, О.О. Бабич

НОЦ «Промышленные биотехнологии», ФГБОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», 236016, Калининград, улица Александра Невского, д. 14

Адрес для корреспонденции: stas-asp@mail.ru

Аннотация

Современная регенеративная медицина широко использует продукты и изделия на основе коллагена, наиболее популярным является коллаген животного происхождения. Использование такого коллагена сопряжено с рядом трудностей, в том числе с возникновением активных иммунных реакций, а также с ограничениями религиозного и культурного характера, не позволяющими использовать препараты, изготовленные из тканей животных. Удачной альтернативой коллагену из животных источников может служить морской коллаген, лишенный указанных недостатков. Сложившаяся геополитическая обстановка заставляет искать отечественные источники коллагена. В статье представлен обзор методов экстракции коллагена из биомассы медуз. Рассмотрены перспективные виды медуз, пригодные для реализации указанных методов. Показано, что на территории РФ наиболее продуктивным и перспективным следует считать медуз семейства Rhizostomatidae отряда корнероты (*Rhizostoma pulmo*), обитающих в Черном море. Медуза *Aurelia aurita* отряда дискомедуз (Semaestomeae), несмотря на свою распространенность (обитает почти во всех морях России), имеет низкое содержание сухих веществ в биомассе и сложна в добыче из-за маленького веса особей. Из рассмотренных методов экстракции применительно к биомассе медуз наиболее подходящей следует считать смешанную ферментативную и кислотную с использованием органических кислот экстракцию. Ферментативный метод с использованием пепсина применим к биомассе медуз *Aurelia aurita*, так как биомасса медуз полностью растворяется на первой стадии ферментативной экстракции.

Ключевые слова: коллаген, медузы, кислотная экстракция, регенеративная медицина, раны и ожоги

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Куликова Ю.В., Сухих С.А., Бабич О.О. Методы экстракции морского коллагена для решения задач регенеративной медицины. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(1):29–45. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-29-45>

Поступила 10.01.2024

Обработана 20.02.2024

Принята к публикации 15.03.2024

Marine collagen extraction methods for solving regenerative medicine problems

Yuliya V. Kulikova, Stanislav A. Sukhikh, Olga O. Babich

REC “Industrial Biotechnologies”, Immanuel Kant Baltic Federal University,
Alexander Nevsky Str., 14, 236041, Kaliningrad, Russia

Correspondence address: stas-asp@mail.ru

Abstract

Modern regenerative medicine widely uses collagen-based products and products, the most popular being collagen of animal origin. The use of such collagen is associated with a number of difficulties, incl. with the occurrence of active immune reactions, as well as with religious and cultural restrictions that do not allow the use of drugs made from animal tissue. Marine collagen, which does not have these disadvantages, can be a successful alternative to collagen from animal sources. The current geopolitical situation forces us to look for domestic sources of collagen. The article provides an overview of methods for extracting collagen from jellyfish biomass. Promising species of jellyfish suitable for implementing these methods are considered. It has been shown that on the territory of the Russian Federation, the most productive and promising jellyfish of the family Rhizostomatidae of the order of *Rhizostoma pulmo*, living in the Black Sea. The jellyfish *Aurelia aurita* of the order of disc jellyfish (Semaestomeae), despite its prevalence (lives in almost all seas of Russia), has a low content of dry substances in its biomass and is difficult to catch due to the small weight of individuals. Of the extraction methods considered in relation to jellyfish biomass, mixed enzymatic and acidic extraction using organic acids should be considered the most suitable. The enzymatic method using pepsin is applicable to the biomass of *Aurelia aurita* jellyfish, because the jellyfish biomass is completely dissolved in the first stage of enzymatic extraction.

Keywords: collagen, jellyfish, acid extraction, regenerative medicine, wounds and burns

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Kulikova Yu.V., Sukhikh S.A., Babich O.O. Marine collagen extraction methods for solving regenerative medicine problems. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(1):29–45. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-29-45>

Received 10.01.2024

Revised 20.02.2024

Accepted 15.03.2024

1. Введение

Статистика травм свидетельствует о росте частоты получения ожогов и ран у людей в результате несчастных случаев и хирургических вмешательств. Заживление ран является сложным физиологическим процессом. Заживлению ран могут препятствовать деструктивные дерматологические состояния, вызванные раневой инфекцией [1]. Поэтому актуальной является

разработка новых эффективных средств для лечения ожогов [2].

Во второй половине XX века интенсивно развивалась регенеративная медицина, ожоговая терапия, предполагающая использование тканеинженерных конструкций для формирования новой жизнеспособной ткани, стимулируя этим снижение зависимости от использова-

ния для пересадки донорской ткани. Однако иммунные отторжения, послеоперационные инфекции, требования к размерам донорских участков кожи ограничивают использование заменителей кожи [3].

Коллаген является перспективным биоматериалом для заживления ран. В основном коллаген и его производные получают из свиной и бычьей кожи и костей. К сожалению, в последние годы существует повышенный риск заражения человека губчатой энцефалопатией крупного рогатого скота. Также повсеместному использованию биоматериалов из отходов свиней и крупного рогатого скота (костей, сухожилий, кожи) препятствуют религиозные ограничения [4].

Морские организмы, такие как медузы, губки и другие беспозвоночные, а также рыбы, являются привлекательными источниками коллагена, поскольку не являются источниками заболеваний, которые могут передаваться человеку, и обладают высокой биосовместимостью [5]. Каркасы, состоящие из коллагенов, выделенных из морских источников, демонстрируют высокую биоразлагаемость и низкую иммуногенность [6].

Как упоминалось выше, биомасса медузы состоит в основном из белков, называемых коллагенами. Коллаген является основным компонентом медуз [7].

Растущий интерес к морским медузам связан с тем, что состав и структура их мезоглеи напоминают структуру кожной ткани человека [8]. При этом преимущества коллагенов медуз перед коллагенами млекопитающих обусловлены тем, что с коллагенами медуз не переносятся заболевания (губчатая энцефалопатия) [1]. В дополнение к заявленным фармакологическим свойствам пептиды коллагена, полученные из медуз, обладают потенциалом для ускорения заживления повреждений кожи, поэтому в будущем они могут стать основой для новых продуктов для лечения ран [9]. В связи с этим исследования, посвященные созданию коллагеновых препаратов из медуз для регенерации тканей кожи, являются весьма перспективными в области медицины и биотехнологии.

Целью данного обзора является оценка перспективных видов медуз, обитающих в морях Российской Федерации, с точки зрения получения

коллагена, а также анализ и выбор наиболее перспективного метода экстракции коллагена из биомассы медуз.

2. Анализ ресурсного потенциала медуз, обитающих в морях

Наиболее распространенными медузами Черного, Балтийского, дальневосточных морей и морей Северного Ледовитого океана являются: сцифоидные медузы видов *Aurelia aurita*, *Cyanea capillata*, гидроидные медузы *Aequorea spp.* и корнероты *Rhizostoma pulmo* [10–12]. Гидроидные медузы имеют чрезвычайно нежную биомассу и для промышленного вылова не подходят, в связи чем данный вид медуз был исключен из рассмотрения.

Aurelia aurita — вид медуз, принадлежащий классу *Scyphozoa*, обитающий в широком диапазоне температур и подвергавшийся разнообразным экологическим и молекулярным исследованиям [13]. Среда обитания *A. aurita* — прохладная соленая вода с течением, температура воды от -6 до $+31$ °C; наибольшее распространение имеют в водах с температурой $+9-19$ °C [14].

Медузы *A. aurita* имеют сложный жизненный цикл, который обычно включает как половое, так и бесполое размножение, при этом половое размножение происходит на стадии медузы, а полипы служат основной формой бесполого размножения [15]. У взрослой особи отсутствуют дыхательная, выделительная и кровеносная системы [14].

Состав желеобразной мезоглеи медуз изучался достаточно давно. Так, еще в 80-х годах прошлого века было установлено, что в мезоглее имеется два вида волокон: коллагеноподобные и «эластичные» или вертикальные волокна [16]. Система коллагеновых волокон придает устойчивость мезоглее [17, 18]. В работе Nara et al. (1996) показано, что «эластичные» волокна *A. aurita* содержат положительно заряженные белки, богатые лизином. Белки «эластичных» волокон также обогащены цистеином и, следовательно, дисульфидными связями [20].

Общий химический состав тела медуз схож: низкое содержание жиров и углеводов и высокое содержание белка и минеральных солей. В таблице 1 представлен компонентный состав тела медузы на примере *A. aurita*.

Таблица 1. Компонентный состав медузы *A. aurita* [21]

Компонент	Содержание, % (сухой вес)
Влага	98,67
Зола на а.с.в.*	22,81
Сырой жир на а.с.в.	0,30
Углеводы на а.с.в.	7,13
Белки на а.с.в.	69,76

Примечание: * а.с.в. — абсолютно сухое вещество.

Rhizostoma pulmo — крупная и тяжелая беловатая изначально средиземноморская медуза с фиолетовыми краями, которая сейчас активно расселяется в Черном и Азовском морях.

Благодаря своему весу *R. pulmo* способна разрывать рыболовные сети (сообщалось, что в некоторые весенние месяцы вес медуз превышал вес пойманных рыб) [22, 23]. *R. pulmo* считается самой крупной медузой Черного моря, встречается обычно поздней весной, когда температура повышается до 25,5 °С [24].

Основным достоинством данного вида следует считать тот факт, что токсины, выделяемые медузами, имеют небелковую природу, в связи чем могут легко удаляться при реализации технологии получения коллагена [22, 23].

Согласно проведенным исследованиям биомасса медуз *R. pulmo*, выловленных в Азовском море, имеет содержание сухих веществ на уровне 1,5–2,3%, отличается высокой зольностью. На долю белков приходится 72,1% беззольной массы (табл. 2).

3. Типы и распространение коллагена

Коллаген обладает большой прочностью на разрыв, что обуславливает его присутствие в сухожилиях, костях, хрящах, фасциях и т. д. Он обеспечивает эластичность и прочность кожи, также обеспечивает защиту кожи, препятствуя всасыванию токсинов и патогенов [26]. Коллаген в терапевтических препаратах помогает в заживлении поврежденных костей или кровеносных сосудов и способствует регенерации кожи [27].

Таблица 2. Компонентный состав медузы *R. pulmo* [25]

Компонент	Содержание, % (сухой вес)
Влага	97,7–98,5
Зола на а.с.в.*	60,6
Сырой жир на а.с.в.	0,6
Углеводы на а.с.в.	10,4
Белки на а.с.в.	28,4

Примечание: * а.с.в. — абсолютно сухое вещество.

Коллаген как биополимерная структура образован тремя полипептидными цепями, соединенными между собой в тройную спираль водородными связями. Эта структура содержит две идентичные цепи ($\alpha 1$) и одну несколько отличающуюся по химическому составу ($\alpha 2$). Общая структура молекулы коллагена характеризуется повторением доменов «глицин-Х-У», где «Х» и «У» представлены разными аминокислотами. Этот паттерн приводит к образованию тройной спирали из трех полипептидных цепей, обнаруженной у всех коллагеновых белков [28]. Различные типы можно сгруппировать в категории в соответствии с их структурой, к которым относятся: 1) фибриллярный коллаген (типы I, II, III, V, XI, XXIV и XXVII); 2) коллаген базальной мембраны (типы IV, VII и XXVIII); 3) короткоцепочечные коллагены (типы VI, VIII и X); и 4) фибрилл-ассоциированные коллагены (типы IX, XII, XIV, XVI и с XIX по XXII) [28]. Конкретный тип коллагена определяют путем физико-химических (растворимость, электрофорез и др.) и спектроскопических (FTIR, DC, Raman и др.) исследований извлеченного материала.

Коллаген типа I широко распространен в коже, костях [29], сухожилиях [28, 29] рыб [30–33], у морских беспозвоночных, таких как *Apostichopus japonicus* (морской огурец) [34]. Коллаген типа II обнаружен в хряще [35], стекловидном теле, хрящевых зонах сухожилий, межпозвоночном диске [28], костях и коже рыб [36, 37], он также был извлечен из морских беспозвоночных, таких как медузы [38]. Коллаген типа IV расположен в базальной мембране [28, 29, 39], его супрамолекулярная структура образована нефибриллярной сеткой [28]. Этот тип выявлен

у морских беспозвоночных, таких как брюхоногие моллюски [40] и морские губки [41, 42]. Коллаген типа V в основном обнаруживается в плацентарной/эмбриональной ткани, дерме, костях, мышцах, легких [43], роговице рыб [28, 29], а также, вместе с коллагеном типа I, у морских беспозвоночных [44–46]. Тип XI, фибриллы которого идентичны коллагену типа V [29, 46], найден в хряще, скелетных мышцах, плаценте, легких, сухожилиях, семенниках, трахее [47]. Тип XV и тип XVIII расположены в областях базальной мембраны [48, 49].

4. Основные направления использования коллагена

Благодаря своей стабильности, эластичности и иммунофизиологическим свойствам коллаген находит широкое применение в различных областях медицины, фармацевтики, косметологии и пищевой промышленности. Известно множество разработок на основе коллагена, выделенного из побочных продуктов мясоперерабатывающей промышленности. В то же время активно ведутся исследования по применению коллагена из морских альтернативных источников. Морской коллаген в последние десятилетия вызывает большой интерес как «голубой ресурс». Доступность субпродук-

тов рыбоперерабатывающей промышленности является ключевым фактором, стимулирующим исследования по производству на их основе продуктов с высокой добавленной стоимостью и низким воздействием на окружающую среду. К тому же морской коллаген обладает рядом преимуществ относительно коллагена, выделяемого из млекопитающих животных (табл. 3).

Коллаген используется в фармацевтической промышленности для изготовления микрокапсул, инъекционных дисперсий, систем доставки лекарств [51–53]. В современной медицине коллаген играет важную роль — он помогает в восстановлении хрящевой ткани и костей в случаях их повреждения [54, 55]. Эти разработки нашли свое применение во многих областях медицины: в кардиологии (сердечные клапаны), в дерматологии (трансплантация кожи, инженерия кожных тканей, искусственная дерма), в хирургии (как кровоостанавливающее средство, для заживления ран, восстановления нервов), в ортопедии (восстановление сухожилий, костей и связок, реконструкция хряща), в офтальмологии (трансплантаты роговицы, контактные линзы), в урологии (мембранный гемодиализ) [56]. Эти биоматериалы производятся чаще всего

Таблица 3. Сравнительная характеристика коллагена из различного сырья [50]

Коллаген млекопитающих	Морской коллаген
Низкая стоимость	Высокая стоимость
Высокая температура плавления	Относительно низкая температура плавления
Трудное извлечение (низкая доступность)	Легкодоступен (большое количество)
Растворим в органическом растворителе	Растворим в кислотах
Имеется риск передачи заболеваний	Нет риска передачи заболеваний
Низкое содержание GLX и ALA при высоком PRO	Высокое содержание GLX и ALA при низком PRO
Содержит 7 незаменимых аминокислот	Содержит 10 незаменимых аминокислот
pH раствора 6,3–6,7	pH раствора 6,9–7,3
Молекулярная масса коллагена около 300 кДа, длина 300 нм, толщина 1,5 нм	Молекулярная масса коллагена около 200 кДа, длина 100 нм, толщина 1,0 нм

из фибриллообразующего коллагена, который включает типы I и редко II. Типы III, V, XI используются в основном в научных исследованиях [52, 53]. Примеры биомедицинского применения коллагена, выделенного из медуз, представлены в таблице 4.

5. Теоретические сведения о параметрах экстракции коллагена из биомассы медуз

При описании экстракции коллагена из субпродуктов рыболовства и аквакультуры авторы часто упоминают о необходимости предварительной промывки сырья дистиллированной водой и раствором хлорида натрия (NaCl) для удаления примесей и жиров. Далее сырье обрабатывают щелочными растворами для удаления примесей неколлагеновых белков с использованием растворов гидроксида натрия (NaOH), перекиси водорода (H₂O₂), гидроксида кальция (Ca(OH)₂) или их комбинации, после чего следует обработка бутиловым спиртом (10%) для удаления маслянистых веществ [30].

Среди методов экстракции коллагена из альтернативных источников, в частности из медуз рода *Aurelia*, наиболее часто встречаются следующие варианты: 1) солевая обработка для экстракции с использованием хлорида натрия (NaCl) [61, 62] и/или гидрохлорида гуанидина [63], имеющая среди недостатков низкий выход целевого продукта; 2) кислотная обработка экстрактов с использованием уксусной [64], молочной, лимонной [65], соляной [66], муравьиной, серной или винной кислот [67]; и 3) ферментативная обработка с использованием коммерческих ферментов (и/или очищенных ферментов), таких как пепсин [27, 61, 62, 68], папаин [62, 70, 71] и/или коллагеназа [67, 72]. При этом виде обработки экстракция происходит в среде, содержащей органическую кислоту с добавлением фермента (например, пепсина). Сообщается, что использование неорганических кислот, таких как HCl и H₂SO₄, менее эффективно при экстракции по сравнению с органическими кислотами [67].

Таблица 4. Биомедицинские разработки на основе коллагена, выделенного из медуз

Источник коллагена	Техника получения	Назначение	Биологическая функция	Результаты	Источник
<i>Rhopilema sculentum</i>	Лиофилизация, EDC-сшивка	Регенерация хрящевой ткани	Первичные хондроциты носовой перегородки человека и крысы. Модель дефекта перегородочного хряща крысы <i>in vivo</i>	Усиление адгезии и выработка белков хрящевого матрикса. Уменьшение перфораций носовой перегородки	[57]
			Первичные мезенхимальные стволовые клетки человека	Индукцированная хондрогенная дифференцировка	[58]
<i>Stomolophus meleagris</i>	Электроспиннинг	Регенерация сосудистой ткани	Клетки гладких мышц. Эндотелиальные клетки	Усиленная пролиферация клеток. Индуцированное выравнивание клеток. Усиление развития эндотелиальных клеток	[59]
Биомиметически минерализованный коллаген лосося и фибриллированный коллаген медузы	Лиофилизация, EDC-сшивка	Регенерация костной ткани	Мезенхимальные и стромальные клетки человека, полученные из костного мозга	Индукцированная хондрогенная и остеогенная дифференцировка	[60]

Анализ литературы показывает, что наибольшие выходы коллагена достигаются при использовании на первой стадии ферментативной, а на второй — кислотной экстракции, которые применяются последовательно с целью оптимизации конечного выхода коллагена. В таблице 5 представлены данные о количественном выходе коллагена в зависимости от метода экстракции и вида (типа) сырья.

5.1. Кислотная экстракция

Коллаген чаще всего извлекают путем гидролиза с использованием кислот или щелочей. Как неорганические, так и органические кислоты могут эффективно расщеплять связи в коллагене, обеспечивая экстракцию фибрилл [81]. Обычно

используются органические кислоты: уксусная, хлоруксусная, лимонная и молочная. Чаще всего авторы сообщают об использовании уксусной кислоты для экстракции коллагена [81–89]. Среди неорганических кислот обычно используются соляная, серная и азотная кислоты [89–92]. Органические кислоты, по-видимому, более эффективны для расщепления поперечных связей коллагена и позволяют добиться более высокого выхода экстракции по сравнению с минеральными кислотами [82, 89, 93]. Органические кислоты также солюбилизируют несшитые коллагены [92].

Кислотная экстракция коллагена медузы описана в работах авторов Miura и Kimura (1985)

Таблица 5. Содержание коллагена (в процентах от сухой или влажной массы) в различных видах *Scyphomedusae*, экстрагированных с использованием разных методов

Источник коллагена	Часть тела	Выход	Метод экстракции	Источник
<i>Aurelia aurita</i>	Целый организм	0,01% (влажный вес)	Ферментативная	[73]
<i>Rhopilema esculentum</i>	Ротовые лопасти	4,31% (влажный вес)	Ферментативная	[74]
<i>Rhopilema esculentum</i>	Мезоглея	0,12% (влажный вес)	Кислотная	[75]
		0,28% (влажный вес)	Ферментативная	[75]
<i>Chrysaora sp.</i>	Купол	9–19% (влажный вес)	Ферментативная	[38]
<i>Acromitus hardenbergi</i>	Купол / ротовые лопасти	37–40% (влажный вес)	Кислотная/ферментативная	[76]
<i>C. mosaicus</i>	Не описано	1–2% (влажный вес)	Кислотная	[77]
<i>Pelagia noctiluca</i>	Целый организм	0,07% (влажный вес)	Ферментативная	[73]
<i>Cotylorhiza tuberculata</i>	Ротовые лопасти	19,4% (влажный вес)	Ферментативная	[73]
	Купол	4,5% (влажный вес)	Ферментативная	[73]
<i>Rhizostoma pulmo</i>	Купол	8,3–31,5% (влажный вес)	Ферментативная	[73]
	Ротовые лопасти	26–90% (влажный вес)	Ферментативная	[73]
<i>Cassiopea andromeda</i>	Целый организм	2,2–6,0% (влажный вес)	Ферментативная	[78]
<i>Catostylus tagi</i>	Купол	2,7% (влажный вес)	Ферментативная	[46]
<i>Cotylorhiza tuberculata</i>	Купол	<10% (сухой вес)	Ферментативная	[73]
<i>Rhizostoma pulmo</i>	Купол	<10% (сухой вес)	Ферментативная	[73]
<i>Rhopilema asamushi</i>	Мезоглея	35,2% (сухой вес)	Ферментативная	[79]
<i>Stomolophus meleagris</i>	Мезоглея	46,4% (сухой вес)	Ферментативная	[80]
<i>Nemopilema nomurai</i>	Мезоглея	2,2% (сухой вес)	Ферментативная	[12]

и Nagai et al. (2000). Вкратце, ткани медузы промывали дистиллированной водой и 0,1 М NaOH. После чего экстрагировали в 0,5 М уксусной кислоте (1:1000 мас./об.) в течение трех дней, экстракцию повторяли дважды. Экстракты, собранные путем фильтрования и отжима нерастворимой мезоглеи через марлю, подвергались интенсивному диализу против 0,02 М Na₂HPO₄. Полученные осадки собирали центрифугированием при 6000 g в течение 30 мин при 4 °С и растворяли в 0,5 М уксусной кислоте. После центрифугирования при 20 000 g в течение 1 часа к надосадочной жидкости добавляли твердый NaCl до конечной концентрации 0,9 М. Осажденную хлоридом фракцию (кислотно растворимый коллаген) повторно растворяли в 0,5 М уксусной кислоте, диализовали против 0,1 М уксусной кислоты, а затем лиофилизировали [15, 79].

Метод экстракции коллагена, приводящий к увеличению гомогенности и солюбилизации обезвоженных тканей медузы, описан авторами Yusoff et al. (2013). Вкратце, ткани медузы промывались дистиллированной водой и три-

жды 0,1 М раствором NaOH. После чего экстрагировались в 0,5 М уксусной кислоте (1:1, вес/объем) при интенсивном перемешивании. Затем суспензию подвергали обработке ультразвуком в течение 15 минут (PowerSonic, Корея) с последующим перемешиванием в течение 1 часа при температуре 4 °С (ИКА, Германия). Экстракты тщательно диализовали против 0,02 М фосфатного буфера, pH 7,2 (1:10, по объему). Полученный осадок повторно растворяли в 0,5 М растворе уксусной кислоты, а коллаген осаждали добавлением NaCl до конечной концентрации 0,9 М. Осадок отделяли и очищали перерастворением в 0,5 М уксусной кислоте и последующим диализом против 0,1 М уксусной кислоты, затем 0,05 М уксусной кислоты и 0,025 М уксусной кислоты. Чистый коллаген получали при лиофилизации суспензии диализированного экстракта [94].

В работе Khong et al. (2018) приводится сравнение характеристик коллагена, полученного разными методами из разных частей тела медузы, по его составу, pH, pI и внешнему виду (табл. 6).

Таблица 6. Характеристики коллагена, экстрагированного из медузы (*Acromitus hardenbergi*) [76]

Параметры	Купол			Ротовые лопасти		
	Кислотная экстракция	Ферментативная экстракция	Ультразвуковая экстракция	Кислотная экстракция	Ферментативная экстракция	Ультразвуковая экстракция
Влага, %	7,14 ± 0,20	6,29 ± 0,04	7,43 ± 0,02	8,33 ± 0,15	6,46 ± 0,01	7,50 ± 0,05
Содержание белка, %	54,94 ± 0,08	77,59 ± 1,44	78,39 ± 0,97	65,20 ± 1,12	77,01 ± 2,14	78,28 ± 1,01
Содержание жиров, %	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Содержание углеводов, %	8,65	13,36	11,96	9,08	8,69	10,36
Содержание золы, %	29,27 ± 1,83	2,76 ± 0,57	2,22 ± 0,32	17,39 ± 0,51	7,84 ± 0,25	3,26 ± 1,26
Изоэлектрическая точка, pI	4,92 ± 0,31	4,46 ± 0,24	6,04 ± 0,37	5,40 ± 0,47	4,93 ± 0,35	6,41 ± 0,07
pH	2,81 ± 0,06	2,79 ± 0,07	2,84 ± 0,04	2,86 ± 0,02	2,92 ± 0,10	2,87 ± 0,08
Внешний вид	Тусклый белый с легкой текстурой	Желтоватый и легкий по текстуре	Белый с воздушной текстурой	Тусклый, слегка желтоватый, легкая текстура	Желтоватый и светлый по текстуре	Белоснежный с воздушной текстурой

5.2. Щелочная экстракция

Щелочной гидролиз также можно использовать для экстракции коллагена, чаще всего с помощью раствора гидроксида натрия или гидроксида калия [94], хотя в качестве экстрагентов также можно использовать оксид кальция, гидроксид кальция и карбонат натрия [95]. Однако щелочи имеют тенденцию гидролизовать коллаген [81] и разрушать аминокислоты цистеин, гистидин, серин и треонин [94, 95]. Использование щелочного гидролиза, по-видимому, ограничивается экстракцией коллагена из жестких материалов: отходов обработки кожи крупного рогатого скота, и не встречается в литературе при работе с мезоглеей медуз [81, 96, 97].

5.3. Ферментативная экстракция

Метод ферментативной экстракции имеет потенциал для получения значительного выхода коллагена высокой чистоты [81]. Недостатком является то, что ферменты, как правило, намного дороже кислот, щелочей и солей. Однако по сравнению с химическими методами ферментативная обработка менее агрессивна к технологическому оборудованию, требует меньше энергии, оставляет меньше отходов, а конечный экстракт имеет более низкое содержание примесей [81, 98].

При экстракции коллагена используются протеолитические ферменты животного происхождения (например, трипсин, пепсин), растительного происхождения (например, бромелайн, папаин, фицин) или продуцируемые микроорганизмами одиночные или смешанные ферменты (например, коллагеназа, протеиназа К, Алкалаза® (Novozymes, Bagsværd, Дания), Nutrase® (Nutrex, Hoogbuul, Бельгия), Flavourzyme® (Novozymes, Bagsværd, Дания) и Protamex® (Novozymes, Bagsværd, Дания)). Наибольшее распространение характерно для пепсина животного происхождения [82, 90, 94]. Пепсин, трипсин и папаин действуют только на неспиралевидную часть пептидной цепи коллагена (концы) и оставляют нетронутой структурно важную спиральную часть [81]. Кроме того, экстрагированный пепсинорастворимый коллаген обычно имеет более высокую чистоту, поскольку неколлагеновые белки эффективно гидролизуются ферментом. Обработка пепсином также увеличивает растворимость коллагена в кислой среде, что повышает эффективность экстракции [99].

Метод ферментативной экстракции, на который часто ссылаются в работах о коллагене, описан у авторов Miura and Kimura (1985) и Nagai et al. (2000). Вкратце, ткани медузы промывали дистиллированной водой и 0,1 М раствором NaOH. Нерастворимый остаток ресуспендировали в 0,5 М уксусной кислоте (1:100 мас./об.) и расщепляли 10% (мас./об.) пепсином в течение 48 часов при 4 °С. Солюбилизованный пепсином коллаген отделяли центрифугированием при 20 000 g в течение 1 часа, далее супернатант диализовали против 0,02 М Na₂HPO₄ (pH 7,2) в течение трех дней. Коллаген высаливали добавлением NaCl до конечной концентрации 1,0 М. Осадок отделили центрифугированием при 20 000 g в течение 1 ч и растворили в 0,5 М уксусной кислоте. После раствор диализовали против 0,1 М уксусной кислоты, а затем лиофилизировали [15, 79].

Для выделения коллагена также применяют микроволны, которые разрушают структуру клеток и тканей [100, 101], облегчая экстракцию. Было обнаружено, что использование микроволнового излучения ускоряет действие кислот и ферментов по сравнению с эквивалентной экстракцией без микроволн [100].

5.4. Комбинированная экстракция

Среди вышеупомянутых методов экстракции наиболее часто встречаются варианты исполнения, в которых пепсин-растворимый коллаген получают ферментативной обработкой коллагена после кислотной экстракции.

Авторы Nagai T. et al. (1999) описывали следующую методику: мезоглею медузы измельчили с помощью машины для гомогенирования тканей (IKA T10 Basic ULTRA-TURRAX, Штауфен, Германия). Далее мезоглею обрабатывали 0,6 М раствором уксусной кислоты при постоянном перемешивании при 4 °С в течение 72 часов. Смесь фильтровали через марлю для удаления нерастворимых компонентов. Затем в фильтрат вносили твердый NaCl до конечной концентрации 0,9 М и осадок кислотно-растворимого коллагена собирали центрифугированием при 4000 g в течение 15 минут [80].

Пепсин-растворимый коллаген готовили путем внесения кислотно-растворимого коллагена в 20 объемов 0,5 М уксусной кислоты, содержащей 1% пепсина (по массе, ЕС 3.4.23.1, Sigma, США). После инкубации при 4 °С в течение

при этом время экстракции варьируется от 24 до 72 часов [12, 79, 81–89, 92, 93]. Именно эти границы варьирования и третий указанный способ экстракции рекомендован к дальнейшему рассмотрению при проработке технологии экстракции коллагена.

Ферментативная экстракция является наиболее распространенным методом извлечения коллагена из биомассы животных, т.к. отличается высоким выходом продукта и безопасностью [112]. Для экстракции коллагена используют протеазы, такие как пепсин [113, 114] папаин [115, 116] и трипсин [117]. Высокий выход коллагена при ферментной обработке связан с усилением расщепления телопептидов в тропоколлагене [118]. Использование папаина во многом связано с вопросами халяльности, т.к. в большинстве случаев пепсин получают с использованием туш свиней. Большое количество исследований ферментной экстракции коллагена описывают опыт применения пепсина. Khong [76] для экстракции коллагена пепсином из медузы *Acromitus hardenbergi* суспендировал обрабатываемую биомассу в 0,5 М уксусной кислоте (1:100 мас./об.) и расщеплял 0,1% (мас./об.) пепсином в течение 48 часов при 4 °С. Addad et al. [73] использовали аналогичный подход, а именно: осадок растворяли в 0,1 М уксусной кислоте и добавляли пепсин (2–15 мг пепсина/мг влажной ткани).

При разработке технологии экстракции морского коллагена предстоит решить целый ряд технологических задач при условии его дальнейшего использования для изготовления препаратов и изделий для регенеративной медицины, в том числе:

- 1) подбор условий сушки полученного коллагена с применением методов сублимации и лиофилизации;
- 2) стерилизация коллагена с применением газового или радиационного воздействия;
- 3) обеспечение необходимых гидродинамических свойств коллагена методами физико-химической модификации;
- 4) очистка коллагена от загрязнений, которые могут повлиять на цитотоксичность, безопасность, аллергенные свойства материалов и изделий из него.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, договор № 075-15-2023-601 (вн. № 13.2251.21.0219)

Funding: The work was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, the agreement 075-15-2023-601 (№ 13.2251.21.0219)

Литература

1. Cadar E, Pesterau AM, Sirbu R, Negreanu-Pirjol BS, Tomescu CL. Jellyfishes —Significant Marine Resources with Potential in the Wound-Healing Process: A Review. *Mar. Drugs*. 2023;21(4):201.
2. Hu Z, Yang P, Zhou C, Li S, Hong, P. Marine collagen peptides from the skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Characterization and wound healing evaluation. *Mar. Drugs*. 2017;15(4):102.
3. Lahmar A, Rjab M, Sioud F, Selmi M, Salek A, Kilani-Jaziri S, Chekir Ghedira L. Design of 3D Hybrid Plant Extract/Marine and Bovine Collagen Matrixes as Potential Dermal Scaffolds for Skin Wound Healing. *Sci. World J.* 2022;1:8788061.
4. Pozzolini M, Millo E, Oliveri C, Mirata S, Salis A, Damonte G, Scarfi S. Elicited ROS scavenging activity, photoprotective, and wound-healing properties of collagen-derived peptides from the marine sponge *Chondrosia reniformis*. *Mar. Drugs*. 2018;16(12):465.
5. Geahchan S, Baharlouei P, Rahman A. Marine collagen: a promising biomaterial for wound healing, skin anti-aging, and bone regeneration. *Mar. Drugs*. 2022;20(1):61.
6. Davison-Kotler E, Marshall WS, García-Gareta E. Sources of collagen for biomaterials in skin wound healing. *Bioengineering*. 2019;6(3):56.
7. D’Ambra I, Merquiol, L. Jellyfish from fisheries by-catches as a sustainable source of high-value compounds with biotechnological applications. *Mar. Drugs*. 2022;20(4):266.
8. Fernández-Cervantes I, Rodríguez-Fuentes N, León-Deniz LV, Quintana LEA, Cervantes-Uc JM, Kao WAH, et al. Cell-free scaffold from jellyfish *Cassiopea andromeda* (Cnidaria; Scyphozoa) for skin tissue engineering. *Mater. Sci. Eng.* 2020;111:110748.

9. Felician FF, Yu RH, Li MZ, Li CJ, Chen HQ, Jiang Y, et al. The wound healing potential of collagen peptides derived from the jellyfish *Rhopilema esculentum*. *Chin J Traumatol*. 2019;22(01):12–20.
10. Заволокин А.В. Медузы дальневосточных морей России. 1. Видовой состав и распространение. *Известия ТИНРО*. 2010;163:45–46.
11. Brodeur RD, Sugisaki H, Hunt Jr. JL. Increases in jellyfish biomass in the Bering Sea: implications for the ecosystem. *Mar. Ecol. Prog.* 2002;233:89–103.
12. Александров СВ, Гусев АА, Дмитриева ОА, Семонова АС, Чукалова НН. Планктонные и бентосные сообщества Балтийского моря у Северного побережья Самбийского полуострова летом и осенью 2017 года. *Труды АТЛАНТИРО*. 2019;3(2(8)):38–58.
13. Miyake H, Iwao K, Kakinuma Y. Life history and environment of *Aurelia aurita*. *South Pacific Study*. 1997;17(2):273–285.
14. Tardent P. Coelenterata, Cnidaria. In: T Seidel, editor. *Morphogenesis der Tiere*. New York: Gustav Fischer Verlag (1978). 391 p.
15. Dong J, Sun M, Wang B. Comparison of life cycles and morphology of *Cyanea nozakii* and other scyphozoans. *Plankton and Benthos Research*. 2008;3:118–124.
16. Fuchs B, Wang W, Graspentner S, Li Y, Insua S, Herbst E-M, et al. Regulation of polyp-to-jellyfish transition in *Aurelia aurita*. *Curr Biol*. 2014;24(3):263–273.
17. Elder HY. Distribution and functions of elastic fibers in the invertebrates. *Biol Bull*. 1973;144:43–63.
18. Tillet E, Franc JM, Franc S, Garrone R. The evolution of fibrillar collagens: a sea-pen collagen shares common features with vertebrate type V collagen. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1996;113:239–246.
19. Bouillon J, Vandermeerssche G. Structure et nature de la mésogléе des hydro-et scyphoméduses. *Ann Soc R Zool Belg*. 1956;87:9–25.
20. Napara TO, Oskol'sky AA, Chaga OY. Mesogleal cells of *Aurelia aurita* (Cnidaria: Scyphozoa). II. Ultrastructural and cytochemical study. *TSITOLOGIIA-ROSSIISKAIA AKADEMIJA NAUK*. 1996;38:456–464.
21. Nurokhmatunnisa PD, Arifah AN. Utilization of Jellyfish (*Aurelia aurita*) as Functional Food to Increase Human Body Stamina Report of Student Creativity. Indonesia: Bogor Agriculture University Indonesia (2013).
22. Rottini-Sandrini L, Avian M, Franchi N, Troian A, Vio E. Le derangement et le dommage que les floraisons de méduses causent a la pêche. *UNEP: Workshop on Jellyfish Blooms in the Mediterranean, Athens; UNEP: Athens, Greece*. (1984). p. 35–44
23. Rottini-Sandrini L, Stravisi F, Avian M, D'Angela D, Del la Loggia R, Del Negro P; et al. MED POL II Programme “Jellyfish in the Mediterranean Sea”. C.I.M.A.M. final report. *UNEP: Jellyfish blooms in the Mediterranean Proceedings of the II Workshop on Jellyfish in the Mediterranean Sea MAP Tech Rep Ser, No 47; UNEP: Athens, Greece*. (1991). p. 147–162
24. Kideys AE, Kovalev AV, Shulman G, Gordina A, Bingel F. A review of zooplankton investigations of the Black Sea over the last decade. *J Mar Syst*. 2000;24:355–371.
25. Битютская ОЕ, Белякова ИА, Мазалова НФ, Есина ЛМ, Булли ЛИ. Функционально-технологические свойства и пищевая ценность медузы *Rhizostoma pulmo*. *Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство*. 2022;3:82–91.
26. Fratzl P. *Collagen: Structure and Mechanics*. New York: Springer (2008). 496 p.
27. Buehler MJ. Nature designs tough collagen: Explaining the nanostructure of collagen fibrils. *PNAS*. 2006;103(33):12285–12290.
28. Felician FF, Xia C, Qi W, Xu H. Collagen from marine biological sources and medical applications. *Chem Biodivers*. 2018;15(5):e1700557.
29. Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, et al. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. *Adv. Mater*. 2019;31(1):1801651.
30. Oliveira VM, Neri RCA, Monte FTDM, Roberto NA, Costa HMS, Assis CRD, et al. Crosslink-free collagen from *Cichla ocellaris*: structural characterization by FT-IR spectroscopy and densitometric evaluation. *J. Mol. Struct*. 2019;1176:751–758.

31. Alves AL, Marques ALP, Martins E, Silva TH, Reis RL. Cosmetic potential of Marine fish skin collagen. *Cosmetics*. 2017;4:39.
32. Ali AMMM, Benjakul S, Kishimura H. Molecular characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the scales of golden carp (*Probarbus jullieni*), *Emirates J. Food Agric*. 2017;29:450–457.
33. He L, Lan W, Wang Y, Ahmed S, Liu Y. Extraction and characterization of self-assembled collagen isolated from grass carp and crucian carp, *Foods*. 2019;8:396.
34. Tian M, Xue C, Chang Y, Shen J, Zhang Y, Li Z, Wang Y. Collagen fibrils of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) are heterotypic, *Food Chem*. 2020;316:126272.
35. He Y, Gudmann NS, Bay-Jensen AC, Karsdal MA, Engstroem A, Thudium SC. Type II collagen. In: M.A. Karsdal (Ed.), *Biochem. Collagens, Laminins Elastin Struct. Funct. Biomarkers*, second ed., Elsevier Inc. (2019). p. 13–22
36. Jeevithan E, Bao B, Zhang J, Hong S, Wu W. Purification, characterization and antioxidant properties of low molecular weight collagenous polypeptide (37kDa) prepared from whale shark cartilage (*Rhincodon typus*). *J. Food Sci. Technol*. 2015;52:6312–6322.
37. Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Shahidi F. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *LWT*. 2000;43:792–800.
38. Barzideh Z, Latiff AA, Gan CY, Benjakul S, Karim AA. Isolation and characterisation of collagen from the ribbon jellyfish (*Chrysaora* sp.). *Int. J. Food Sci. Technol*. 2014;49:1490–1499.
39. Sand JMB, Genovese F, Gudmann NS, Karsdal MA. Type IV collagen. In: M.A. Karsdal (Ed.), *Biochem. Collagens, Laminins Elastin Struct. Funct. Biomarkers*, Second Edi, Elsevier Inc (2019). p. 37–49.
40. Chovar-Vera O, Valenzuela-Muñoz V, Gallardo-Escárate C. Molecular characterization of collagen IV evidences early transcription expression related to the immune response against bacterial infection in the red abalone (*Haliotis rufescens*). *Fish Shellfish Immunol*. 2015;42:241–248.
41. Ehrlich H, Wysokowski M, Zółtowska-Aksamitowska S, Petrenko I, Jesionowski T. Collagens of poriferan origin, *Mar. Drugs*. 2018;16:79.
42. Pozzolini M, Bruzzone F, Berilli V, Mussino F, Cerrano C, Benatti U, Giovine M. Molecular characterization of a nonfibrillar collagen from the marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo 1847 and positive effects of soluble silicates on its expression, *Mar. Biotechnol*. 2012;14:281–293.
43. Leeming DJ, Karsdal MA. Type V collagen. In: M.A. Karsdal (Ed.), *Biochem. Collagens, Laminins Elastin Struct. Funct. Biomarkers*, second ed., Elsevier Inc. (2019). p. 51–57.
44. Cozza N, Bonani W, Motta A, Migliaresi C. Evaluation of alternative sources of collagen fractions from *Loligo vulgaris* squid mantle. *Int. J. Biol. Macromol*. 2016;87:504–513.
45. Oliveira VM, Carneiro da Cunha MN, Nascimento TP, Assis CRD, Bezerra RS, Porto ALF. Collagen: general characteristics and production of bioactive peptides — a review with emphasis on byproducts of fish. *Acta Fish. Aquat. Resour*. 2017;5:70–82.
46. Calejo MT, Morais ZB, Fernandes AI. Isolation and biochemical characterisation of a novel collagen from *catostylus tagi*. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed*. 2009;20:2073–2087.
47. Luo YY, Szlarski PM, Kehlet SN, Karsdal MA. Type XI collagen. In: M.A. Karsdal (Ed.), *Biochem. Collagens, Laminins Elastin Struct. Funct. Biomarkers*, second ed. Elsevier Inc. (2019). p. 99–106.
48. Manon-Jensen T, Arvanitidis A, Karsdal MA. Type XV collagen. In: M.A. Karsdal (Ed.), *Biochem. Collagens, Laminins Elastin Struct. Funct. Biomarkers*, second ed. Elsevier Inc. (2019). p. 127–131.
49. Pehrsson M, Bager CL, Karsdal MA. Type XVIII collagen. In: M.A. Karsdal (Ed.), *Biochem. Collagens, Laminins Elastin Struct. Funct. Biomarkers*, second ed. Elsevier inc. (2019). p. 149–162.
50. Subhan F, Ikram M, Shehzad A, Ghafoor A. Marine Collagen: An Emerging Player in Biomedical applications. *J Food Sci Technol*. 2015;52:4703–4707.
51. Leitinger B, Hohenester E. Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol*. 2007;26:146–155.

52. Oliveira S, Ringshia R, Legeros R, Clark E, Terracio L, Teixeira C, Yost M. An improved collagen scaffold for skeletal regeneration. *J. Biomed. Mater.* 2009;94(2):371–379.
53. Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials.* 2010;3:1863–1887.
54. Sanz-Herrera JA, Reina-Romo, E. Cell-Biomaterial Mechanical Interaction in the Framework of Tissue Engineering: Insights, Computational Modeling and Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 2011;12:8217–8244.
55. Cunniffe GM, Brien FJO. Collagen scaffolds for orthopedic regenerative medicine. *JOM.* 2011;63(4):66–73.
56. Rose FR, Oreffo RO. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;292:1–7.
57. Pustlauk W, Paul B, Gelinsky M, Bernhardt A. Jellyfish Collagen and Alginate: Combined Marine Materials for Superior Chondrogenesis of HMSC. *Mater. Sci. Eng.* 2016;64:190–198.
58. Bermueller C, Schwarz S, Elsaesser AF, Sewing J, Baur N, von Bomhard A, et al. Marine Collagen Scaffolds for Nasal Cartilage Repair: Prevention of Nasal Septal Perforations in a New Orthotopic Rat Model Using Tissue Engineering Techniques. *Tissue Eng.* 2013;19:2201–2214.
59. Jeong S, Kim SY, Cho SK, Chong MS, Kim KS, Kim H, et al. Tissue-Engineered Vascular Grafts Composed of Marine Collagen and PLGA Fibers Using Pulsatile Perfusion Bioreactors. *Biomaterials.* 2007;28:1115–1122.
60. Bernhardt A, Paul B, Gelinsky M. Biphasic Scaffolds from Marine Collagens for Regeneration of Osteochondral Defects. *Mar. Drugs.* 2018;16(3):91.
61. Zhou C, Li Y, Yu X, Yang H, Ma H, Yagoub AEGA, et al. Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. *LWT.* 2016;74:145–153.
62. Cumming MH, Hall B, Hofman K. Isolation and characterisation of major and minor collagens from hyaline cartilage of hoki (*Macrurus novaezelandiae*). *Mar. Drugs.* 2019;17:223.
63. Wu J, Guo X, Liu H, Chen L. Isolation and comparative study on the characterization of guanidine hydrochloride soluble collagen and pepsin soluble collagen from the body of surf clam shell (*Coelomacra antiquata*). *Foods.* 2019;8:11.
64. Bi C, Li X, Xin Q, Han W, Shi C, Guo R., et al. Effect of extraction methods on the preparation of electrospun/electrosprayed microstructures of tilapia skin collagen. *J. Biosci. Bioeng.* 2019;128:234–240.
65. Cordeiro ARRA, Bezerra TKA, Queiroz ALM, Galvão MS, Cavalcanti MT, Pacheco MTB, Madruga MS. Collagen production from chicken keel bone using acid and enzymatic treatment at a temperature of 30 °C. *Food Sci. Technol.* 2020;40:491–497.
66. Tan Y, Chang SKC. Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Food Chem.* 2018;242:147–155.
67. Bhuimbar MV, Bhagwat PK, Dandge PB. Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: development of collagen-chitosan blend as food packaging film, *J. Environ. Chem. Eng.* 2019;7:102983.
68. Ahmad M, Benjakul S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Chem.* 2010;120:817–824.
69. Song W, Chen W, Yang Y, Li C, Qian G. Extraction Optimization and Characterization of Collagen from the lung of soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Int. J. Nutr. Food Sci.* 2014;3:270–278.
70. Dhakal D, Koomsap P, Lamichhane A, Sadiq MB, Anal AK. Optimization of collagen extraction from chicken feet by papain hydrolysis and synthesis of chicken feet collagen based biopolymeric fibres. *Food Biosci.* 2018;23:23–30.
71. Hashim P, Ridzwan MSM, Bakar J. Isolation and characterization of collagen from chicken feet. *Int. J. Biol. Biomol. Agric. Food Biotechnol. Eng.* 2014;8:147–151.
72. xin Liu Y, qiang Liu Z, Song L, ru Ma Q, yong Zhou D, wei Zhu B, Shahidi F. Effects of collagenase type I on the structural features of collagen fibres from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) body wall. *Food Chem.* 2019;301:125302.
73. Addad S, Exposito J-Y, Faye C, Ricard-Blum S, Lethias C. Isolation, Characterization and Biological Evaluation of Jellyfish Collagen for Use in Biomedical Applications. *Mar. Drugs.* 2011;9:967–983.

74. Felician FF, Yu RH, Li MZ, Li CJ, Chen HQ, Jiang Y, et al. The wound healing potential of collagen peptides derived from the jellyfish *Rhopilema esculentum*. *Chin. J. Traumatol.* 2019;22:12–20. DOI: 10.1016/j.cjtee.2018.10.004
75. Cheng X, Shao Z, Li C, Yu L, Raja MA, Liu C. Isolation, characterization and evaluation of collagen from jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye for use in hemostatic applications. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169731.
76. Khong NM, Yusoff FM, Jamilah B, Basri M, Maznah I, Chan KW, et al. Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes. *Food Chem.* 2018;251:41–50.
77. Steinke JW, Platts-Mills TAE, Commins SP. The alpha-gal story: Lessons learned from connecting the dots. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(3):589–596.
78. De Rinaldis G, Leone A, De Domenico S, Bosch-Belmar M, Slizyte R, Milisenda G, et al. Biochemical Characterization of *Cassiopea Andromeda* (Forsskal, 1775), Another Red Sea Jellyfish in the Western Mediterranean Sea. *Mar. Drugs.* 2021;19:498.
79. Nagai T, Worawattanamateekul W, Suzuki N, Nakamura T, Ito T, Fujiki K, et al. Isolation and characterization of collagen from *Rhizostomous jellyfish (Rhopilema asamushi)*. *Food Chem.* 2000;70:205–208.
80. Nagai T, Ogawa T, Nakamura T, Ito T, Nakagawa H, Fujiki K, et al. Collagen of edible jellyfish exumbrella. *J. Sci. Food Agric.* 1999;79:855–858.
81. Yang H, Shu Z. The extraction of collagen protein from pigskin. *J. Chem. Pharm. Res.* 2014;2:683–687.
82. Liu D, Nikoo M, Boran G, Zhou P, Regenstein JM. Collagen and gelatin. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2015;6:527–557.
83. Prestesa RC. Collagen and its derivatives: Characteristics and applications in meat products. *UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde.* 2013;15:65–74.
84. Almeida P, Vanalle R, Carlos J, Santana J. Produção de gelatina: Uma perspectiva competitiva para a cadeia produtiva de frango de corte. *Prod. Produção.* 2012;13:22–39.
85. Wahyuningsih R, Nurliyani R, Pertiwiningrum A, Rohman A, Fitriyanto NA, Erwanto Y. Optimization of acid soluble collagen extraction from Indonesian local “Kacang” goat skin and physico-chemical properties characterization. *Chem. Eng. Trans.* 2018;63:703–708.
86. Hakim TR, Jamhari PA, Fitriyanto NA, Abidin MZ, Matulesy DN, Erwanto Y. Extraction of collagen from the skin of Kacang goat and production of its hydrolysate as an inhibitor of angiotensin converting enzyme. *Trop. Anim. Sci. J.* 2021;44:222–228..
87. He L, Lan W, Zhao Y, Chen S, Liu S, Cen L, et al. Characterization of biocompatible pig skin collagen and application of collagen-based films for enzyme immobilization. *RSC Adv.* 2020;10:7170–7180..
88. Noorzai S, Verbeek CJR, Lay MC, Swan J. Collagen extraction from various waste bovine hide sources. *Waste Biomass Valori.* 2020;11:5687–5698.
89. Wang L, Yang B, Du X, Yang Y, Liu J. Optimization of conditions for extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by response surface methodology. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2008;9:604–607.
90. Benjakul S, Oungbho K, Visessanguan W, Thiansilakul Y, Roytrakul S. Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*. *Food Chem.* 2009;116:445–451.
91. Schmidt MM, Dornelles RCP, Mello RO, Kubota EH, Mazutti MA, Kempka AP, Demiate IM. Collagen extraction process. *Int. Food Res. J.* 2016;23:913–922.
92. Liu D, Wei G, Li T, Hu J, Lu N, Regenstein JM, Zhou P. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chem.* 2015;172:836–843.
93. Skierka E, Sadowska M. The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chem.* 2007;105:1302–1306.
94. Pal GK, Suresh PV. Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2016;37:201–215.

95. Suo-Lian W, Huai-Bin K, Dong-Jiao L. Technology for extracting effective components from fish scale. *J. Food Sci. Eng.* 2017;7:351–358.
96. Naomi R, Ridzuan PM, Bahari H. Current Insights into Collagen Type I. *Polymers.* 2021;13:2642.
97. Nabijon N, et al. Extraction of collagen from cattle skin and synthesis of collagen based flame retardant composition and introduction into cellulosic textile material by graft copolymerization. *Asian J. Chem.* 2017;29:2470–2474.
98. Senadheera TRL, Dave D, Shahidi F. Sea cucumber derived type I collagen: A comprehensive review. *Mar. Drugs* 2020;18:471.
99. Yusoff FM, Bakar J, Basri M, Ismail M, Khong NMH. A method for extracting collagen and aquatic animals, collagen and products containing it. Malaysia: U. P. Malaysia. 2013.
100. Lin Y-J, Le G-W, Wang J-Y, Li Y-X, Shi Y-H, Sun J. Antioxidative peptides derived from enzyme hydrolysis of bone collagen after microwave assisted acid pre-treatment and nitrogen protection. *Int. J. Mol. Sci.* 2010;11:4297–4308.
101. Jin H-X, Xu H-P, Li Y, Zhang Q-W, Xie H. Preparation and evaluation of peptides with potential antioxidant activity by microwave assisted enzymatic hydrolysis of collagen from sea cucumber *Acaudina molpadioides* obtained from Zhejiang Province in China. *Mar. Drugs.* 2019;17:169.
102. Jankangram W, Chooluck S, Pomthong B. Comparison of the properties of collagen extracted from dried jellyfish and dried squid. *African Journal of Biotechnology.* 2016;15(16):642–648.
103. Sorushanova A, Skoufos I, Tzora A, Mullen AM, Zeugolis DI. The influence of animal species, gender and tissue on the structural, biophysical, biochemical and biological properties of collagen sponges. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2021;32:12.
104. Zhang X, Xu S, Shen L, Li G. Factors affecting thermal stability of collagen from the aspects of extraction, processing and modification. *J. Soc. Leather Technol. Chem.* 2020;2:19.
105. Ran XG, Wang LY. Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by products. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2014;94(3):585–590.
106. Benjakul S, Sae-leaw T, Simpson BK. Byproducts from fish harvesting and processing. *By-products from Agriculture and Fisheries: Adding Value for Food, Feed, Pharma, and Fuels.* 2019;179–217.
107. Ali AMM, Kishimura H, Benjakul S. Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus jullieni*) as affected by ultrasonication. *Process Biochemistry.* 2018;66:237–244.
108. Zou Y, et al. Effect of ultrasound power on extraction kinetic model, and physicochemical and structural characteristics of collagen from chicken lung. *Food Prod. Process. Nutr.* 2020;2:1–12.
109. Chen J, Li M, Y, R, Bai K, Wang G, Tan R. et al. Electrodialysis extraction of pufferfish skin (*Takifugu flavidus*): A promising source of collagen. *Mar. Drugs.* 2019;17(1):25.
110. Lin X, Chen Y, Jin H, Zhao Q, Liu C, Li R, et al. Collagen extracted from bigeye tuna (*Thunnus obesus*) skin by isoelectric precipitation: Physicochemical properties, proliferation, and migration activities. *Mar. Drugs.* 2019;17(5):261.
111. Huang CY, Kuo JM, Wu SJ, Tsai HT. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis sp.*) by a novel extrusion–hydro-extraction process. *Food chem.* 2016;190:997–1006.
112. Mohamad Razali UH, Ya’akob H, Sarbon NM, Zainan NH, Dailin DJ, Zaidel DN. Improving collagen processing towards a greener approach: Current progress. *JCTB.* 2023;98(5):063–1082.
113. Chuaychan S, Benjakul S, Kishimura H, Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*). *LWT-Food Sci Technol.* 2015;63:71–76.
114. Jeevithan E, Wu W, Nanping W, Lan H, Bao B. Isolation, purification and characterization of pepsin soluble collagen isolated from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) skeletal and head bone. *Process Biochem.* 2014;49:1767–1777.
115. Nurilmala M, Pertiwi RM, Nurhayati T, Fauzi S, Batubara I, Ochiai Y, Characterization of collagen and its hydrolysate from yellowfin tuna *Thunnus albacares* skin and their potencies as antioxidant and antiglycation agents. *Fish Sci.* 2019;85:591–599.

116. Jamilah B, Umi Hartina MR, Mat Hashim D, Sazili AQ, Properties of collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) skin. *Int Food Res J*. 2013;20:835–842.
117. Jung KH, Choi YC, Chun JY, Min SG, Hong GP, Effects of concentration and reaction time of trypsin, pepsin, and chymotrypsin on the hydrolysis efficiency of porcine placenta. *Korean J Food Sci Anim Resour*. 2014;34:151–157.
118. Liu D, Liang L, Regenstein JM, Zhou P, Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chem*. 2012;133:1441–1448.

Об авторах

Куликова Юлия Владимировна — старший научный сотрудник НОЦ «Промышленные биотехнологии» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта».

Сухих Станислав Алексеевич — заведующий лабораторией микробиологии и биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта».

Бабич Ольга Олеговна — директор НОЦ «Промышленные биотехнологии» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта».

Authors

Yuliya V. Kulikova — senior Researcher REC “Industrial Biotechnologies”, Immanuel Kant Baltic Federal University.

Stanislav A. Sukhikh — Head of the Laboratory of Microbiology and Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University.

Olga O. Babich — director of REC “Industrial Biotechnologies”, Immanuel Kant Baltic Federal University.

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-46-53>



Эпиморфная регенерация дистальной фаланги пальца у млекопитающих

Ю.Г. Антропова, Р.Ю. Еремичев, П.И. Макаревич, Н.И. Калинина

Медицинский научно-образовательный институт ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Ломоносовский пр-т, 27 к 1, 119192, Москва, Россия

Адрес для переписки: n_i_kalinina@mail.ru

Аннотация

В статье представлены материалы лекции о механизмах регенерации из учебного пособия «Лекции по регенеративной медицине». Рассмотрен пример эпиморфной регенерации у млекопитающих — клеточные механизмы восстановления тканей кончика пальца после ампутации. Эта модель является актуальным объектом исследований, поскольку позволяет изучать механизмы как формирования специализированной временной структуры бластемы, так и последующего морфогенеза, который завершается полноценным восстановлением всех ампутированных тканей.

Ключевые слова: бластема, дедифференцировка, раневой эпидермис, гистолиз

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Антропова Ю.Г., Еремичев Р.Ю., Макаревич П.И., Калинина Н.И. Эпиморфная регенерация дистальной фаланги пальца у млекопитающих. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(1):46–53. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-46-53>

Поступила 01.02.2024

Обработана 13.03.2024

Принята к публикации 19.03.2024

Epimorphic regeneration of mammalian digit tip

Julia G. Antropova, Roman Yu. Eremichev, Pavel I. Makarevich, Natalia I. Kalinina

Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, 27-1,
Lomonosovskiy av., 119192, Moscow, Russia

Correspondence address: n_i_kalinina@mail.ru

Abstract

The article presents lecture materials on regeneration mechanisms from the textbook “Lectures on Regenerative Medicine”. An example of epimorphic regeneration in mammals is considered — the cellular mechanisms of tissue restoration of the fingertip after amputation. This model is a relevant object of research, since it allows us to study the mechanisms of both the formation of a specialized temporary structure of the blastema and subsequent morphogenesis, which ends with the full restoration of all amputated tissues.

Keywords: blastema, dedifferentiation, wound epidermis, histolysis

Conflict of interest: Authors declare no conflict of interest.

For citation: Antropova J.G., Eremichev R.Yu., Makarevich P.I., Kalinina N.I. Epimorphic regeneration of mammalian digit tip. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(1):46–53. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-46-53>

Received 01.02.2024

Revised 13.03.2024

Accepted 19.03.2024

Полноценное восстановление кончика пальца у млекопитающих после травмы или ампутации — одна из наиболее интригующих загадок феномена регенерации. Исторически регенерация конечностей у позвоночных изучалась на животных, демонстрирующих повышенные регенеративные способности: на амфибиях и некоторых видах рыб. Огромный вклад в изучение регенерации амфибий внесли наши отечественные ученые — Л.В. Полежаев, Л.Д. Лиознер и другие. Эти исследования заложили основы для дальнейшего изучения регенерации у млекопитающих, так как в целом процессы, описанные для низших в филогенетическом аспекте классов и видов, в значительной части схожи с таковыми у представителей более сложно организованных таксонов. Однако для регенеративной биомедицины наиболее актуальными являются исследования эпиморфной регенерации у млекопитающих, так как в этом случае возможно провести прямые параллели с регенерацией у человека.

Регенерирующий палец домашней мыши (*Mus musculus*) является основной экспериментальной

моделью для выяснения фундаментальных механизмов регенерации у млекопитающих [1, 2]. Кончик пальца мыши восстанавливается как у новорожденных мышей, так и у взрослых особей. Регенеративно компетентная область представлена дистальным третьим фаланговым элементом (P3) — структурно уникальной костью, которая имеет форму уплощенного конуса с широкой базальной частью, содержащей полость костного мозга, и сужающимся дистальным концом (рис. 1). Кость P3 отделена от эпидермиса ногтя тонким слоем рыхлой соединительной ткани, состоящей из фибробластов и характеризующейся высокой плотностью сосудов и нервов. Второй фаланговый элемент (P2) сочленяется с основанием P3, образуя сустав P2/P3. Ампутация, линия которой проходит через дистальную половину P3, инициирует регенеративный ответ, в то время как ампутация проксимальнее ногтевого ложа приводит к ранозаживлению без эпиморфной регенерации, то есть к фиброзированию с образованием рубца (рис. 1). Эти данные указывают на то, что ногтевое ложе, расположенное в дистальной части

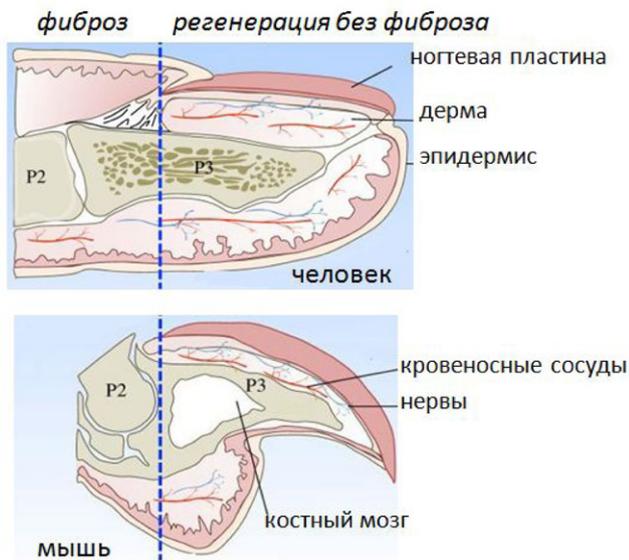


Рис. 1. Схема сагиттальных срезов кончиков пальцев человека и мыши. Пунктирная линия ограничивает область дистальной фаланги, ампутация в пределах которой приводит к эпиморфной регенерации

элемента P3, необходимо для инициации регенерации [3].

В первые часы после ампутации фаланги пальца в зоне образовавшейся раны происходит быстрый каскад последовательных и взаимосвязанных событий. После остановки кровотечения начинается формирование специализированного раневого эпидермиса, идущее параллельно с острой воспалительной реакцией и привлечением иммунокомпетентных клеток в зону поражения. Миграция макрофагов и натуральных киллеров в зону повреждения обуславливает высокую гистолитическую активность и реорганизацию внеклеточного матрикса (ВКМ) в ней. Эти события обеспечивают условия для накопления клеток под эпидермисом раны и формирования бластемы — уникальной структуры, присущей эпиморфной регенерации.

В отличие от некоторых других моделей регенерации, рана после ампутации пальца не подвергается быстрой эпителизации. Вместо этого эпидермис первоначально заживает на боковых участках культи, окружая ее, и инициирует гистолитическую фазу, для которой характерна повышенная активность остеокластов, вызывающая прогрессирующую деградацию культи кости. Эта фаза совпадает по времени с острой воспалительной реакцией и привлечением клеток моноцитарно/макрофагальной линии [4].

Таким образом, происходит так называемая вторичная ампутация с деградацией и последующей секвестрацией части культи в виде отделяющегося фрагмента. При этом открывается полость костного мозга, что, по-видимому, позволяет клеткам-предшественникам стромы костного мозга, включая мезенхимальные стволовые клетки, мигрировать в область формирующейся бластемы.

После вторичной ампутации клетки эпидермиса мигрируют в область над деградированной костью и формируют специализированный раневой эпидермис, который морфологически отличается от многослойного эпителия, типичного для нормального эпителия кожи. Поскольку восстановление зрелой базальной мембраны под таким эпидермисом задерживается, ее отсутствие является индикатором специализированного раневого эпидермиса. Такой эпидермис отличается и от зрелого эпидермиса, расположенного проксимальнее повреждения, и от неэпидермиса, покрывающего рану в случае ампутации проксимальнее регенеративно-компетентной области (на уровне второй фаланги). Экспериментально показано, что специализированный эпидермис раны необходим для направления роста формирующейся бластемы, поддержания клеточной пролиферации и предотвращения преждевременной дифференцировки клеток в ее составе. В исследованиях, в которых экспериментально удалялся раневой эпидермис, регенерация задерживалась до тех пор, пока не происходила эпителизация [5]. Таким образом, специализированный раневой эпидермис необходим для успешной регенерации и может считаться составной частью бластемы.

Гистолитические процессы затрагивают не только культю кости, но и все ткани, прилегающие к раневому эпидермису. Они также подвергаются гистолиту и теряют типичную для них организацию в результате ферментативной деградации ВКМ. Деградация ВКМ достигается кислыми гидролазами и матриксными металлопротеиназами (ММП). Основным источником ММП различных типов являются привлеченные в зону воспаления макрофаги. Важность ММП для гистолита и важность гистолита для успеха регенерации была показана в экспериментах с использованием ингибиторов ММП, воздействие которых блокировало образование бластемы.

По мере гистолиза культы кости и мягких тканей происходит высвобождение фибробластов, шванновских клеток периферических нервов и миобластов, которые частично утрачивают свои фенотипические характеристики, претерпевая так называемую дедифференцировку [6]. Под последней понимают переход из дифференцированного состояния в менее зрелое посредством ядерного перепрограммирования с утратой специализированных структур и функций.

Механизмы дедифференцировки представляют собой сложный и на сегодняшний день недостаточно изученный процесс, включающий эпигенетическое перепрограммирование. Оно подавляет транскрипцию генов дифференцировки, активируя при этом транскрипцию генов, связанных со стволовостью. Ингибирование этих транскрипционных изменений актиномицином D не влияет на гистолиз, но предотвращает или замедляет дедифференцировку, приводя к нарушению и/или задержке регенерации. Интересно, что дедифференцированные клетки продуцируют специфический по составу ВКМ, в котором снижено содержание коллагена 1-го типа, а содержание коллагена 3-го типа, фибронектина, тенасцина и гиалуроната, напротив, повышено.

Воздействие протеаз нарушает контакты между молекулами ВКМ и интегриновыми рецепторами клеток, что приводит к изменению формы клеток и реорганизации актинового цитоскелета с параллельной активацией эпигенетического перепрограммирования. Среди генов, обуславливающих дедифференцированное состояние, внимания заслуживают активируемые во время формирования бластемы, это *Msx*, *Nrad*, *Rfrng* и *Notch* и другие.

Таким образом, после ампутации дистальной части третьей фаланги пальца происходит остановка кровотечения, привлечение иммунокомпетентных клеток, формирование раневого эпидермиса, гистолиз тканей с деградацией ВКМ, вторичная ампутация, локальная дедифференцировка клеток, а также их миграция и пролиферация. Все эти события предшествуют образованию бластемы как таковой, увеличению ее объема и последующему морфогенезу.

Одним из фундаментальных вопросов, связанных с регенеративным ответом, является определение источника и дифференцировочного потенциала клеток-предшественников, кото-

рые формируют бластему и дают начало регенерирующим тканям. Исторически считалось, что бластема представляет собой совокупность способных к пролиферации, гомогенных и по умолчанию плюрипотентных клеток, что было основано на изучении морфологии клеток регенерирующей конечности тритона. Однако недавние исследования регенерации кончика пальца мыши с использованием отслеживания происхождения, миграции и судьбы клеток с помощью специфических трансгенных маркеров (genetic tracing), а также транскриптомного анализа одиночных клеток бластемы показали, что эта структура состоит из множества клеток, которые имеют гетерогенное происхождение. Так, среди клеток бластемы были обнаружены клетки, несущие специфические маркеры эндотелиальных, гладкомышечных клеток, перicyтов, шванновских клеток, клеток макрофагальной/моноцитарной линии, лимфоцитов, преостеокластов, а также различных типов мезенхимальных клеток, включая остеобласты [7, 8]. Хотя этот список типов клеток и маркеров достаточно обширен, оказалось, что 80–85% клеток бластемы представлено мезенхимальными клетками, несущими рецептор фактора роста тромбоцитов альфа (PDGFR- α) (рис. 2).

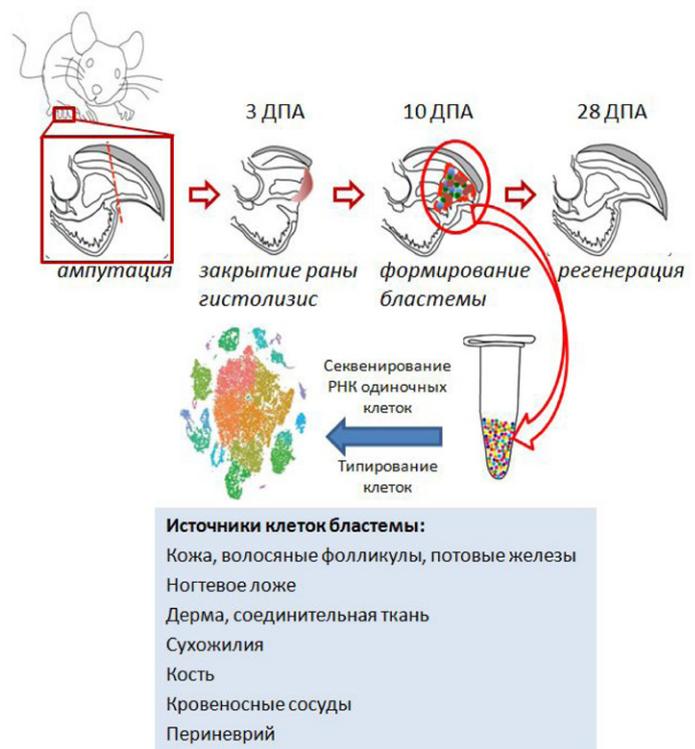


Рис. 2. Регенерация кончика пальца мыши посредством формирования бластемы. ДПА — дни после ампутации

Являются ли клетки бластемы плюрипотентными по своей природе или существуют ограничения их дифференцировочного потенциала, то есть «помнят» ли клетки бластемы свое происхождение и дифференцируются ли только в те типы клеток, из которых они произошли? Предыдущие исследования на мышах по отслеживанию генетических маркеров с использованием экспрессии репортеров, специфичных для определенного типа клеток, показали, что часть клеток бластемы имеет ограниченный потенциал для дифференцировки. Так, дедифференцированные эпидермальные клетки дают начало только эпидермису, в то время как дедифференцированные эндотелиальные клетки способны быть источником только зрелого эндотелия кровеносных сосудов, тем самым сохраняя приверженность своему изначальному дифферону. Подобные исследования демонстрируют, что далеко не все клетки бластемы млекопитающих являются плюрипотентными, как изначально полагали. Более вероятно, что плюрипотентные клетки составляют относительное меньшинство в бластеме, а большая ее часть представлена унипотентными клетками.

К настоящему времени у млекопитающих определены три источника клеток, составляющих бластему. Во-первых, это тканевые резидентные стволовые клетки. Во-вторых, клетки бластемы могут возникать вследствие дедифференцировки — т.е. реверсии дифференцированного состояния с образованием делящейся клетки, которая выступает в роли клетки-предшественника. Третьим источником составляющих бластему клеток являются рекрутированные из кровотока иммунокомпетентные клетки. Однако вопрос о том, какие именно клетки непосредственно станут источником регенерирующих тканей, а какие необходимы для создания локального микроокружения за счет продукции сигнальных факторов, пока остается не до конца изученным.

Созревание бластемы характеризуется началом остеогенной дифференцировки, которое прогрессирует от проксимального до дистального отделов. При этом новая кость образуется путем *прямой оссификации*. В этом заключается основное отличие регенерации кости от ее формирования в онтогенезе, где происходит *непрямая оссификация* через стадию хряща. Это важно упомянуть в связи с тем обстоятельством, что исследователи часто пытаются провести параллели между эмбриогенезом и регенерацией. Однако, хотя

некоторые механизмы, очевидно, схожи, пример образования кости показывает, что в случае регенерации, а также при восстановлении после травм образование новой кости идет по «взрослому», а не «эмбриональному» сценарию [9].

Регенерация кости происходит быстро, когда остеобласты формируют временную структуру — *остеоид*, который впоследствии превращается в костный матрикс, образуя ткань кости. Эта замещающая остеоид кость характеризуется многочисленными трабекулярными пространствами, которые позволяют отличить ее от культуры. Однако со временем плотность кости увеличивается, а трабекулярные пространства становятся меньше. Несмотря на это ремоделирование, кость регенерированного кончика пальца имеет существенные гистологические отличия от нативной [10]. Наряду с формированием кости рыхлая соединительная ткань дермы и сосудистая сеть также регенерируют, что, в конечном итоге, приводит к восстановлению морфологии кончика пальца. Отмечается, что этот процесс полностью завершается к 4–5-й неделе после ампутации. В некоторых исследованиях отмечено, что у новорожденных мышей процесс эпиморфной регенерации завершается значительно быстрее, уже через 2–3 недели.

Таким образом, эпиморфная регенерация дистальной фаланги пальца, начиная с самого раннего этапа образования раневого эпидермиса, формирования и созревания бластемы до финальной дифференцировки и морфогенеза, представляет собой череду взаимосвязанных процессов. Зададимся вопросом: какие сигнальные пути участвуют в координации и регуляции этого многоэтапного и сложного события?

Учитывая, что при ампутации проксимальнее ногтевого ложа не происходит регенеративного ответа, можно предположить, что мезенхима ногтевого ложа является источником PDGFR- α -экспрессирующих клеток, которые уже пребывают в «праймированном», заранее индуцированном состоянии, и именно они инициируют закладку бластемы и вносят непосредственный вклад в ее формирование. Однако недавние исследования показали, что ногтевое ложе является скорее *сигнальным центром*, продуцирующим совокупность регуляторных молекул преимущественно белковой и пептидной природы. В ряде исследований показано, что активность канонического пути Wnt необходима

для дифференцировки стволовых клеток ногтя как в нормальных условиях, так и при регенерации после ампутации. Активация WNT необходима для экспрессии клетками бластемы FGF, BMP и других ростовых факторов, пролиферации этих и последующей иннервации бластемы. Показано, что LGR6 — агонист сигнального пути WNT — ускоряет регенерацию. В экспериментах по трансплантации фрагментов ногтевого ложа в нерегенерирующий ампутированный палец мыши (например, при операциях проксимальнее ногтевого ложа) наблюдалось эктопическое формирование кости вместо обычного в таких случаях фиброзного рубца.

Раневой эпидермис также может служить источником факторов, необходимых для формирования и созревания бластемы. Так, у амфибий было многократно показано, что формирование апикальной эктодермальной шапочки имеет критическое влияние на регенерацию конечности. Поэтому логично было предположить, что раневой эпидермис у млекопитающих играет не менее важную роль. Так, например, в недавних исследованиях было показано, что фактор роста стромы (stromal derived factor 1-alfa, SDF-1 α) экспрессируется клетками раневого эпидермиса, а в бластеме экспрессируются оба рецептора к этому фактору. Под влиянием антагониста этих рецепторов формирование бластемы нарушается и подавляется восстановление кости. Напротив, при эктопическом внесении SDF-1 α после ампутации по регенеративно некомпетентной области (проксимальнее ногтевого ложа) были отмечены признаки частичного регенеративного ответа. Исследования влияния раневого эпидермиса на формирование бластемы продолжаются и, скорее всего, приведут к расширению списка сигнальных молекул, необходимых и, возможно, достаточных для активации направленной регенерации пальца.

Есть еще один ключевой фактор, который оказывает регулирующее воздействие на ход процесса регенерации, — периферическая иннервация, в частности клетки, входящие в состав нервного волокна. В экспериментах на амфибиях было установлено, что хирургическая денервация до ампутации приводила к отсутствию регенеративного ответа. Были получены доказательства того, что периферические нервные волокна оказывают стимулирующее воздействие на бластему посредством секреции таких FGF, ряда представителей семейства BMP, нейрегулина и других. Похожие эксперименты для изуче-

ния влияния периферических нервных волокон были также проведены и у млекопитающих. Денервация, предшествующая ампутации пальца мыши, приводила к заметному замедлению ранозаживления, подавляла рост бластемы и препятствовала формированию кости.

Для того чтобы понять, каким образом периферические нервы оказывают регулирующее влияние на процесс регенерации, также была использована методика генетического трейсинга клеточных линий. Было показано, что в бластеме регенерирующего пальца присутствуют Sox2-позитивные клетки, источником которых являются дедифференцированные шванновские клетки [11]. В условиях денервации конечности перед ампутацией таких клеток в бластеме обнаружено не было, при этом отмечалось значительное замедление пролиферации мезенхимального компартмента бластемы и отсутствие формирования нового регенерированного фрагмента кости. И, напротив, при введении в область ампутации после предварительной денервации культивируемых Sox2-позитивных клеток регенеративные процессы восстанавливались.

Для понимания механизма влияния шванновских клеток на формирование и созревание бластемы была проведена серия экспериментов с использованием протеомного и транскриптомного анализа. При этом был установлен ряд факторов (PDGF-AA, онкостатин M и др.), выделяемых шванновскими клетками, которые оказывают паракринное влияние на мезенхимальные клетки бластемы, вызывая их миграцию и пролиферацию [12]. Эти исследования продолжаются, и список всех регулирующих факторов еще предстоит дополнить по их итогам.

В недавних исследованиях было показано, что поврежденные в ходе ампутации периферические нервы являются источником мезенхимальных предшественников. Это было выявлено с помощью методов трейсинга клеточных линий и транскриптомного анализа. Клетки, входящие в состав нервных волокон, составляли отдельный пул клеток, но не являлись шванновскими клетками или нейронами и имели маркеры мезенхимальных стволовых клеток (МСК), а при культивировании они проявляли типичную для МСК способность к адипо-, хондро- и остеогенной дифференцировке. Было четко показано, что данные клетки мезенхимальной природы мигрируют в бластему млекопитающих

из поврежденных нервов и вносят свой вклад в дальнейшее формирование кости и дермы в регенерирующей конечности [13].

Таким образом, периферическая иннервация вносит существенный вклад в регенерацию у млекопитающих посредством двух взаимодополняющих механизмов: секретирова регуляторные факторы дедифференцированными шванновскими клетками в локальное микроокружение бластемы и являясь источником мезенхимальных предшественников, способных дифференцироваться в регенерирующие ткани.

Говоря о регуляции развития бластемы и ее дальнейшей дифференцировки, следует отметить ключевую роль васкуляризации. В одном из исследований было показано, что динамические изменения напряжения кислорода имеют решающее значение для регенеративного ответа. Установлено, что мышьяная бластема на начальных стадиях формирования гипоксична в силу своей аваскулярности, а многие клетки в ее составе экспрессируют антиангиогенный фактор PEDF. Экзогенное внесение VEGF-A или BMP9 в ткани регенерирующего кончика пальца приводило к преждевременному прорастанию кровеносных сосудов в бластему и подавлению регенерации. Кроме того, вызванное BMP9 ингибирование регенерации может быть устранено с помощью экзогенно вносимого антиангиогенного фактора роста пигментного эпителия (PEDF). В этих исследованиях также было отмечено, что инициация остеогенеза, т.е. начало дифференцировки клеток бластемы, совпадает с индукцией экспрессии VEGF-A. В совокупности эти результаты показывают, что во время регенерации дистальной фаланги у млекопитающих ангиогенез играет важную роль в координации образования и созревания бластемы, а значит, и исхода всей регенерации.

Подводя итог изложенному выше, можно утверждать, что бластема является основной временно существующей структурой, которая определяет осуществление полноценной регенерации либо ее отсутствие и последующее замещение утраченных тканей фиброзным рубцом. Огромный массив знаний об эпиморфной регенерации, который был накоплен за столетия исследований на животных, имеющих повышенные регенеративные способности, начиная от кишечнорастных, плоских червей и амфибий, является ценным для понимания молекулярно-клеточных механизмов регенерации. Однако именно исследования регенерации у млекопитающих позволяют понять, почему в их случае регенерация имеет ограниченный потенциал, а также выработать стратегии влияния на регенеративные процессы и возможные терапевтические подходы для повреждений, требующих регенерации. Несмотря на значительный прогресс в этой области, остается целый ряд вопросов, которые еще не до конца разрешены. Что именно является фактором, иницирующим формирование бластемы? Каковы прочие источники клеток бластемы помимо уже найденных? Какие из клеток бластемы являются унипотентными или плюрипотентными? Что именно составляет сигнальный центр, регулирующий каскад событий при формировании и созревании бластемы? Каковы все факторы, секретироваемые сигнальными центрами, направляющими регенерацию? Имеют ли ткани в конечности, ампутированной проксимальнее ногтевого ложа, регенеративный потенциал и как можно на него повлиять?

Этот список можно продолжать, однако очевидно, что актуальность данных исследований не подлежит сомнению, так как дает инструменты для терапевтических подходов и использованию достижений регенеративной биомедицины в клинической практике.

Литература

1. Fernando WA, Leininger E, Simkin J, Li N, Malcom CA, Sathyamoorthi S, et al. Wound healing and blastema formation in regenerating digit tips of adult mice. *Dev. Biol.* 2011;350:301–310.
2. Simkin J, Han M, Yu L, Yan M, Muneoka K. The mouse digit tip: from wound healing to regeneration. *Methods Mol. Biol.* 2013;1037:419–435.
3. Takeo M, Chou WC, Sun Q, Lee W, Rabbani P, Loomis C, et al. Wnt activation in nail epithelium couples nail growth to digit regeneration. *Nature.* 2013;499:228–232.
4. Simkin J, Sammarco MC, Marrero L, Dawson LA, Yan M, Tucker C, et al. Macrophages are required to coordinate mouse digit tip regeneration. *Development.* 2017;144:3907–3916.

5. Simkin J, Sammarco MC, Dawson LA, Tucker C, Taylor LJ, Van Meter K, Muneoka K. Epidermal closure regulates histolysis during mammalian (*Mus*) digit regeneration. *Regeneration*. 2015;2:106–119.
6. Lehoczky JA, Robert B, Tabin CJ. Mouse digit tip regeneration is mediated by fate-restricted progenitor cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011;108(20):609–614.
7. Storer MA, Mahmud N, Karamboulas K, Borrett MJ, Yuzwa SA, Gont A, et al. Acquisition of a unique mesenchymal precursor-like blastema state underlies successful adult mammalian digit tip regeneration. *Dev. Cell*. 2020;52:1–16.
8. Johnson GL, Masias EJ, Lehoczky JA. Cellular heterogeneity and lineage restriction during mouse digit tip regeneration at single-cell resolution. *Dev. Cell*. 2020;2:525–540.
9. Dawson LA, Yu L, Yan M, Marrero L, Schanes PP, Dolan C, et al. The periosteal requirement and temporal dynamics of BMP2-induced middle phalanx regeneration in adult mice. *Regeneration*. 2017;4:140–150.
10. Dawson LA, Schanes PP, Kim P, Imholt FM, Qureshi O, Dolan CP, et al. Blastema formation and periosteal ossification in the regenerating adult mouse digit. *Wound Repair Regen*. 2018; 26:263–273.
11. Carr MJ, Toma JS, Johnston APW, Steadman PE, Yuzwa SA, Mahmud N, et al. Mesenchymal precursor cells in adult nerves contribute to mammalian tissue repair and regeneration. *Cell Stem Cell*. 2019;24:240–256.
12. Johnston AP, Yuzwa SA, Carr MJ, Mahmud N, Storer MA, Krause MP, et al. Dedifferentiated Schwann cell precursors secreting paracrine factors are required for regeneration of the mammalian digit tip. *Cell Stem Cell*. 2016;19:433–448.
13. Rinkevich Y, Montoro DT, Muhonen E, Walmsley GG, Lo D, Hasegawa M, et al. Clonal analysis reveals nerve-dependent and independent roles on mammalian hind limb tissue maintenance and regeneration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2014;111:9846–9851.

Об авторах

Антропова Юлия Георгиевна — к.б.н., с.н.с. лаборатории генных и клеточных технологий кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Еремичев Роман Юрьевич — к.м.н., м.н.с. лаборатории генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Макаревич Павел Игоревич — д.м.н., заведующий лабораторией генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Калинина Наталья Игоревна — к.б.н., в.н.с. лаборатории генных и клеточных технологий кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Authors

Julia G. Antropova — Ph.D. in Biology, senior research scientist, Laboratory of Gene and Cell Technologies, Biochemistry and Regenerative Medicine Chair, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Roman Yu. Eremichev — M.D., Ph.D., junior research scientist, Laboratory of Gene and Cell Therapy, Center of Regenerative Medicine, Medical Scientific and Educational Institute Lomonosov Moscow State University.

Pavel I. Makarevich — M.D., D.Sc., Head of the Laboratory of Gene and Cell Therapy, Medical Scientific and Educational Institute Lomonosov Moscow State University.

Natalia I. Kalinina — Ph.D. in Biology, leading research scientist, Laboratory of Gene and Cell Technologies, Biochemistry and Regenerative Medicine Chair, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-54-77>



Технологии редактирования генома и перспективы их применения в биомедицине

М.Н. Карагяур^{1,2}, А.Л. Примак¹, С.С. Джауари¹, К.Д. Бозов¹, Ю.В. Макусь¹

¹ Факультет фундаментальной медицины, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119192, Ломоносовский проспект, 27, к. 1, Москва, Россия

² Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119192, Ломоносовский проспект, 27, к. 10, Москва, Россия

Адрес для переписки: m.karagyaur@mail.ru

Аннотация

Технологии редактирования генома и их модификации являются незаменимым инструментом для изучения функций отдельных молекул, получения клеточных линий и животных с заданными свойствами, а также разработки перспективных подходов к терапии не излечимых ранее заболеваний. Данный обзор освещает различные аспекты технологий геномного редактирования: от их биологического значения до принципов функционирования и наиболее перспективных областей применения в фундаментальных и прикладных исследованиях. Особое внимание уделено обсуждению ограничений технологий редактирования генома, а также правовых и этических аспектов их применения для коррекции генома человека. Данный обзор может быть интересен широкому кругу читателей, желающих узнать больше о технологиях редактирования генома и планирующих их практическое применение.

Ключевые слова: редактирование генома, CRISPR/Cas9, ZFNs, TALENs, ограничения технологий редактирования генома

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Карагяур М.Н., Примак А.Л., Джауари С.С., Бозов К.Д., Макусь Ю.В. Технологии редактирования генома и перспективы их применения в биомедицине. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(1):54–77. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-54-77>

Поступила 18.01.2024

Обработана 14.03.2024

Принята к публикации 20.03.2024

Genome editing technologies and prospects for their use in biomedicine

Maxim N. Karagyaur^{1,2}, Alexandra L. Primak¹, Stalik S. Dzhauari¹, Kirill D. Bozov¹, Yulia V. Makus¹

¹ Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119192, Lomonosovsky prospect, 27/1, Moscow, Russia

² Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, 119192, Lomonosovsky prospect, 27/10, Moscow, Russia

Correspondence address: m.karagyaur@mail.ru

Abstract

Genome editing technologies and their modifications are an indispensable tool for studying the functions of individual molecules, obtaining cell lines and animals with specified properties, and developing promising approaches to the therapy of previously untreatable diseases. This review covers various aspects of genome editing technologies: from their biological significance to the principles of their functioning and the most promising areas of application in basic and applied research. Particular attention is paid to discussing the limitations of genome editing technologies, as well as the legal and ethical aspects of their application to human genome modification. This review may be of interest to a wide range of readers, including researchers wishing to learn more about genome editing technologies and planning their practical application.

Keywords: genome editing, CRISPR/Cas9, ZFNs, TALENs, limitations of genome editing technologies

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Karagyaur M.N., Primak A.L., Dzhauari S.S., Bozov K.D., Makus Yu.V. Genome editing technologies and prospects for their use in biomedicine. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(1):54–77. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-54-77>

Received 18.01.2024

Revised 14.03.2024

Accepted 20.03.2024

Список сокращений

ВИЧ — вирус иммунодефицита человека

гРНК — гидовая/направляющая РНК

ГСК — гематопоэтические стволовые клетки

пре-крРНК (pre-crRNA) — пре-криспр-РНК

РГ — редактирование генома

транс-крРНК (tracrRNA) — транс-криспр-РНК

BASU — *Bacillus subtilis* BirA, биотин лигаза *Bacillus subtilis*

BE — Base Editors, редакторы оснований

BER — Base Excision Repair, эксцизионная репарация оснований

CAR — Chimeric Antigen Receptor, химерный антигенный рецептор

CARLIN — CRISPR array repair lineage tracing, Отслеживание клеточной линии с помощью массива CRISPR

CARPID — CRISPR-Assisted RNA-Protein Interaction Detection, обнаружение взаимодействия РНК и белка с помощью CRISPR

Cas9 — CRISPR associated protein 9, CRISPR-ассоциированный белок 9

CCR5 — C-C chemokine receptor type 5, C-C-рецептор хемокина 5

CRISPR — Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, Кластеризованные регулярно чередующиеся короткие палиндромные повторы

HDR — Homology-Directed Repair, гомологически направленная репарация

HITI — Homology-Independent Target Integration, направленная интеграция, не зависящая от гомологии

IRES — Internal ribosome entry site, сайт внутренней посадки рибосомы

lncRNA — long non-coding RNA, длинные некодирующие РНК

miRNA — microRNA, микроРНК

MMLV — Moloney Murine Leukemia Virus, вирус мышинной лейкемии Молони

MR1 — Major histocompatibility complex class I-related protein, белок, связанный с основным комплексом гистосовместимости I

NER — Nucleotide Excision Repair, эксцизионная репарация нуклеотидов

NHEJ — Non-homologous end joining, негомологическое соединение концов

PAM — Protospacer Adjacent Motif, последовательность, прилежащая к протоспейсеру

PE — PrimeEditing, праймерное редактирование

Q-dot — Quantum dot, квантовые точки

saRNA — small activating RNA, малые активирующие РНК

siRNA — small interfering RNA, малые интерферирующие РНК

snRNA — small nuclear RNA, малые ядерные РНК

ssODN — single-stranded oligodeoxynucleotide, одноцепочечный олигонуклеотид

TALE — Transcription Activator Like Effectors, эфффекторы, подобные транскрипционным факторам

TALENs — Transcription Activator Like Effector Nucleases, нуклеазы на основе эфффекторов, подобных активаторам транскрипции

TCR — T-cell receptor, Т-клеточный рецептор

ZFNs — Zinc-Finger Nucleases, нуклеазы с цинковыми пальцами

Введение

Редактирование генома (РГ) представляет собой уникальный инструмент для внесения перманентных (постоянных) направленных изменений в геном организмов, принадлежащих ко всем царствам живого. Согласно современной классификации РГ считается одной из разновидностей генной терапии [1], однако от классических генотерапевтических подходов РГ отличается значительно более широким спектром возможностей применения: от редактирования последовательностей нуклеиновых кислот до управления экспрессией целевых генов, от маркирования целевых локусов до управления эпигеномом и стимуляции хромосомных транслокаций [2]. При этом все изменения активности или структуры целевых молекул

(ДНК, РНК и даже белков) происходят в природном контексте в живой клетке. В то время как классическая генная терапия подразумевает экзогенное введение молекул ДНК или РНК в дополнение к уже существующим и зачастую носит временный характер [3]. Высокая гибкость и достаточно высокая точность делают РГ незаменимым инструментом для изучения роли отдельных молекул в процессах функционирования клеток и в патогенезе отдельных заболеваний, а также открывают перспективу для терапевтической коррекции целого ряда тяжелых наследственных патологий.

Эволюция технологий редактирования генома

Истоки редактирования генома лежат в изучении механизмов гомологичной рекомбинации и поиске факторов, увеличивающих ее

эффективность. Гомологичная рекомбинация с конца 1980-х годов использовалась как биологический механизм, позволяющий осуществлять генетические манипуляции с клетками и получать первые породы генетически модифицированных животных [4–6]. В основе гомологичной рекомбинации лежит способность молекул ДНК обмениваться участками, обладающими определенной степенью гомологии [7]. Эффективность спонтанной рекомбинации была крайне низка, и вероятность ее возникновения составляла 1/1 000 000. Было установлено, что двуцепочечные разрывы ДНК, возникающие неподалеку от целевого гена, увеличивают вероятность гомологичной рекомбинации в 1000 раз [8, 9]. Это привело к пониманию, что нужно искать инструменты, способные вносить разрывы в нужные локусы ДНК. Первыми с этой целью стали применять мегануклеазы (рис. 1), например I-Cre, I-SceI, PI-PfuI и др. — разновидность эндонуклеаз рестрикции вирусного и микробного происхождения, способных распознавать протяженные и зачастую уникальные ДНК-последовательности (длиной 14–40 нуклеотидов) [10, 11]. Таким образом, мегануклеазы можно считать первым поколением технологий РГ. Впрочем, высокая специфичность и обусловленная этим практическая невозможность нацелить их в нужную область генома ограничили их распространение и применение. Попытки целенаправленно менять их специфичность с помощью мутагенеза оказались трудоемкими и ожидаемых результатов не дали.

Первыми истинно программируемыми нуклеазами стали Zinc-Finger Nucleases (ZFNs, или Нуклеазы с цинковыми пальцами) и Transcription Activator Like Effector Nucleases (TALENs, или Нуклеазы на основе эффекторов, подобных активаторам транскрипции) (рис. 1), состоящие из ДНК-распознающего и нуклеазного домена [12]. ДНК-распознающий домен ZFNs и TALENs является модульным (составным) и включает в себя от 3–6 (ZFNs) до 14–20 (TALENs) субдоменов. Каждый из субдоменов ДНК-распознающего домена ZFNs представляет собой так называемый «цинковый палец» (входит в состав ДНК-связывающих белков, в т.ч. транскрипционных факторов), состоит из ~ 30 аминокислот и способен распознавать уникальный триплет [13]. Существует по меньшей мере 64 варианта таких модулей для сборки ДНК-связывающего домена ZFNs (по числу возможных триплетов).

Субдомены ДНК-распознающего домена TALENs, в свою очередь, были позаимствованы у микроорганизмов рода *Xanthomonas* (паразитов сельскохозяйственных растений), которые с целью облегчения инфицирования растений вводят в цитоплазму растительных клеток специальные белки — эффекторы, подобные активаторам транскрипции, или Transcription Activator Like Effectors (TALEs), что приводит к нарушениям транскрипции ряда защитных генов (MtN3/saliva/SWEET и др.) и компрометации защитных механизмов растений [14]. Каждый из субдоменов TALEs или TALENs состоит из ~ 34 аминокислот и способен распознавать один из дезоксирибонуклеотидов (А, Т, G или С) в составе ДНК. Существует по меньшей мере 4 варианта таких модулей для сборки ДНК-связывающего домена TALENs (по числу природных дезоксирибонуклеотидов). Комбинируя модули в ДНК-распознающих доменах ZFNs и TALENs, можно их нацеливать (программировать) на распознавание практически любых последовательностей ДНК.

Нуклеазная активность ZFNs и TALENs реализуется благодаря входящему в их состав нуклеазному домену из эндонуклеазы рестрикции (чаще всего FokI) [15]. Такой нуклеазный домен должен удовлетворять двум основным требованиям: отсутствие специфичности к какой-то конкретной нуклеотидной последовательности и реализация нуклеазной активности строго вследствие димеризации. Комбинирование нуклеазного домена с программируемым ДНК-распознающим доменом ZFNs или TALENs позволяет не только наводить их в определенную область генома, но и вносить двуцепочечный разрыв в ДНК в локус по желанию. Для эффективного и специфичного разрезания ZFNs и TALENs программируются на участки противоположных цепей с обеспечением дистанции между ними в 13–18 нуклеотидов (рис. 1), что позволяет FokI-нуклеазному домену димеризоваться, активироваться и внести двуцепочечный разрыв. Последствия такого разрыва и его роль в редактировании генома будут рассмотрены ниже.

Основными недостатками ZFNs и TALENs являются трудоемкость сборки ДНК-распознающего домена из отдельных модулей и способность таких модулей «интерферировать» друг с другом, изменяя и снижая специфичность результирующего ДНК-распознающего домена [16]. Более

Мегануклеазы



Нуклеазы с цинковыми пальцами (Zinc-Finger Nucleases, ZFN)



Нуклеазы на основе эффикторов, подобных активаторам транскрипции (Transcription Activator Like Effector Nucleases, TALENs)

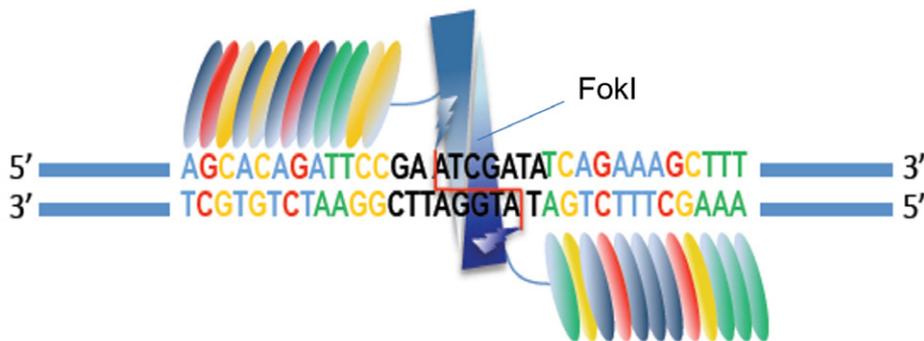


Рис. 1. Основные разновидности систем редактирования генома до появления CRISPR/Cas

тонкая адаптация такого ДНК-распознающего домена к целевой последовательности ДНК осуществляется с помощью методов направленного мутагенеза, фагового дисплея и направленной эволюции. Все это делает использование ZFNs и TALENs дорогим, трудоемким и времязатратным.

Основным конкурентом ZFNs и TALENs в РГ стала технология CRISPR/Cas, играющая роль адаптивного противовирусного иммунитета в бактериях и археях [17]. В основе технологии CRISPR/Cas лежит комплекс инвариантного белка-эндонуклеазы и короткой вариабельной направляющей РНК, выполняющей функцию наведения эндонуклеазы в нужную область генома. Простота и дешевизна синтеза соответствующих направляющих РНК без необходимости

менять свойства самой эндонуклеазы (в противоположность мегануклеазам, ZFNs и TALENs) дают возможность быстро менять специфичность рибонуклеопротеиновых комплексов, а также позволяют одновременно осуществлять редактирование сразу по множеству целевых локусов в одной или разных клетках. Благодаря этим свойствам технология CRISPR/Cas приобрела широкое распространение как в фундаментальных, так и прикладных исследованиях [18, 19]. Ее природный потенциал был дополнительно мультиплицирован созданием колоссального количества модификаций, позволяющих реализовывать самые смелые задумки и мечты ученых и клиницистов. В 2020 году исследователи Jennifer Anne Doudna и Emmanuelle Charpentier, работы которых [20] легли в основу применения системы CRISPR/Cas

для РГ, получили Нобелевскую премию по химии с формулировкой «за развитие методов геномного редактирования» («for the development of a method for genome editing»).

Биологическое значение системы редактирования генома CRISPR/Cas9

История CRISPR/Cas начинается в 1987 году, когда в бактериальной хромосоме *Escherichia coli* впервые были идентифицированы палиндромные повторы, расположенные с определенным интервалом и сгруппированные в кластер, получившие название CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) [21]. Тогда их функциональное значение и роль в биологии бактериальной клетки понять не смогли. Позже CRISPR-локусы были идентифицированы у более чем 80% археев и 40% бактерий, в том числе и клинически значимых микроорганизмов, таких как *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pyogenes*. Анализ CRISPR-локусов показал, что в их состав входят последовательности, соответствующие фрагментам ДНК бактериофагов, плазмид и ряда других паразитических генетических элементов, причем бактериальные клетки, несущие такие последовательности, оказались устойчивы к инфицированию соответствующими бактериофагами и плазмидами [17, 22]. Совокупность этих фактов позволила предположить, что CRISPR-локус является частью адаптивной иммунной системы бактерий и архей, что и было подтверждено экспериментально. Позже были установлены и другие участники функционирования данной системы — белки Cas (CRISPR-associated proteins или белки, ассоциированные с CRISPR), а также принципы и механизмы функционирования этой системы.

В составе самого CRISPR-локуса бактерий выделяют CRISPR-массив, который подобно каталогу хранит информацию о перенесенных инфекциях и служит материальной основой для синтеза РНК-инструкций для CRISPR-интерференции, а также гены Cas-белков, обеспечивающих функционирование всей системы CRISPR/Cas. CRISPR-локус встроен в бактериальную хромосому, что обеспечивает передачу устойчивости к паразитическим генетическим элементам и потомкам данной бактериальной клетки.

Для того чтобы лучше понять номенклатуру системы CRISPR/Cas и принципы ее работы, необходимо ввести несколько терминов. Если взглянуть

на структуру CRISPR-локуса и попытаться понять логику первых его исследователей, то можно заметить, что наибольшее внимание в структуре CRISPR-локуса они уделяли именно палиндромным повторяющимся последовательностям (по их именованию система CRISPR и получила свое название). И это неспроста, поскольку существовало множество примеров их биологической значимости: так, палиндромные последовательности в ДНК являются участками хромосомной нестабильности, а в структуре РНК они необходимы для процессинга тРНК и микроРНК, инициации обратной транскрипции и трансляции по IRES-зависимому механизму и т.д. [23, 24]. Последовательности ДНК, разделяющие такие палиндромные последовательности, получили название спейсеров. Когда стало понятно, что спейсеры представляют собой фрагменты генетического материала паразитических элементов, то соответствующие им последовательности в геноме таких паразитов (в том числе являющиеся мишенью при CRISPR-интерференции) получили название «протоспейсеры» (т.е. предспейсеры). Важную роль в регуляции активности системы CRISPR/Cas в ходе CRISPR-интерференции играет последовательность из 2–6 нуклеотидов, прилегающая к протоспейсеру с 3' или 5' конца (protospacer adjacent motif или PAM-последовательность) [25]. Ее биологическое значение будет рассмотрено ниже.

В работе системы CRISPR/Cas в бактериальной клетке можно выделить три основных этапа (рис. 2): первый — распознавание, захват и интеграция в CRISPR-локус чужеродного генетического элемента (протоспейсера), второй — экспрессия компонентов системы CRISPR/Cas, третий — CRISPR-интерференция, т.е. CRISPR/Cas-опосредованное расщепление целевых генетических элементов [17, 25]. Достоверно механизмы захвата протоспейсеров из чужеродных (паразитических) генетических элементов на сегодняшний день не установлены, но считается, что такими сигналами могут служить свободные концы ДНК (бактериофаги), множественные разрывы ДНК и «репликация по типу катящегося кольца». Дополнительными факторами, способствующими дифференциации генома паразитического элемента от кольцевого генома бактерий (бактериальной хромосомы) с последующим захватом из первого протоспейсера, являются концентрационное преобладание таких паразитических элементов над бактериальной хромосомой (большое количество копий плазмиды

или генома бактериофага на 1 бактериальную клетку), а также отсутствие (или нерегулярная встречаемость) в них Chi сайтов, характерных для данного микроорганизма (например, 5'-GCTGGTGGN₄₋₇-3' — для *Escherichia coli*). Chi сайт в геноме бактерий является областью связывания фермента RecBCD, обладающего хеликазной и нуклеазной активностью и играющего в бактериях ключевую роль в процессах репликации, рекомбинации и репарации ДНК (т.е. играет ключевую роль в поддержании стабильности геномной ДНК бактерий) [26, 27]. В процессах распознавания и вырезания протоспейсеров зачастую принимают участие ферменты-эффекторы CRISPR-интерференции (например, Cas9 *Streptococcus pyogenes*), что позволяет обеспечить более специфичное распознавание и эффективное расщепление таких протоспейсеров в составе генома паразита при последующих инфицированиях [28].

При встрече с новым бактериофагом шансов у бактерии выжить не так много, но они значительно увеличиваются, если заражение происходит низким титром бактериофага либо он мутантен (снижена вирулентность и/или репликация) или CRISPR-массив содержит направляющие РНК к протоспейсерам родственных вирусов (т.е. направляющие РНК, по крайней мере, частично способны распознавать протоспейсеры паразита). «Выздоровевшая» бактерия добавляет в свой CRISPR-массив новые протоспейсеры и не только сама приобретает устойчивость к данному вирусу/плазмиде, но и передает этот иммунитет своему потомству. Молекулярные механизмы встраивания новых протоспейсеров могут включать, как прямую интеграцию в соответствующую область CRISPR-массива (для двуцепочечных ДНК-протоспейсеров), так и копирование в CRISPR-массив с участием обратных транскриптаз (для РНК-протоспейсеров). Подробнее

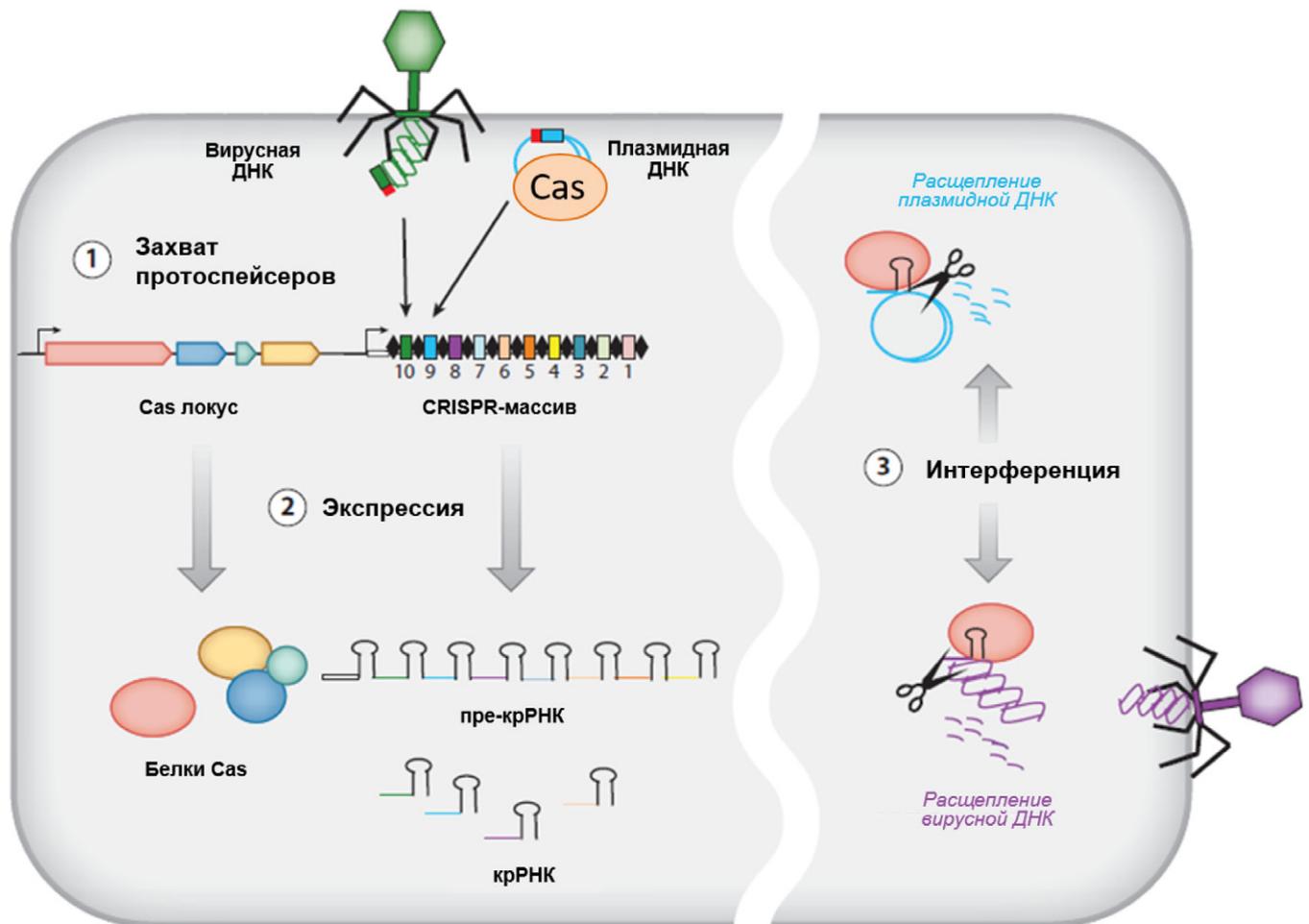


Рис. 2. Принципиальная схема функционирования системы адаптивного иммунитета CRISPR/Cas в бактериальной клетке [11 с модиф.]

с механизмами захвата и интеграции протоспейсеров в геном бактерий можно ознакомиться в следующем обзоре [29].

Вторым этапом в реализации CRISPR/Cas-опосредованной иммунной защиты в бактериальной клетке является экспрессия CRISPR-массива (в виде единой пре-крРНК (pre-crRNA)) и связанных с ним Cas белков. Синтезированная пре-крРНК процессируется с образованием отдельных крРНК, которые потом загружаются в эффекторную нуклеазу или комплекс белков, выполняющих такую функцию (например, система Cascade в *Escherichia coli*) [30]. В ряде случаев молекулы нуклеазы-эффектора (например, Cas9 из *Streptococcus pyogenes* или Cpf1 из *Lachnospiraceae bacterium*) связываются с пре-крРНК еще до ее созревания с последующим процессингом такого мультимолекулярного комплекса и образованием отдельных рибонуклеопротеинов, опосредующих CRISPR-интерференцию. Взаимодействие крРНК с нуклеазой осуществляется напрямую (Cpf1) или посредством вспомогательной транс-крРНК (tracrRNA), как у Cas9 из *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus*. Образование рибонуклеопротеинового комплекса стабилизирует крРНК и активирует нуклеазу для распознавания ДНК-мишени. Характер экспрессии CRISPR-локуса (конститутивный или индуцируемый) в большинстве организмов пока не ясен, но для некоторых микроорганизмов (*Sulfolobus solfataricus*) был продемонстрирован конститутивный (постоянный) характер его экспрессии вне зависимости от фаговой инвазии [31].

Образовавшиеся рибонуклеопротеиновые комплексы идентифицируют комплементарные им протоспейсеры в составе паразитического генетического элемента и расщепляют его. Механизмы распознавания протоспейсера и расщепления целевой нуклеиновой кислоты несколько различаются в разных типах системы CRISPR/Cas. Мы рассмотрим механизм CRISPR-интерференции на примере наиболее изученного варианта CRISPR/Cas из *Streptococcus pyogenes*. Распознавание протоспейсера начинается со скольжения рибонуклеопротеинового комплекса Cas*крРНК*тракрРНК вдоль молекулы ДНК. Рибонуклеопротеиновый комплекс «сканирует» последовательность ДНК на наличие ПАМ (последовательности, прилежащей к протоспейсеру). Ее распознавание опосредовано аминокислотными остатками нуклеазы, и, соответственно, последовательность целевой

ПАМ определяется свойствами самой нуклеазы (5'NGG — у нуклеазы Cas9 от *Streptococcus pyogenes*, 5'NNNRRT — у Cas9 от *Staphylococcus aureus*, 5'TTTV — у Cpf1 от *Acidaminococcus sp.* и *Lachnospiraceae sp.* и т.д.) и не зависит от последовательности крРНК [25, 32].

После обнаружения ПАМ рибонуклеопротеиновый комплекс останавливается в этой области, вызывает локальное расплетение цепей ДНК (проявляет хеликазную активность) и пытается внедрить в локально разделенные цепи ДНК последовательность крРНК. Если наблюдается высокая комплементарность крРНК к данному участку ДНК, то спейсер крРНК вытесняет соответствующую цепь ДНК из дуплекса (и она дополнительно стабилизируется положительно заряженными аминокислотами, входящими в состав молекулы нуклеазы) и образуется комплекс ДНК*крРНК*тракрРНК*Cas9, что приводит к активации нуклеазных доменов Cas9 и внесению двуцепочечного разрыва в ДНК. В случае недостаточной комплементарности комплекс диссоциирует и Cas9 продолжает сканирование. Таким образом, для расщепления целевой ДНК необходимо строгое соблюдение трех условий в указанной последовательности: связывание крРНК*тракрРНК с Cas (что приводит к активации домена, распознающего ПАМ), обнаружение ПАМ (что приводит к диссоциации цепей), высокая степень комплементарности крРНК ($\geq 90\%$) к выбранному локусу ДНК (что приводит к активации нуклеазных доменов нуклеазы и расщеплению ДНК) [33].

Необходимость соблюдения всех этих условий обеспечивает высокую специфичность системы CRISPR/Cas и защищает бактерий от ауторасщепления хромосомной ДНК. Ведь, по сути, спейсер крРНК закодирован в геноме бактерий и представляет собой идеально комплементарную мишень для распознавания комплексом крРНК*тракрРНК*Cas9, содержащим такую же крРНК. Ключевую роль в дифференциации хромосомной ДНК бактерии и ДНК паразитического элемента на этапе CRISPR-интерференции играет ПАМ-последовательность: в хромосомной ДНК она отсутствует в непосредственной близости от спейсера в составе CRISPR-массива, в то время как в целевой ДНК генетического паразита протоспейсер и ПАМ со-локализованы, что «разрешает» активацию нуклеазных доменов Cas9 и расщепление ДНК паразита. Расщепление ДНК разрушает целостность генов паразита

и открывает доступ экзонуклеазам, которые довершают разрушение паразитической ДНК. Нуклеазы Cas9 *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus thermophiles* генерируют перекрывающиеся, так называемые тупые концы ДНК в месте разрыва, а Cpf1 от *Acidaminococcus sp.* и *Lachnospiraceae sp.* — 5'-выступающие концы [34], «липкие». Согласно последним исследованиям, комплекс крРНК*тракрРНК*Cas9 после расщепления мишени способен реактивироваться и продолжить сканирование новых подходящих PAM [35].

Благодаря исследованиям микробиологических сообществ было идентифицировано 6 типов и более 30 подтипов различных систем CRISPR/Cas [36]. Их классификация базируется на особенностях захвата протоспейсера, процессинга пре-крРНК, количестве участников в эффекторном комплексе, целевой молекулы нуклеиновой кислоты, характеристиках PAM и типе расщепления протоспейсера в паразитическом элементе. Неожиданной находкой оказалось обнаружение систем CRISPR/Cas одного и того же типа в эволюционно далеких микроорганизмах и наличие нескольких систем разного типа в одной клетке. Все это свидетельствует об активном горизонтальном переносе генетической информации в микромире [37].

Применение системы CRISPR/Cas9 для редактирования генома в биомедицине

На основании данных о прецизионной нуклеазной активности системы CRISPR/Cas в ходе CRISPR-интерференции было предложено задействовать ее для внесения прецизионных

разрывов в геномную ДНК эукариотических организмов, в т.ч. и человека [20, 38, 39]. Однако это потребовало ряда ее оптимизаций, поскольку исходно система бактериального иммунитета CRISPR/Cas была оптимизирована миллионами лет эволюции для работы в бактериальных клетках в условиях небольшого генома и предназначалась лишь для деградации целевой нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК).

Для адаптации молекулы нуклеазы к работе в эукариотической клетке к ней был прикреплен сигнал ядерной локализации, чтобы доставить ее к месту основного хранения наследственной информации (в ядро). Использование генетических конструкций, кодирующих редакторы генома, потребовало оптимизации кодонного состава их генов — с целью увеличения эффективности трансляции белков генетических редакторов в эволюционно далеких гетерологичных системах (клетки млекопитающих и других эукариот по отношению к клеткам бактерий).

Также в целях удобства для одной из самых популярных и первых предложенных CRISPR/Cas систем — Cas9 от *Streptococcus pyogenes* (или SpCas9) было произведено объединение молекул крРНК*тракрРНК в единую синтетическую молекулу РНК (гидовая/направляющая РНК, гРНК или guide RNA, gRNA), которая, как было показано, служит практически равноценной заменой комплекса крРНК*тракрРНК [40]. Такая оптимизированная система CRISPR/Cas может быть использована для редактирования генома эукариотических клеток (рис. 3). Следует также отметить, что природная

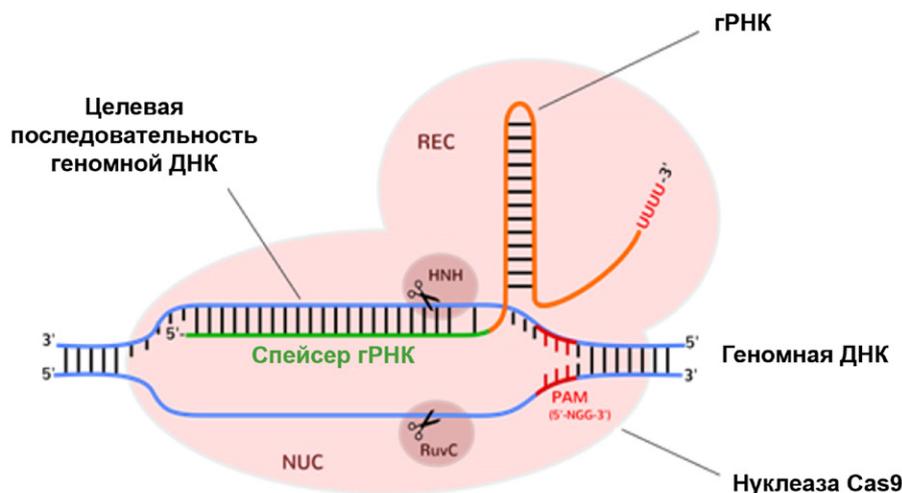


Рис. 3. Принципиальная схема функционирования системы PF CRISPR/Cas в эукариотической клетке

способность нуклеазы распознавать определенную PAM-последовательность может быть изменена посредством генетической модификации PAM-распознающего домена, что увеличивает гибкость системы CRISPR/Cas и расширяет спектр возможных областей для наведения [41]. Возможны и дополнительные модификации нуклеаз с выключением одного или всех нуклеазных доменов, в результате чего получают нуклазу (фермент, расщепляющий одну из цепей ДНК и генерирующий так называемый ник — одноцепочечный разрыв) [42] или каталитически неактивную молекулу нуклеазы, которая, впрочем, по-прежнему сохраняет способность специфично связываться с заданными протоспейсерами.

Одной из основных задач для системы CRISPR/Cas в эукариотических клетках является внесение прицельного (направленного) разрыва в интересующий локус ДНК. Дальнейший исход такого разрыва определяется работой систем репарации геномной ДНК, причем было установлено, что в зависимости от типа разрыва могут задействоваться различные системы репарации. Наиболее оперативно активируемой и наименее требовательной является система негомологического соединения концов NHEJ (Non-Homologous End Joining), которая в течение 1–5 часов (по разным данным) с точностью 95% восстанавливает исходную последовательность ДНК конец-в-конец [43]. Именно ее высокая активность и точность защищают стабильность генетического материала и делают сложную многоклеточную жизнь возможной.

Согласно некоторым исследованиям единоментно в каждой из клеток высших эукариот присутствует до 40 двуцепочечных разрывов ДНК, которые образуются в результате репликации, транскрипции, повреждения ионизирующим излучением или химическими агентами, в том числе активными формами кислорода [44]. И все эти разрывы должны быть точно и оперативно репарированы для предотвращения мутаций и утраты частей генома, что и выполняет NHEJ. Впрочем, ~ в 5% случаев возможна утрата или встраивание небольшого количества нуклеотидов, что при разрыве в кодирующей области генома с большой долей вероятности может привести к сдвигу рамки считывания и выключению синтеза целевого белка. Именно на эту небольшую вероятность ошибки и нацелена данная разновидность системы CRISPR/Cas: нуклеаза распознает и разрезает ДНК в этом локусе

снова и снова, пока не произойдет накопление ошибки, а сайт расщепления станет нераспознаваемым. Это может быть использовано как в исследовательских целях (выключение белков с целью изучения их функции — см. далее), так и для коррекции ряда наследственных заболеваний, для которых характерна продукция мутантной токсической формы природного белка (к примеру, транстриетиновый амилоидоз, амавроз Лебера и др.) [45, 46].

Одним из ярких примеров клинического применения CRISPR/Cas с доказанной эффективностью является редактирование гена *CCR5* в аутологичных гематopoэтических стволовых клетках (ГСК) ВИЧ-инфицированных пациентов. Данный подход является одним из способов выработки резистентности к ВИЧ в аутологичных ГСК и их производных. В его основе лежит искусственное получение описанной ранее мутации *delta32* гена *CCR5* (делеция 32 нуклеотидов), которая приводит к утрате N-конца *CCR5* (служит ко-рецептором для инвазии ВИЧ-1) и при гомозиготном состоянии ассоциирована с резистентностью к инфицированию ВИЧ-1 [47]. Ранее трансплантация костного мозга от совместимых доноров с мутацией *CCR5 delta32* ВИЧ-инфицированным была предложена Gero Hütter и с успехом проведена ВИЧ-инфицированному Timothy Brown. В этом случае результат превзошел все ожидания, и проведенная терапия позволяет пациенту жить полноценной жизнью даже в отсутствие антиретровирусной терапии с 2007 года [48, 49]. Несмотря на успех, этот подход удалось реализовать всего несколько раз — и в большинстве случаев трансплантация такого костного мозга заканчивалась отторжением трансплантата или развитием реакции «трансплантат против хозяина». Ввиду этого концепция претерпела изменения, и в качестве более предпочтительного стал рассматриваться подход, предполагающий редактирование аутологичных ГСК, для чего с успехом применяются различные системы РГ, в том числе CRISPR/Cas [50].

Системы РГ потенциально могут решить и основные проблемы трансплантологии: доступности и совместимости донорского материала, а также ряд этических и правовых проблем, связанных с трансплантологией. Так, в 2017 году George Church совместно с Quihan Biotech (<https://www.qihanbio.com/>) заявил о создании породы свиней — универсальных доноров, в которых

были исключены эндогенные ретровирусы свиней (>60), а также ряд генов, ответственных за распознавание донорских тканей системой комплемента реципиента [51]. Сердца от таких геномодифицированных свиней были успешно трансплантированы приматам, с которыми они прожили от полугода до 2 лет [52]. В 2021–2022 годах было произведено две трансплантации органов (почка и сердце) от таких свиней человеку: женщине в состоянии клинической смерти и мужчине (David Bennett) с неоперабельной кардиомиопатией. После трансплантации с сердцем свиной David Bennett прожил 2 месяца, и данное исследование показало, что сердце свиной способно успешно функционировать в организме человека, однако одним из основных механизмов дисфункции ксенотрансплантированного сердца по-прежнему является иммунологическое отторжение [53]. Полученные данные будут использованы для дальнейшей генетической модификации и оптимизации ранее полученной породы свиней-доноров.

Благодаря своей способности вносить прецизионный двуцепочечный разрыв в ДНК и индуцировать сдвиг рамки считывания система CRISPR/Cas удобна в проведении фундаментальных исследований. Одним из вариантов ее применения является CRISPR-скрининг, который позволяет одновременно осуществлять редактирование в широком спектре генов с целью установления их функции в том или ином изучаемом процессе. Для этого используют не одну направляющую РНК, а целую их библиотеку, каждая из которых нацелена на конкретную мишень (ген белка или микроРНК) [54, 55]. Существует большое разнообразие таких библиотек гРНК, направленных как на все потенциальные белок-кодирующие гены, так и на некую совокупность генов, вовлеченных в реализацию конкретной биологической функции, например миграцию, пролиферацию или дифференцировку клеток, активацию конкретного сигнального каскада, репарацию ДНК и т.п. Клетки, обработанные библиотекой векторов, несущих гРНК, клонируются (рассаживаются по одному), наращиваются, и затем оценивается сохранность или утрата в них интересующей функции (<https://www.genscript.com/CRISPR-gRNA-library.html?src=pullmenu>). Для ответивших клонов устанавливаются последовательности задействованных в геномном редактировании гРНК, что позволяет сделать вывод об участии тех или иных генов в исследуемых процессах.

Одним из основных объектов исследования для CRISPR-скрининга являются опухолевые клетки. Исследования на них позволили не только подтвердить существующие мишени для противоопухолевых препаратов, но и открыть новые белки-мишени, критически важные для выживания опухолевых клеток. Яркому примеру успешного применения технологии CRISPR-скрининга можно отнести идентификацию мишени (белок MR1) для универсального химерного антигенного рецептора (CAR, chimeric antigen receptor), опосредующего лизис широкого спектра опухолевых клеток и предполагаемого к использованию в составе CAR T-лимфоцитов для терапии широкого спектра онкологических заболеваний [56]. Потенциал данной технологии ограничен использованием легко модифицируемых клеток, способных к росту в условиях клонирования.

Помимо этого, данная модификация системы CRISPR/Cas, встроенная в геном мыши под контроль индуцируемого промотора, может быть использована для изучения судьбы клеток в процессах эмбриогенеза, регенерации и обновления тканей. Суть технологии, которая получила наименование CARLIN (CRISPR array repair lineage tracing), заключается в пульс-индукции экспрессии геномного редактора и модификации ряда локусов геномной ДНК с получением специфичного паттерна (картины) редактирования для каждой из клеток [57]. Уникальность паттернов редактирования для каждой из отредактированных клеток обусловлена работой систем репарации, возможностью их ошибки и случайной интеграцией/делецией нуклеотидов в ряде аллелей. Все это дает возможность отслеживать судьбу потомков отредактированной клетки *in vivo* в ходе процессов дифференцировки, дедифференцировки и трансдифференцировки, что дает мощный инструмент для изучения клеточных механизмов эмбриогенеза, регенерации и обновления тканей.

Для вырезания регуляторных и некодирующих областей генома, а также генов некодирующих РНК, для которых вставка, делеция или замена нескольких нуклеотидов не является критичной, может быть применено единомоментное использование двух рибонуклеопротеиновых комплексов, нацеленных на два различных протоспейсера, фланкирующих (прилежащих снаружи) фрагмент ДНК (до 1 млн нуклеотидов),

подлежащий удалению. Важным условием применения данной модификации CRISPR/Cas является создание высоких пиковых концентраций генетического редактора — в противном случае расщепление ДНК по целевым протоспейсерам будет происходить независимо, в различные моменты времени, и делеции искомого фрагмента не произойдет. Другим возможным исходом такого редактирования является инверсия вырезаемого фрагмента.

Технологию CRISPR/Cas можно использовать не только для внесения мутаций, сдвига рамки считывания и вырезания фрагментов ДНК. Она может быть задействована для встраивания последовательностей ДНК в целевой локус. Для этого помимо самих комплексов Cas9*гРНК требуется внесение в клетку (ядро клетки) ДНК-матрицы. Что касается систем репарации, то для интеграции ДНК-матрицы в геном могут быть задействованы как NHEJ, так и HDR (Homology-Directed Repair, гомологически направленной репарации). NHEJ способен встроить любую внесенную ДНК-матрицу прямо в область разрыва (без учета какой-либо гомологии); для этого матрица должна быть двуцепочечной и не очень длинной, чтобы была возможность создать ее достаточно высокую концентрацию в ядре и в области повреждения, однако использование NHEJ может привести к встраиванию ДНК-фрагмента в обратной ориентации или к единомоментному встраиванию сразу нескольких копий ДНК-фрагмента. Модификацией данного подхода является технология HITI (homology-independent target integration). Подробнее с принципом ее функционирования, возможностями и ограничениями можно ознакомиться в работе [58].

Система репарации HDR работает по другому принципу: она задействует гомологию между ДНК-последовательностями. В этом случае одна из цепей поврежденной ДНК устанавливает комплементарные взаимодействия с ДНК-матрицей, и в случае высокой гомологии этих последовательностей ДНК-матрица выполняет роль основы (а поврежденная цепь ДНК выступает в роли ДНК-затравки/праймера) для копирования и последующего встраивания в область разрыва [59]. Как понятно из описания, ключевыми для такого типа репарации являются особым образом спроектированные ДНК-матрицы, в которых область для копирования расположена в центре и с двух сторон окружена последо-

вательностями, идентичными или в высокой степени гомологичными целевой области редактирования.

При таком типе репарации в качестве ДНК-матрицы могут быть задействованы кольцевые и линейные молекулы ДНК (плазмидная ДНК, ПЦР-ампликон, одноцепочечная ДНК (ssODN, single-stranded oligodeoxynucleotides)), в том числе гомологичная хромосома. Данный тип репарации позволяет исправлять практически любые мутации и вставлять ДНК в любой локус генома по желанию, что может быть использовано как в исследовательских целях, так и с целью коррекции наследственных патологий.

Впрочем, этот подход характеризуется целым рядом недостатков, ограничивающих его широкое распространение. Среди них необходимость в ДНК-матрице, активность в строго определенные фазы клеточного цикла (S-, G2-фазы) и меньшая оперативность по сравнению с NHEJ, в результате чего в большинстве исследований эффективность HDR не превышала 1–7%. Для преодоления этих ограничений и увеличения активности HDR был предложен ряд экспериментальных подходов: ингибирование активности компонентов NHEJ, синхронизация доставки геномного редактора и ДНК-матрицы в область редактирования, а также синхронизация клеточного цикла в клетках (с остановкой в G2-фазе клеточного цикла) — в результате эффективность HDR удалось поднять до 12–18% [60, 61].

Гомологически направленная репарация, индуцированная системами РГ, может быть использована как один из способов создания экспериментальных моделей, а также как подход к терапии ряда заболеваний. Одним из примеров, где CRISPR/Cas-индуцированный HDR уже доказал свою эффективность как перспективный терапевтический подход, является создание Т-лимфоцитов, несущих химерный антигенный рецептор (chimeric antigen receptor, CAR) к клеткам опухолей. Полученные таким образом CAR Т-лимфоциты по своим свойствам значительно превосходят таковые, полученные посредством трансдукции ретровирусным или лентивирусным вектором. HDR позволяет прицельно интегрировать ген *CAR* в локус Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR), под контроль промотора гена *TRAC*, что обеспечивает физиологический уровень экспрессии

антиген-распознающего рецептора [62]. Все это снижает гиперактивацию Т-лимфоцитов и обеспечивает их более продолжительную выживаемость и функционирование, в противоположность тому, что наблюдается при случайной интеграции (по количеству копий и области встраивания) ретровирусного и лентивирусного генома в геном Т-лимфоцитов, когда ген *CAR* гиперэкспрессирован и коэкспрессирован с TCR, что приводит к гиперактивации Т-лимфоцитов, цитокиновому шторму, функциональному истощению и быстрой гибели таких *CAR* Т-лимфоцитов. Наиболее оправданным подходом для генетической модификации клеток пациента является модификация *ex vivo* с последующей ретрансплантацией полученных клеток ввиду сложности доставки ДНК-матрицы и относительно низкой эффективности самого HDR.

Для редакторов, осуществляющих двуцепочечный разрыв ДНК, характерен ряд существенных недостатков, таких как умеренная активность и возможность утраты или инверсии части хромосомы, а также индукция хромосомных транслокаций [63, 64]. Невысокая редактирующая активность таких нуклеаз на самом деле обусловлена высокой эффективностью систем репарации ДНК, в частности NHEJ. Что касается индукции хромосомных мутаций, предполагают, что это может быть обусловлено временной и пространственной солокализацией спонтанно возникающих разрывов с разрывами, вносимыми самими нуклеазами. Также было показано, что изредка одноцепочечный разрыв (ник) ДНК может конвертироваться в двуцепочечный, а следовательно, применение ника также сопряжено с риском хромосомных мутаций, хотя и в меньшей степени. Справедливости ради, следует отметить, что такие же недостатки характерны для ZFNs и TALENs, поскольку обусловлены не свойствами нуклеаз, а особенностями организации и функционирования генома.

Параллельно с поиском вариантов применения природной нуклеазной активности геномных редакторов развивалось и понимание того, что они могут быть не только эффекторами, разрезающими ДНК, но и платформой (посредниками) для прицельной доставки в нужную область генома других эффекторных молекул, и выбор таких молекул может быть ограничен только фантазией разработчика. Здесь мы рассмотрим наиболее интересные и перспективные из них.

В 2017 году впервые было предложено модифицировать последовательность ДНК без внесения в нее разрывов: David Liu предложил присоединить к молекуле Cas9 молекулы цитозин- и адениндезаминаз — ферментов, катализирующих гидролиз 4-аминогруппы цитозина и 6-аминогруппы аденина соответственно [65]. Такая разновидность модификаций CRISPR/Cas получила название редакторов азотистых оснований (Base Editors, BE). Для лучшего понимания принципов их функционирования необходимо обратиться к рассмотрению структуры геномной ДНК*гРНК*Cas9. гРНК распознает протоспейсер и по принципу комплементарности связывает одну из цепей ДНК, формируя дуплекс РНК*ДНК.

Вторая цепь ДНК в то же время локально представляет собой одноцепочечную ДНК, которая и может быть атакована дезаминазами. Дезаминазы вызывают конверсию аденина в инозин (в ходе репликации и транскрипции интерпретируется как гуанин), а цитозина — в дезоксиурацил (интерпретируется как тимин). Таким образом, редакторы оснований позволяют осуществлять замены А->G и С->Т, что может быть использовано для моделирования или исправления ряда точечных мутаций или выключения целевого гена. Для реализации последней задачи необходимо наличие в протоспейсере целевого гена кодонов CAA, CAG, CGA или TGG, причем они должны располагаться в диапазоне 3–7 нуклеотидов протоспейсера (для SpCas9-BE), а сам протоспейсер должен быть уникален. В этом случае происходит конверсия кодонов, кодирующих аминокислоты, в стоп-кодоны: CAA -> TAA, CAG -> TAG, CGA -> TGA, TGG -> TAA/TAG/TGA, что приводит к преждевременной терминации трансляции и нокауту целевого гена. Направленность действия дезаминаз (активность в определенном окне редактирования) определяется длиной полипептидного линкера, связывающего нуклеазу и дезаминазу. В области деаминарования возникает локальная некомплементарность нуклеотидов, которая детектируется системами репарации ДНК (в основном, Nucleotide Excision Repair, NER или Base Excision Repair, BER) и в 50% случаев репарируется с образованием исходной последовательности. Для смещения равновесия в сторону репарации немодифицированной цепи и сохранности модифицированного основания в немодифицированную цепь дополнительно вносят одноцепочечный разрыв (с помощью нуклеазы-никазы),

что интерпретируется системами репарации как сигнал к ее исправлению.

Преимуществом редакторов оснований является их высокая эффективность (по нашим данным вероятность модификации составляет более 60%), а также отсутствие необходимости внесения двуцепочечного разрыва, что снижает вероятность нежелательных последствий геномного редактирования (хромосомные делеции и транслокации). Ввиду этого редакторы оснований нашли широкое применение в проведении исследований и считаются одним из наиболее перспективных и безопасных инструментов для коррекции моногенных наследственных патологий.

У редакторов оснований есть и недостатки: используемые дезаминазы являются конститутивно активными и не требуют связывания с протоспейсером — в результате они способны вызывать неспецифическое деаминирование одноцепочечных ДНК и РНК [66]. Впрочем, с помощью методов генной инженерии удалось значительно снизить активность редакторов оснований в отношении одноцепочечной РНК при сохранении их активности в отношении ДНК [67]. Другим недостатком ВЕ является неспособность дифференцировать целевое азотистое основание в «окне редактирования»: если встречаются несколько поддающихся деаминированию оснований, то с высокой долей вероятности все они будут деаминированы (отредактированы). Этот недостаток ВЕ пока преодолеть не удалось, но его можно обойти использованием альтернативных систем редактирования, например PrimeEditing (PE).

Метод редактирования PE был представлен в 2019 году David Liu [68]. В его основе лежит использование гибридной молекулы нуклеазы (SpCas9) и обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus). Комбинированный фермент SpCas9-MMLV за счетниказной активности надрезает вытесненную цепь ДНК, а затем за счет активности MMLV достраивает ее с внесением или делецией заданных нуклеотидов, при этом 3'-конец вытесненной цепи ДНК выполняет роль затравки (прайма), а роль РНК-матрицы выполняет 3'-фрагмент гРНК. Технология PE позволяет осуществлять вставки в область разрезания до 40 нуклеотидов и делеции до 80 нуклеотидов. Согласно сообщениям разработчиков исходная версия PE обладала активностью <5%,

однако после ряда модификаций его эффективность была увеличена до 20–30%. Побочным эффектом PE являются инсерции и делеции нескольких нуклеотидов в области редактирования — таких аллелей <10% [69].

Помимо непосредственного изменения нуклеотидной последовательности системы CRISPR/Cas позволяют прицельно управлять активностью отдельных генов, как напрямую — через привлечение или блокирование связывания транскрипционного комплекса, так и опосредованно — через эпигенетические модификации ДНК и гистонов. Для этих задач был разработан широкий спектр инструментов, построенных по одному и тому же принципу: каталитически неактивная нуклеаза выполняет навигационную функцию и доставляет эффекторные субъединицы (активатор/ингибитор сборки транскрипционного комплекса, метилазы, деметилазы, ацетилазы и деацетилазы) в интересующую область генома (чаще всего в промоторную область гена). Ввиду того что область связывания транскрипционных факторов и эпигенетических модификаций не является строго локализованной, эффективное применение данного класса инструментов требует их наведения на несколько разных протоспейсеров в интересующей области [70, 71]. Аналогичным образом осуществляют мечение интересующих ДНК-локусов с целью трехмерного картирования генома — для этого используют гибридные молекулы каталитически неактивной нуклеазы и флуоресцентных меток (флуоресцентные белки или Q-dots) [72].

Существует еще ряд CRISPR/Cas-опосредованных методов, которые могут быть использованы в научных исследованиях (индукция хромосомных транслокаций [73], XiST-опосредованная инактивация отдельных хромосом [74], детекция специфических нуклеотидных последовательностей (SHERLOCK) [75] и т.п.).

Несколько особняком от описанных вариантов использования технологий РГ стоит технология CARPID (CRISPR-Assisted RNA-Protein Interaction Detection), поскольку она осуществляет модификацию не нуклеиновых кислот, а связанных с ними белков [76]. В основе данного инструмента лежит гибридная молекула каталитически неактивной РНК-специфичной нуклеазы RfxCas13d и биотин-лигазы BASU. RfxCas13d посредством крРНК направляется в интересующую область РНК, а BASU лигирует биотин

к аминокислотным остаткам РНК-связывающих белков в этой области. Такие биотинилированные белки могут быть экстрагированы для последующей идентификации и изучения.

Из приведенного выше описания возможных областей применения CRISPR/Cas становится понятен потенциал данной технологии РГ и то, что ряд ее прорывных модификаций (к примеру, использование никаз, CRISPR-скрининг и PE) было бы невозможно реализовать на базе ZFNs и TALENs.

Технические, этические и правовые ограничения применения технологий редактирования генома в биомедицине

Общим недостатком для всех описанных модификаций технологии CRISPR/Cas является возможность распознавания нецелевых протоспейсеров — так называемых off-targets, причем структура молекулы SpCas9, согласно опубликованным данным, допускает активацию нуклеазных доменов даже в случае некомплементарности между гРНК и целевым протоспейсером от 2 до 10 нуклеотидов, а также 1- или 2-нуклеотидного выпячивания ДНК или РНК. Для большинства случаев считается, что несовпадение 2–3 нуклеотидов, в особенности расположенных близко к РАМ, радикально снижает или препятствует активации нуклеазных доменов SpCas9. Склонность к связыванию с выраженно некомплементарными мишенями во многом определяется нуклеотидной последовательностью самого протоспейсера, однако четких закономерностей установлено не было, что не позволяет *in silico* идентифицировать и отбраковывать такие гРНК [77].

Был разработан ряд биоинформатических инструментов, позволяющих предсказывать специфичность выбранных протоспейсеров гРНК, однако их мощность ограничена идентификацией потенциальных сайтов связывания гРНК, отличающихся несовпадением от исходного протоспейсера до 3 нуклеотидов и 1- или 2-нуклеотидным выпячиванием ДНК или РНК в дуплексе ДНК*РНК [78]. Такая некомплементарность между гРНК и протоспейсером вносит наиболее значимый вклад в нецелевое редактирование с использованием нуклеаз, расщепляющих 2 цепи ДНК, поскольку двуцепочечный разрыв (даже в нецелевой области) запускает механизм репарации NHEJ, что может привести к вставке/делеции нуклеотидов и сдвигу

рамки считывания в кодирующей области гена. На точность систем парных никаз, BE, PE и CRISPR/Cas-опосредованной регуляции активности генов такие off-target, в большинстве, не оказывают влияния, поскольку реализация их активности требует выполнения строгих дополнительных условий: парное расположение никаз на противоположных цепях на дистанции 40–80 нуклеотидов (система парных никаз), наличие подходящих нуклеотидов в окне редактирования и в кодирующей области гена (для BE), комплементарность 3'-концов ДНК и РНК (для PE), со-локализация сразу нескольких протоспейсеров в одном локусе (для систем CRISPR/Cas-опосредованной регуляции активности генов).

Поскольку предсказать все потенциальные сайты связывания гРНК не представляется возможным, то применяют альтернативные подходы. Так, для коррекции наследственных патологий рекомендуется осуществлять редактирование аутологичных клеток (гематопозитических стволовых клеток, фибробластов кожи, кератиноцитов) *ex vivo* с последующим полногеномным секвенированием (с целью детекции возможного нецелевого редактирования) и ретрансплантацией полученных клеток. Использование технологий редактирования генома *in situ* (в организме человека) оправдано лишь при жизнеугрожающих состояниях, что обусловлено описанными выше недостатками технологий РГ. В этом случае по возможности рекомендуется использовать редакторы, не вносящие двуцепочечных разрывов ДНК: никазы, BE, PE, редакторы эпигенома.

Для уменьшения вклада неспецифического редактирования генома в результаты фундаментальных исследований рекомендуется параллельное использование двух и более гРНК для выключения целевого гена. Результаты исследований, полученные для каждой из таких отредактированных клеточных линий, сопоставляются и совпадающие эффекты считаются специфическим результатом редактирования, а расходящиеся обычно интерпретируются как возможные исходы побочного нецелевого редактирования [79]. Такая логика обусловлена тем, что даже если у используемых гРНК есть альтернативные сайты распознавания в геноме, то вероятность их пересечения в одном и том же локусе (кроме целевого) равна нулю.

Полногеномное исследование отредактированных клеточных линий также является возможным способом контроля специфичности геномного редактирования в эксперименте, однако используется крайне редко ввиду своей высокой стоимости. Согласно данным литературы, вероятность нецелевого редактирования также можно снизить, ограничив время работы систем редактирования, в связи с чем разрабатывают системы индуцируемой экспрессии редакторов и временного контроля их существования [80–82]. В ряде исследований было показано, что долговременная активность систем РГ CRISPR/Cas9 в клетке (более 2 недель) может приводить к накоплению сайтов нецелевого редактирования [82, 83].

Что касается вариантов доставки систем РГ в целевые клетки, то редакторы генома могут быть доставлены в виде готовых рибонуклеотидных комплексов или в виде кодирующих их ДНК или РНК. Каждый из этих вариантов имеет свои особенности: рибонуклеотидные комплексы и РНК менее стабильны, чем ДНК, однако они являются единственным возможным вариантом для редактирования генома зигот с целью получения генетически модифицированных линий экспериментальных животных, поскольку транскрипция в зиготе и первых дочерних бластомерах подавлена. Для доставки систем РГ и их компонентов в целевые клетки применяют практически все известные способы генетической модификации: липофекция, электропорация, оптопорация, механическая трансфекция (трансфекция кристаллами фосфата кальция, золотыми наночастицами и т.п.), вирусная трансдукция, трансфекция рибонуклеопротеиновыми комплексами, конъюгированными с мембрана-пенетрирующими пептидами, и прямая инъекция компонентов систем РГ в клетку или ее ядро [79, 84].

Подтверждать редактирование генома необходимо с помощью минимум двух различных подходов: секвенирование ДНК в области редактирования и анализ уровня и/или качества отредактированного белка (или некодирующей РНК, если производилось редактирование гена некодирующей РНК) [79]. Следует отметить, что контроль уровня соответствующей мРНК после редактирования (нокаутирования) белкового гена не является значимым показателем успешности редактирования, потому что возможны различные варианты ее

изменения (зависит от конкретного гена, типа клеток и характера редактирования): отсутствие изменений (при этом трансляция белка нарушена за счет сдвига рамки считывания или введения стоп-кодона), снижение ее количества за счет активации механизма Non-sense-mediated mRNA decay или увеличение ее экспрессии в случае активации механизмов отрицательной обратной связи (попытка клетки компенсировать недостаток отредактированного белка) [85].

Следует помнить, что системы редактирования генома, несмотря на свой высокий потенциал, не являются панацеей (как для клинического применения, так и при проведении фундаментальных исследований) и в ряде случаев могут быть с успехом заменены методами классической генной терапии (экспрессией трансгена), использованием некодирующих РНК (микроРНК (miRNA), малые интерферирующие РНК (siRNA), малые активирующие РНК (saRNA), малые ядерные РНК (snRNA), длинные некодирующие РНК (lncRNA), и т.д.), селективными химическими ингибиторами и пр.

Из всего приведенного выше понятно, что системы РГ — мощный инструмент в фундаментальных исследованиях, но одной из самых долгожданных областей их практического применения для человечества является терапевтическая коррекция наследственных заболеваний и создание лекарственных препаратов для ряда других патологий (инфекции, опухолевые заболевания). По описанным выше причинам (нецелевое редактирование, возможность хромосомных мутаций и т.п.) большинство проводимых доклинических и клинических исследований предполагает проведение редактирования генома аутологичных или аллогенных клеток *ex vivo* с последующей их ретрансплантацией после подтверждения соответствия всем протоколам фармакологической безопасности. По данной схеме проводятся исследования для геномной коррекции следующих типов клеток: гематопозитические стволовые клетки (для лечения метахроматической лейкодистрофии, синдрома Вискотта — Олдрича, различных анемий, тяжелого X-сцепленного комбинированного иммунодефицита, а также выработки резистентности клеток крови к ВИЧ) [50, 86], фибробласты и кератиноциты (буллезный эпидермолиз) [87], альвеолоциты (муковисцидоз) [88].

В ряде случаев, при прогрессирующих заболеваниях, сопряженных с высоким риском для жизни, или невозможности извлечения редактируемого органа, возможно проведение РГ прямо в организме пациента, при этом должны быть учтены и сопоставлены все возможные преимущества и недостатки такого подхода. Такой подход к генетической коррекции патологий планируется использовать для лечения заболеваний центральной нервной системы (хорея Гентингтона, моногенные нейродегенеративные и демиелинизирующие заболевания), патологий сетчатки (амавроз Лебера, пигментный ретинит, возрастная макулярная дегенерация), заболеваний печени (транстиретиновый амилоидоз, наследственная гиперхолестеринемия, гипераммониемия, гемофилии, инфекционные гепатиты), патологии мышечной ткани (миодистрофии) [45, 46, 89, 90].

По данным ресурса ClinicalTrials.gov, на момент написания данной статьи зарегистрировано 60 клинических исследований на различных стадиях для лекарственных кандидатов на основе CRISPR/Cas9, 8 — для лекарственных кандидатов на основе TALENs и 23 — на основе ZFNs. Абсолютное большинство таких лекарственных кандидатов предназначено для редактирования генома *ex vivo*, и лишь некоторые нацелены на редактирование генома *in situ* для коррекции транстиретинового амилоидоза (NCT04601051), гемофилии Б (NCT06379789), наследственного ангионевротического отека (NCT05120830), пигментного ретинита (NCT05805007) или амавроза Лебера (NCT03872479).

В конце 2023 года Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США выдало регистрационное удостоверение для первого препарата Casgevy (exagamglogene autotemcel), основанного на технологии CRISPR/Cas9, для *ex vivo* редактирования гена *BCL11A* в аутологичных гематопоэтических стволовых клетках при серповидноклеточной анемии и бета-талассемии (<https://www.casgevy.com/>).

С точки зрения законодательной регуляции применение технологий РГ в соматических тканях *in situ* в РФ и множестве зарубежных стран приравнивается к генной терапии / классической фармакотерапии и является разрешенным подходом при условиях тщательной оценки эффективности и безопасности таких лекарствен-

ных препаратов. При этом применение клеток с отредактированным геномом (в том числе аутологичных), несмотря на их предположительно большую безопасность (при условиях временного контроля работы систем РГ, последующего полногеномного секвенирования отредактированных клеток и введения пациенту преддифференцированных или дифференцированных клеток) вызывает у фармацевтических регуляторов больше опасений, чем *in situ* применение технологий РГ, и в ряде стран (в том числе в РФ) находится под достаточно жестким контролем. Подробнее с основными законодательными нормами, регулирующими клиническое применение технологий РГ, можно ознакомиться в соответствующих обзорных работах [91–93].

Говоря о вопросах этики и законодательной регуляции технологий редактирования генома, нельзя обойти вопрос внесения наследуемых изменений в геном человека. С одной стороны, внесение таких изменений позволяет осуществлять профилактику генетических заболеваний и изучать ранние этапы эмбриогенеза человека. Но, с другой стороны, сопряжено с риском нецелевого редактирования, мозаицизмом генетического профиля и снижения стабильности генома индивидуума, а также чревато злоупотреблениями с целью «улучшения/ухудшения породы» человека с последующим усугублением социального неравенства и формированием кастового общества — эти вполне обоснованные опасения нашли отражения в ряде художественных произведений, таких как «Дивный новый мир», «Гаттака» и др.

В 2017 году мир потрясло сообщение о том, что в Китае были рождены девочки-близнецы Лулу и Нана с отредактированным геном *CCR5*. Китайские исследователи (He Jiankui и коллеги), осуществившие такое редактирование, мотивировали это необходимостью создания у близнецов иммунитета к ВИЧ [94]. В 2019 году они были приговорены к тюремному заключению от 1,5 до 3 лет и штрафу от 500 тыс. до 3 млн юаней с формулировкой «за осуществление медицинской деятельности без лицензии». Исследования последствий такого редактирования, проведенные в 2019 г., показали, что «ни у Лулу, ни у Наны не было желаемой делеции из 32 пар оснований в гене *CCR5* и каждый эмбрион вместо этого экспрессировал варианты различной длины. Ранее не было показано, что эти новые мутации предотвращают ВИЧ-инфекцию — наоборот, они могут

быть вредоносными. Некоторые данные He Jiankui также предполагают наличие как отредактированных, так и неотредактированных клеток (мозаицизм), а также не исключают нецелевых эффектов редактирования, которые могут вызвать другие непредвиденные изменения в геноме» [64, 95–98] или привести к отсроченным нежелательным последствиям [99].

Таким образом, с точки зрения большинства специалистов в области генетики и редактирования генома наследуемое редактирование генома в настоящий момент несет больше рисков для человечества, чем положительных моментов. Возможные позитивные стороны наследуемого редактирования генома уже сейчас могут быть с успехом заменены альтернативными технологиями: донорством гамет, технологиями экстракорпорального оплодотворения и предимплантационного скрининга или проведением работ на эмбрионах животных (в исследовательских целях). По состоянию на 2020 год абсолютное большинство стран запрещает генетическую модификацию эмбриональных стволовых клеток, гамет и зигот человека с целью репродукции [100]. Фундаментальные исследования, предполагающие генетическую модификацию эмбриональных стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, гамет и зигот человека с последующим получением генетически модифицированного эмбриона, допустимы при условиях бесспорной аргументации в пользу их необходимости, соблюдения всех этических и правовых норм и культивирования таких эмбрионов в течение не более 14 дней, после чего эти эмбрионы должны быть заморожены или уничтожены [92, 101].

Технологии редактирования генома активно развиваются и используются в Российской Федерации в основном для получения клеточных и животных моделей с целью изучения механизмов развития заболеваний и поиска перспективных подходов к их терапии. Накопленный опыт

отечественных исследователей изложен в уникальных специализированных сборниках «Редактирование генов и геномов» [102] и «Методы редактирования генов и геномов» [103], которые не только подробным образом освещают теоретические вопросы геномного редактирования, но и содержат практические рекомендации по редактированию генома широкого спектра модельных объектов (от прокариот до млекопитающих).

Заключение

Технологии редактирования генома представляют собой мощный многофункциональный инструмент, который потенциально может помочь исследователям лучше понять принципы функционирования живых систем, установить причины и механизмы развития заболеваний и, в перспективе, разработать подходы к терапии ранее не излечимых заболеваний. Несмотря на колоссальный потенциал, технологии РГ обладают рядом технических ограничений (ограниченная специфичность и эффективность, возможность индукции хромосомных aberrаций), а их применение сопряжено с риском внесения нецелевых модификаций ДНК, этическими и правовыми рисками. Все это обуславливает необходимость дальнейшего совершенствования технологий РГ, разумного и ответственного их применения, а также выработку протоколов общественного и международного контроля над использованием и распространением таких технологий, в особенности при работах по модификации геномов патогенных вирусов и микроорганизмов и работах по наследуемому редактированию генома человека.

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-75-30007), <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>

Funding: The study was funded by the Russian Science Foundation № 19-75-30007, <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>

Литература

1. Landhuis E. The definition of gene therapy has changed. Scientific American. 2021. <https://www.scientificamerican.com/article/the-definition-of-gene-therapy-has-changed/>
2. Tao J, Bauer DE, Chiarle R. Assessing and advancing the safety of CRISPR-Cas tools: from DNA to RNA editing. Nat Commun. 2023;14(1):212. DOI: 10.1038/s41467-023-35886-6
3. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. Gene. 2013;525(2):162–169. DOI: 10.1016/j.gene.2013.03.137

4. Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83(23):9065–9069. DOI: 10.1073/pnas.83.23.9065
5. Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*. 1986;323(6087):445–448. DOI: 10.1038/323445a0
6. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 1989;244(4910):1288–1292. DOI: 10.1126/science.2660260
7. Haber JE. Exploring the pathways of homologous recombination. *Curr Opin Cell Biol*. 1992;4(3):401–412. DOI: 10.1016/0955-0674(92)90005-w
8. Rosenberg SM, Hastings PJ. The split-end model for homologous recombination at double-strand breaks and at Chi. *Biochimie*. 1991;73(4):385–397. DOI: 10.1016/0300-9084(91)90105-a
9. Wright WD, Shah SS, Heyer WD. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*. 2018;293(27):10524–10535. DOI: 10.1074/jbc.TM118.000372
10. Cohen-Tannoudji M, Robine S, Choulika A, Pinto D, El Marjou F, Babinet C, et al. I-SceI-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 1998;18(3):1444–1448. DOI: 10.1128/MCB.18.3.1444
11. Epinat JC, Arnould S, Chames P, Rochoaix P, Desfontaines D, Puzin C, et al. A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(11):2952–2962. DOI: 10.1093/nar/gkg375
12. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*. 2013;31(7):397–405. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004
13. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2011;188(4):773–782. DOI: 10.1534/genetics.111.131433
14. Gupta PK, Balyan HS, Gautam T. SWEET genes and TAL effectors for disease resistance in plants: Present status and future prospects. *Mol Plant Pathol*. 2021;22(8):1014–1026. DOI: 10.1111/mpp.13075
15. Kaczorowski T, Skowron P, Podhajska AJ. Purification and characterization of the FokI restriction endonuclease. *Gene*. 1989;80(2):209–216. DOI: 10.1016/0378-1119(89)90285-0
16. Chandrasegaran S, Carroll D. Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. *J Mol Biol*. 2016;428(5 Pt B):963–989. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.10.014
17. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*. 2011;45:273–297. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132430
18. Liu G, Lin Q, Jin S, Gao C. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. *Mol Cell*. 2022;82(2):333–347. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.12.002
19. Bharathkumar N, Sunil A, Meera P, Aksah S, Kannan M, Saravanan KM, Anand T. CRISPR/Cas-Based Modifications for Therapeutic Applications: A Review. *Mol Biotechnol*. 2022;64(4):355–372. DOI: 10.1007/s12033-021-00422-8
20. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816–821. DOI: 10.1126/science.1225829
21. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169:5429–5433. DOI: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
22. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*. 2005;60:174–182. DOI: 10.1007/s00239-004-0046-3
23. Svetec Miklenić M, Svetec IK. Palindromes in DNA-A Risk for Genome Stability and Implications in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):2840. DOI: 10.3390/ijms22062840
24. Svoboda P, Di Cara A. Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(7–8):901–908. DOI: 10.1007/s00018-005-5558-5

25. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys.* 2017;46:505–529. DOI: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822
26. Levy A, Goren MG, Yosef I, Auster O, Manor M, Amitai G, et al. CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. *Nature.* 2015;520(7548):505–510. DOI: 10.1038/nature14302
27. Aviram N, Thornal AN, Zeevi D, Marraffini LA. Different modes of spacer acquisition by the *Staphylococcus epidermidis* type III-A CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(3):1661–1672. DOI: 10.1093/nar/gkabi299
28. Heler R, Wright AV, Vucelja M, Bikard D, Doudna JA, Marraffini LA. Mutations in Cas9 Enhance the Rate of Acquisition of Viral Spacer Sequences during the CRISPR-Cas Immune Response. *Mol Cell.* 2017;65(1):168–175. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.11.031
29. McGinn J, Marraffini LA. Molecular mechanisms of CRISPR-Cas spacer acquisition. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(1):7–12. DOI: 10.1038/s41579-018-0071-7
30. Westra ER, Nilges B, van Erp PB, van der Oost J, Dame RT, Brouns SJ. Cascade-mediated binding and bending of negatively supercoiled DNA. *RNA Biol.* 2012;9(9):1134–1138. DOI: 10.4161/rna.21410
31. Deng L, Kenchappa CS, Peng X, She Q, Garrett RA. Modulation of CRISPR locus transcription by the repeat-binding protein Cbp1 in *Sulfolobus*. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(6):2470–2480. DOI: 10.1093/nar/gkr1111
32. Leenay RT, Maksimchuk KR, Slotkowski RA, Agrawal RN, Goma AA, Briner AE, et al. Identifying and Visualizing Functional PAM Diversity across CRISPR-Cas Systems. *Mol Cell.* 2016;62(1):137–147. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.02.031
33. Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature.* 2014;513(7519):569–573. DOI: 10.1038/nature13579
34. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* 2015;163(3):759–771. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038
35. Yourik P, Fuchs RT, Mabuchi M, Curcuru JL, Robb GB. *Staphylococcus aureus* Cas9 is a multiple-turnover enzyme. *RNA.* 2019;25(1):35–44. DOI: 10.1261/rna.067355.118
36. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(2):67–83. DOI: 10.1038/s41579-019-0299-x
37. Carte J, Christopher RT, Smith JT, Olson S, Barrangou R, Moineau S, et al. The three major types of CRISPR-Cas systems function independently in CRISPR RNA biogenesis in *Streptococcus thermophilus*. *Mol Microbiol.* 2014;93(1):98–112. DOI: 10.1111/mmi.12644
38. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281–2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143
39. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013;339(6121):823–826. DOI: 10.1126/science.1232033
40. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife.* 2013;2:e00471. DOI: 10.7554/eLife.00471
41. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature.* 2015; 523(7561):481–485. DOI: 10.1038/nature14592
42. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* 2013;154(6):1380–1389. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.021
43. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(8):495–506. DOI: 10.1038/nrm.2017.48
44. Yan WX, Mirzazadeh R, Garnerone S, Scott D, Schneider MW, Kallas T, et al. BLISS is a versatile and quantitative method for genome-wide profiling of DNA double-strand breaks. *Nat Commun.* 2017;8:15058. DOI: 10.1038/ncomms15058

45. Maeder ML, Stefanidakis M, Wilson CJ, Baral R, Barrera LA, Bounoutas GS, et al. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat Med*. 2019;25(2):229–233. DOI: 10.1038/s41591-018-0327-9
46. Gillmore JD, Gane E, Taubel J, Kao J, Fontana M, Maitland ML, et al. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2021;385(6):493–502. DOI: 10.1056/NEJMoa2107454
47. Nguyễn GT, Carrington M, Beeler JA, Dean M, Aledort LM, Blatt PM, et al. Phenotypic expressions of CCR5-delta32/delta32 homozygosity. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1999;22(1):75–82. DOI: 10.1097/00042560-199909010-00010
48. Brown TR. I am the Berlin patient: a personal reflection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015;31(1):2–3. DOI: 10.1089/AID.2014.0224
49. Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müssig A, Allers K, et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2009;360(7):692–698. DOI: 10.1056/NEJMoa0802905
50. Cannon P, June C. Chemokine receptor 5 knockout strategies. *Curr Opin HIV AIDS*. 2011;6(1):74–79. DOI: 10.1097/COH.0b013e32834122d7
51. Niu D, Wei HJ, Lin L, George H, Wang T, Lee IH, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*. 2017;357(6357):1303–1307. DOI: 10.1126/science.aan4187
52. <https://www.technologyreview.com/2019/06/12/239014/crispr-pig-organs-are-being-implanted-in-monkeys-to-see-if-theyre-safe-for-humans/>
53. Kuehn BM. First Pig-to-Human Heart Transplant Marks a Milestone in Xenotransplantation. *Circulation*. 2022;145(25):1870–1871. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.122.060418
54. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. 2014;343(6166):84–87. DOI: 10.1126/science.1247005
55. Kurata JS, Lin RJ. MicroRNA-focused CRISPR-Cas9 library screen reveals fitness-associated miRNAs. *RNA*. 2018;24(7):966–981. DOI: 10.1261/rna.066282.118
56. Crowther MD, Dolton G, Legut M, Caillaud ME, Lloyd A, Attaf M, et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 screening reveals ubiquitous T cell cancer targeting via the monomorphic MHC class I-related protein MR1. *Nat Immunol*. 2020;21(2):178–185. DOI: 10.1038/s41590-019-0578-8
57. Bowling S, Sritharan D, Osorio FG, Nguyen M, Cheung P, Rodriguez-Fraticelli A, et al. An Engineered CRISPR-Cas9 Mouse Line for Simultaneous Readout of Lineage Histories and Gene Expression Profiles in Single Cells. *Cell*. 2020;181(6):1410–1422.e27. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.048
58. Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, Wu J, Zhu J, Kim EJ, et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*. 2016;540(7631):144–149. DOI: 10.1038/nature20565
59. Haber JE. DNA Repair: The Search for Homology. *Bioessays*. 2018;40(5):e1700229. DOI: 10.1002/bies.201700229
60. Liu M, Rehman S, Tang X, Gu K, Fan Q, Chen D, Ma W. Methodologies for Improving HDR Efficiency. *Front Genet*. 2019;9:691. DOI: 10.3389/fgene.2018.00691
61. Carlson-Stevermer J, Abdeen AA, Kohlenberg L, Goedland M, Molugu K, Lou M, Saha K. Assembly of CRISPR ribonucleoproteins with biotinylated oligonucleotides via an RNA aptamer for precise gene editing. *Nat Commun*. 2017;8(1):1711. DOI: 10.1038/s41467-017-01875-9
62. Perales MA, Kebriaei P, Kean LS, Sadelain M. Building a Safer and Faster CAR: Seatbelts, Airbags, and CRISPR. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24(1):27–31. DOI: 10.1016/j.bbmt.2017.10.017
63. Guo C, Ma X, Gao F, Guo Y. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11:1143157. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1143157
64. Liu M, Zhang W, Xin C, Yin J, Shang Y, Ai C, et al. Global detection of DNA repair outcomes induced by CRISPR-Cas9. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(15):8732–8742. DOI: 10.1093/nar/gkab686

65. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. 2017;551(7681):464–471. DOI: 10.1038/nature24644
66. Zuo E, Sun Y, Wei W, Yuan T, Ying W, Sun H, et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science*. 2019;364(6437):289–292. DOI: 10.1126/science.aav9973
67. Koblan LW, Doman JL, Wilson C, Levy JM, Tay T, Newby GA, et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat Biotechnol*. 2018;36(9):843–846. DOI: 10.1038/nbt.4172
68. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 2019;576(7785):149–157. DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4
69. Chen PJ, Liu DR. Prime editing for precise and highly versatile genome manipulation. *Nat Rev Genet*. 2023;24(3):161–177. DOI: 10.1038/s41576-022-00541-1
70. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*. 2014;159(3):647–661. DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.029
71. Nuñez JK, Chen J, Pommier GC, Cogan JZ, Replogle JM, Adriaens C, et al. Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing. *Cell*. 2021;184(9):2503–2519.e17. DOI: 10.1016/j.cell.2021.03.025
72. Wu X, Mao S, Ying Y, Krueger CJ, Chen AK. Progress and Challenges for Live-cell Imaging of Genomic Loci Using CRISPR-based Platforms. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2019;17(2):119–128. DOI: 10.1016/j.gpb.2018.10.001
73. Lekomtsev S, Aligianni S, Lapao A, Bürckstümmer T. Efficient generation and reversion of chromosomal translocations using CRISPR/Cas technology. *BMC Genomics*. 2016;17(1):739. DOI: 10.1186/s12864-016-3084-5
74. Yue M, Ogawa Y. CRISPR/Cas9-mediated modulation of splicing efficiency reveals short splicing isoform of Xist RNA is sufficient to induce X-chromosome inactivation. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(5):e26. DOI: 10.1093/nar/gkx1227
75. Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc*. 2019;14(10):2986–3012. DOI: 10.1038/s41596-019-0210-2
76. Yi W, Li J, Zhu X, Wang X, Fan L, Sun W, et al. CRISPR-assisted detection of RNA-protein interactions in living cells. *Nat Methods*. 2020;17(7):685–688. DOI: 10.1038/s41592-020-0866-0
77. Fu R, He W, Dou J, Villarreal OD, Bedford E, Wang H, et al. Systematic decomposition of sequence determinants governing CRISPR/Cas9 specificity. *Nat Commun*. 2022;13(1):474. DOI: 10.1038/s41467-022-28028-x
78. Cradick TJ, Qiu P, Lee CM, Fine EJ, Bao G. COSMID: A Web-based Tool for Identifying and Validating CRISPR/Cas Off-target Sites. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3(12):e214. DOI: 10.1038/mtna.2014.64
79. Karagyaur MN, Rubtsov YP, Vasiliev PA, Tkachuk VA. Practical Recommendations for Improving Efficiency and Accuracy of the CRISPR/Cas9 Genome Editing System. *Biochemistry (Mosc)*. 2018;83(6):629–642. DOI: 10.1134/S0006297918060020
80. Zhang J, Chen L, Zhang J, Wang Y. Drug Inducible CRISPR/Cas Systems. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019;17:1171–1177. DOI: 10.1016/j.csbj.2019.07.015
81. Senturk S, Shirole NH, Nowak DG, Corbo V, Pal D, Vaughan A, et al. Rapid and tunable method to temporally control gene editing based on conditional Cas9 stabilization. *Nat Commun*. 2017;8:14370. DOI: 10.1038/ncomms14370
82. Xia E, Duan R, Shi F, Seigel KE, Grasemann H, Hu J. Overcoming the Undesirable CRISPR-Cas9 Expression in Gene Correction. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018;13:699–709. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.10.015
83. Kim D, Luk K, Wolfe SA, Kim JS. Evaluating and Enhancing Target Specificity of Gene-Editing Nucleases and Deaminases. *Annu Rev Biochem*. 2019;88:191–220. DOI: 10.1146/annurev-biochem-013118-111730

84. Ghaemi A, Bagheri E, Abnous K, Taghdisi SM, Ramezani M, Alibolandi M. CRISPR-cas9 genome editing delivery systems for targeted cancer therapy. *Life Sci.* 2021;267:118969. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118969
85. Lindeboom RGH, Vermeulen M, Lehner B, Supek F. The impact of nonsense-mediated mRNA decay on genetic disease, gene editing and cancer immunotherapy. *Nat Genet.* 2019;51(11):1645–1651. DOI: 10.1038/s41588-019-0517-5
86. Koniali L, Lederer CW, Kleanthous M. Therapy Development by Genome Editing of Hematopoietic Stem Cells. *Cells.* 2021;10(6):1492. DOI: 10.3390/cells10061492
87. Smits JPH, Meesters LD, Maste BGW, Zhou H, Zeeuwen PLJM, van den Bogaard EH. CRISPR-Cas9-Based Genomic Engineering in Keratinocytes: From Technology to Application. *JID Innov.* 2021;2(2):100082. DOI: 10.1016/j.xjidi.2021.100082
88. Marangi M, Pistrutto G. Innovative Therapeutic Strategies for Cystic Fibrosis: Moving Forward to CRISPR Technique. *Front Pharmacol.* 2018;9:396. DOI: 10.3389/fphar.2018.00396
89. Harmatz P, Prada CE, Burton BK, Lau H, Kessler CM, Cao L, et al. First-in-human in vivo genome editing via AAV-zinc-finger nucleases for mucopolysaccharidosis I/II and hemophilia B. *Mol Ther.* 2022;30(12):3587–3600. DOI: 10.1016/j.ymthe.2022.10.010
90. Min YL, Bassel-Duby R, Olson EN. CRISPR Correction of Duchenne Muscular Dystrophy. *Annu Rev Med.* 2019;70:239–255. DOI: 10.1146/annurev-med-081117-010451
91. Boggio A, Knoppers BM, Almqvist J, Romano CPR. The Human Right to Science and the Regulation of Human Germline Engineering. *CRISPR J.* 2019;2:134–142. DOI: 10.1089/crispr.2018.0053
92. Karagyaur MN, Efimenko AYu, Makarevich PI, Vasiluev PA, Akopyan ZhA, Bryzgalina EV, Tkachuk VA. Ethical and Legal Aspects of Using Genome Editing Technologies in Medicine (Review). *Sovremennye tehnologii v medicine.* 2019;11(3):117. DOI: 10.17691/stm2019.11.3.16
93. Shinwari ZK, Tanveer F, Khalil AT. Ethical Issues Regarding CRISPR Mediated Genome Editing. *Curr Issues Mol Biol.* 2018;26:103–110. DOI: 10.21775/cimb.026.103
94. Greely HT. CRISPR'd babies: human germline genome editing in the 'He Jiankui affair'. *J Law Biosci.* 2019;6(1):111–183. DOI: 10.1093/jlb/lisz010
95. Raposo VL. The First Chinese Edited Babies: A Leap of Faith in Science. *JBRA Assist Reprod.* 2019;23(3):197–199. DOI: 10.5935/1518-0557.20190042
96. Cancellieri S, Zeng J, Lin LY, Tognon M, Nguyen MA, Lin J, et al. Human genetic diversity alters off-target outcomes of therapeutic gene editing. *Nat Genet.* 2023;55(1):34–43. DOI: 10.1038/s41588-022-01257-y
97. Nahmad AD, Reuveni E, Goldschmidt E, Tenne T, Liberman M, Horovitz-Fried M, et al. Frequent aneuploidy in primary human T cells after CRISPR-Cas9 cleavage. *Nat Biotechnol.* 2022;40(12):1807–1813. DOI: 10.1038/s41587-022-01377-0
98. Höijer I, Emmanouilidou A, Östlund R, van Schendel R, Bozorgpana S, Tijsterman M, et al. CRISPR-Cas9 induces large structural variants at on-target and off-target sites in vivo that segregate across generations. *Nat Commun.* 2022;13(1):627. DOI: 10.1038/s41467-022-28244-5
99. Wei X, Nielsen R. CCR5-Δ32 is deleterious in the homozygous state in humans. *Nat Med.* 2019;25(6):909–910. DOI: 10.1038/s41591-019-0459-6
100. Baylis F, Darnovsky M, Hasson K, Krahn TM. Human Germ Line and Heritable Genome Editing: The Global Policy Landscape. *CRISPR J.* 2020;3(5):365–377. DOI: 10.1089/crispr.2020.0082
101. Grebenshchikova EG. Russia's stance on human genome editing. *Nature.* 2019;575(7784):596. DOI: 10.1038/d41586-019-03617-x
102. Редактирование генов и геномов. В 3-х т. Отв. ред. С.М. Закиян, С.П. Медведев, Е.В. Дементьева, Е.А. Покушалов, В.В. Власов. 2-е изд., расш. и доп. Новосибирск: Издательство СО РАН, 2018.
103. Методы редактирования генов и геномов. Отв. ред. С.М. Закиян, С.П. Медведев, Е.В. Дементьева, Е.А. Покушалов, В.В. Власов. Новосибирск: Издательство СО РАН, 2020, 550 стр. ISBN 978-5-7692-1670-1.

Об авторах

Карагяур Максим Николаевич — к.б.н., старший научный сотрудник, Институт регенеративной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; доцент, Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Примак Александра Леонидовна — аспирант, лаборант-исследователь НИЛ генных и клеточных технологий, Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Джауари Сталик Станиславович — аспирант, лаборант-исследователь НИЛ генных и клеточных технологий, Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Бозов Кирилл Дмитриевич — аспирант, лаборант-исследователь НИЛ генных и клеточных технологий, Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Макусь Юлия Валерьевна — студент-практикант кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Authors

Maxim N. Karagyaур — PhD, senior researcher, Institute for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University; Associate Professor, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Alexandra L. Primak — PhD student, laboratory researcher, Laboratory of Gene and Cell Technologies, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Stalik S. Dzhauari — PhD student, laboratory researcher, Laboratory of Gene and Cell Technologies, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Kirill D. Bozov — PhD student, laboratory researcher, Laboratory of Gene and Cell Technologies, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Yulia V. Makus — intern student, Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.