
ОБЩИЕ ПРОБЛЕМЫ, ОБЗОРЫ

УДК 636.2.082

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2025.2.5-40

**ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ФОРМИРОВАНИЯ ФЕНОТИПА
СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И ПОТЕНЦИАЛА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ:
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ-АСПЕКТЫ (ОБЗОР)**

Колоскова Е.М., Черепанов Г.Г.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных – филиал ФИЦ
животноводства - ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Боровск Калужской области,
Российская Федерация*

В настоящее время известно, что многочисленные семейства цитокинов вырабатываются в клетках разных органов и тканей, они регулируют межклеточные и межсистемные взаимодействия, определяют стимуляцию или подавление роста клеток, их дифференцировку и функциональную активность. Установлено, что закладка эпигенетических эффектов цитокинов в эмбриональный и плодный периоды может определять потенциал жизнеспособности и продолжительности жизни, поэтому основное внимание в исследованиях по проблеме повышения уровня «первичного» здоровья необходимо уделять эффектам ранней детерминации показателей здоровья, уровня защитных сил и потенциала жизнеспособности организма продуктивных животных. Основные разделы обзора: – влияние эпигенетических факторов ранних периодов развития на формирование потенциала жизнеспособности продуктивных животных; общая характеристика системы цитокинов; адипокины, (адипонектин, лептин, RBP4, TGFβ); гепатокины (активин-Е, ангиопоэтин-подобный белок, фетуины); миокины (синтез миостатина, сигнальный путь миостатина, сигнальный путь BMP, участие миостатина, в регуляции роста и развития; исследования по стимуляции роста скелетных мышц у продуктивных животных, Представлены отечественные методические разработки по получению бактериального штамма, экспрессирующего рекомбинантный миостатин с повышенной иммуногенностью. Результаты проведенного на молодняке овец эксперимента по иммунизации животных модифицированным рекомбинантным миостатином для индукции синтеза специфических аутоантител свидетельствуют о перспективности продолжения исследований для повышения стимуляции наращивания массы мышц и качества получаемой мясной продукции.

Ключевые слова: цитокины, антенатальный период, потенциал жизнеспособности, адипокины, гепатокины, миокины, рекомбинантный миостатин, рост мышц, мясная продуктивность.

Проблемы биологии продуктивных животных. 2025. 2: 5-40.

Введение

В связи с внедрением новых технологий крупномасштабной селекции крупного рогатого скота, в последние десятилетия увеличилась молочная продуктивность коров, но это сопровождается снижением их жизнеспособности, ростом заболеваемости, вынужденным применением профилактических и лечебных средств, снижающих качество/безвредность молока. В связи с ухудшением репродуктивной функции и сокращением продолжительности продуктивной жизни коров возникает дефицит ремонтного молодняка, обостряются проблемы воспроизводства, снижаются показатели экономической эффективности. Хотя в области биологии развития накоплен огромный объем знаний, исследователи и практики пока остаются

почти в полном неведении относительно главных причин появления этих проблем. Возможности геномной селекции в этом плане проблематичны, поскольку поиск генных маркеров малоэффективен в отношении полиэтиологических многофакторных патологий и таких общих феноменов, как первичное здоровье (primal health) и потенциал жизнеспособности. Больше шансов на успех в этой области у эпигенетики, в которой изучается наследование таких модификаций фенотипических признаков, которые возникают без изменения в геноме кодирующих последовательностей структурных белков.

Значительная часть проблем, возникающих в современном животноводстве, связана с тем, что всё большая часть инвестиций расходуется на лечение заболеваний продуктивного поголовья при использовании интенсивных промышленных технологий, а в свете парадигмы интегративной (системной) биологии – это, по большей части, расценивается как борьба с последствиями, но не с причинными факторами. Если исключить из рассмотрения тяжёлые инфекционные болезни и эпидемии, которые сейчас более-менее успешно профилируются, лечатся или искореняются, то остающаяся большая часть проблем ассоциируется с заболеваниями, этиология которых связана с метаболическими дисфункциями и дефектами/аномалиями развития, а в отношении этих заболеваний действует «золотое» правило: предупредить легче, чем лечить. Для каждой болезни этого типа есть стадия предболезни, ещё ранее есть факторы риска, которые могут формироваться, как это показано в последние десятилетия, и в процессах антенатального развития.

Влияние эпигенетических факторов ранних периодов развития на формирование потенциала жизнеспособности продуктивных животных.

В последние десятилетия получает распространение понимание того, что проблемы жизнеспособности животных могут быть связаны с воздействием неблагоприятных факторов питания и окружающей среды во время внутриутробного развития, что может запрограммировать плод на более высокий риск хронических заболеваний во взрослой жизни. Это нашло отражение в новой концепции DOHaD («Ду Эйч Ди», Developmental Origins of Health and Disease), согласно которой источники здоровья и болезней следует искать в процессах раннего развития (Gillman, 2005; Swanson, Wadhwa, 2006; Carpinello et al., 2018). Понимание физиологических, эпигенетических и молекулярных механизмов DOHaD жизненно важно для поддержания оптимальных уровней здоровья у продуктивных животных.

Традиционно считается, что эффективность скотоводства в основном зависит от генетики и от технологических параметров содержания и кормления при выращивании молодняка и использования продуктивного поголовья, но в последние десятилетия установлено, что определённые изменения условий внутриутробной жизни могут существенно влиять не только на показатели эмбриональной смертности, но и на жизнеспособность потомства. Термин «фетальное программирование» (ФП) был определён в начале 1990-х г.г. как явление, связывающее долгосрочные негативные последствия для здоровья с неблагоприятными воздействиями в периоды внутриутробного и раннего постнатального развития (Barker, 2004; Khanal, Nielsen, 2017; Costa et al., 2021). Эти эмпирические наблюдения были впервые представлены как научная концепция в работах Дэвида Баркера, в которых долгосрочные последствия оценивались с точки зрения здоровья и болезней человека (Barker, 1995). Такие исследования показали, что эффекты ФП влияют на широкий спектр функциональных параметров организма, которые, в частности, играют важную роль в формировании фенотипических признаков здоровья и продуктивности животных (Singh et al., 2012; Kabaran, Besler, 2015).

В настоящее время содержательная основа феномена ФП трактуется как существование системы межклеточных коммуникаций, опосредованных сигнальной функцией цитокинов (Du et al., 2010), которые вызывают эпигенетические модификации экспрессии генов в разных тканях (Ramírez-Zamudio et al., 2022; Du, Tong et al., 2010; Carvalho et al., 2022). В последующем, в

постнатальной жизни, эффекты, вызванные внутриутробными условиями, могут проявляться у потомства, в частности, в виде изменений скорости роста (Hoffman et al., 2017; Zago et al., 2020), соотношения мышечной и жировой ткани (Bonnet et al., 2010), выхода мяса (McLean et al., 2018) и его качества (Maresca et al., 2018). При этом, сдвиги в условиях питания матери могут вызывать фетальное программирование развития не только в поколении F1, но в некоторых случаях – и в последующих поколениях (Underwood et al., 2010).

В процессе исследований установлено, что существует множество различных источников такого программирования, которые вносят вклад в изменчивость фенотипических признаков, что очень затрудняет (удорожает) получение достаточного объёма экспериментальных данных, их интерпретацию и практическое применение новых знаний. В сущности, эти трудности обусловлены тем, что настоящее время – это лишь начальный этап в формировании новой области биологического знания, которая должна заполнять «пустоты» между тремя фундаментальными «устоями» – основными известными системами биоуправления в организме (молекулярно-генетическая, нейро-гуморальная и иммунная). В самой краткой форме сущность поставленной на разработку проблемы можно изложить так: «ДНК – это клавиши. А кто пианист?».

В учебной литературе фундаментальные системы биоуправления до последнего времени представлялись в виде линейно-иерархических схем: ДНК – РНК – белок; гипоталамус – гипофиз – гормон продуцирующие клетки – клетки тканей целевого органа; антиген – антиген-презентирующие клетки – Т-клетки – антитела – нейтрализация антигена, но в последние десятилетия выявлен целый пласт проблем, требующих перехода к сетевым децентрализованным схемам биоуправления. В современном понимании триада ДНК – РНК – белок заменяется более сложной схемой: геном – метилом – транскриптом – протеом – метаболом – флаксом (система метаболических потоков, от слова flux), в которой каждый из составляющих элементов является компонентом сетевой системы сигнальных путей с множественными прямыми и обратными связями, опосредованными действием разнообразных сигнальных молекул, в том числе низкомолекулярных антиген-неспецифических пептидов. Наиболее отчётливо существование таких систем выявляется в процессах эмбриогенеза, в которых нет стабильных линейно соподчинённых взаимосвязей на всех уровнях, включая регионы ДНК, циклически подвергающиеся метилированию/деметилованию при воздействии сигнальных молекул, продуцируемых другими клетками зародыша и вызывающих активацию/блокирование инициации транскрипции структурных генов при воздействии комплексных индуцирующих факторов (внутренних или внешних). В поддержании нормального состояния процессов обновления белков, дифференциации, деления клеток и регенерации тканей у взрослого организма, несомненно, также задействованы сложные причинно-следственные взаимосвязи и механизмы.

Основная трудность исследований в области эпигенетического программирования развития состоит в том, что отдельные составляющие объекта изучения можно выделить препаративно и изучить на лабораторном столе, но это мало что может дать для понимания причинно-следственных взаимосвязей в целостной системе, так же как для понимания работы головного мозга недостаточно изучения нейронов в культуральной среде. В новой парадигме роль «пианиста» («невидимого регулятора генома») в значительной мере выполняет система коммунирующих клеток, т.е. множественные комплексы взаимосвязей «клетка – клетка» с локальными и дистантными взаимосвязями, которые во многом обеспечиваются сигнальными функциями цитокинов.

В свете складывающихся в настоящее время представлений, для снижения потерь от вынужденной выбраковки молодняка и снижения сроков жизни продуктивного поголовья необходимо изменять расстановку акцентов в сфере науки и приоритет отдавать вложениям в фундаментальную физиологию. В исследованиях по изучению возрастной динамики выживаемости коров молочного направления продуктивности, проведенных в последние годы в

институте физиологии и биохимии животных (ВНИИФБиП), получены новые данные, хорошо коррелирующие с основными положениями концепции DOHaD. Результаты исследования, проведенного на большой популяции молочного скота, показали, что потенциал жизнеспособности, оцениваемой по средней (для выборки, стада или популяции) длительности продуктивной жизни коров, формируется в периоды, предшествующие достижению возраста репродуктивной зрелости, так как он (потенциал) манифестируется уже на первой лактации (Cherempanov et al., 2022). При исследовании показателей, связанных с длительностью хозяйственного использования дойных коров, выявлена взаимосвязь пожизненной продуктивности и долголетия (по числу законченных лактаций) с уровнем сохранности на первой лактации (Зубенко, 2024).

Эти данные согласуются с информацией, полученной исследователями, работающими по проблемам фетального программирования и трансгенерационной передачи эпигенетических модификаций. Таким образом, выявляется возможность объединения достижений в понимании физиологических, эпигенетических и молекулярных механизмов DOHaD и результатов исследовательских работ на уровне организма и популяций животных, которые могут использоваться на практике, в том числе для улучшения племенных качеств и жизнеспособности продуктивных животных.

Существенным условием для такого объединения является понимание специфических трудностей, которые необходимо преодолеть для достижения практически значимых целей. Одна из таких трудностей – это нерешённость проблемы существующего (и обостряющегося) антагонизма между фенотипическими признаками продуктивности и жизнеспособности у высокоудойных коров. Для молочного скота продолжительность продуктивной жизни – это крайне неудобный для исследования фенотипический признак; во-первых, потому что он возникает как предмет изучения уже после того, как корова отправлена на убой; во-вторых, существует множество биологических и технологических факторов, влияющих на «долголетие», поэтому можно очень долго перечислять возможные причины этого неудобства. В частности, в отличие от птицеводческих технологий инкубации яиц, поддерживающих постоянство условий эмбрионального развития, интенсивные промышленные технологии производства молока совсем не гарантируют возникновение метаболических дисфункций у коров, оказывающих, как выяснено в последние годы, существенное влияние не только на процессы внутриутробного развития (на созревание ооцитов, на доимплантационную сохранность зигот, на дифференцировку клеток, органогенез и рост плода), но и на жизнеспособность потомства по механизму фетального программирования (Singh et al., 2012; Opsomer et al., 2016).

Множественные эффекты нарушения условий внутриутробного развития ранее результировались, в основном, в показателях эмбриональных потерь, которые фиксировались ветеринарными работниками без учёта долгосрочных последствий для рождённого потомства и в последующих поколениях. В связи с открытием феноменов эпигенетического/фетального программирования в последние годы всё больше осознаётся необходимость новой постановки проблемы и проведения исследований на новом уровне в течение длительного времени с использованием современных технических средств биологического мониторинга (микросенсоров, микрочипов для идентификации животных в стаде и др.) и цифровых платформ для анализа «больших данных», полученных не на малых выборках, а на экспериментальном стаде, а в перспективе – на всех племенных заводах и в хозяйствах, использующих роботизированные системы кормления, доения и ветеринарного контроля (Rutten et al., 2013; Adriaens et al., 2020; Черепанов, 2021).

Такая постановка проблемы обусловлена возникновением задач, никогда ранее не ставившихся перед исследователями, привыкшими работать на малых выборках, на небольших возрастных интервалах и в отдельно взятых технологических условиях производства. Но подобно тому, как специалисты по разведению и генетике продуктивных животных давно пришли к убеждению о необходимости перехода к системе «широкомасштабной селекции», на

современном этапе развития науки необходим переход к построению аналогичной комплексной системы физиологического мониторинга в качестве адекватного ответа на возникающие вызовы (Черепанов, 2020, 2021).

По мере освоения и расширенного применения этих новых технических и исследовательских средств неизбежно возникнут проблемы, связанные с необходимостью сжатия/фильтрации получаемых массивов данных и извлечения статистически значимой информации, а последнее невозможно будет осуществить, не имея в заделе специализированных баз данных, новых протоколов количественного анализа и компьютерного моделирования (Pantanelli et al., 2001; Von Keyserlingk et al., 2009; Novoseltsev et al., 2000).

В настоящее время проводятся работы по накоплению эмпирических данных, предпринимаются попытки разработать измерительный инструментарий и концепции решения возникающих проблем. Для расширенного проведения этих работ потребуются специалисты с достаточной подготовкой в области биоинформатики и интегративной (системной) биологии. С увеличением объёма исследовательских работ и количества публикаций появляется потребность в систематизации больших массивов эмпирических данных с применением методов мета-анализа и системного исследования (Schumacher et al., 2006; Gurevitch et al., 2018; Barcelos et al., 2022). Такая предварительная работа необходима для правильной постановки проблем, разработки концепций, методологических решений и поиска ориентиров для проведения необходимых комплексных исследований.

Эффекты неадекватного питания стельных коров на лактогенез, репродуктивные функции и рост молодняка. Из зоотехнической практики известно, что на эффективность воспроизводства высокопродуктивного стада, на удои и состав молозива/молока влияет физиологическое состояние коров в предтёльный период (Ferreira et al., 2020), а оно, в свою очередь, зависит от условий питания в период лактационной деятельности, совпадающий во времени с антенатальным развитием потомства (Mellor et al., 1987; Swanson et al., 2008). Показано, что коровы с умеренным телосложением при отёле имеют более высокие репродуктивные показатели, чем коровы с чрезмерной или недостаточной упитанностью (Pfeifer et al., 2017, 2021; Dickinson et al., 2019). Это обычно объясняется подавлением гипоталамо-гипофизарной оси у недостаточно упитанных коров (Keisler, Lucy, 1996; Barb, Kraeling, 2004), т.е. если в разгар лактации происходит чрезмерная потеря жировых депо и массы тела, то высвобождение гормонов гипоталамуса и гипофиза, таких как ГнРГ (гонадотропин-рилизинг-гормон), ЛГ и ФСГ, будет подавлено, и эстральные циклы не будут инициированы. С другой стороны, имеющиеся данные указывают на то, что чрезмерная упитанность коровы во время беременности может увеличить эмбриональные потери, ухудшая репродуктивные показатели стада (Starbuck et al., 2004).

На ранних сроках стельности потребности дойных коров в энергии и протеине незначительны. Количественно величины дополнительной потребности в обменной энергии и протеине во время беременности считаются значимыми (в практическом плане) только со 135 дней стельности, когда они составляют более 10% от поддерживающей потребности. С другой стороны, в плане выявления критических этапов развития первые месяцы и первая половина лактации имеют несомненный приоритет, так как в этот период происходит ряд ключевых процессов, включая рост плаценты (Redmer et al., 2004) и развитие маточно-плацентарного сосудистого русла, которые обеспечивают поддержание ускоренного роста плода на более поздних сроках (Reynolds, Redmer, 1995). В эти же сроки происходит формирование нервной трубки (Ferreira et al., 2018), органов системы кровообращения, включая сердце, артерии, вены, капилляры (Hyttel, 2012) и органогенез плода (Duarte et al., 2013; Gionbelli et al., 2017). Поэтому исследования, посвящённые этому периоду пренатального развития, могут дать ответы на вопрос о модификациях морфо-функциональных и продуктивных показателей у рождённого потомства и в долгосрочной перспективе.

Большинство исследований, проведенных в середине и конце периода стельности, до последнего времени были сосредоточены на эффектах ограничения питательных веществ, и меньшее количество работ было ориентировано на регистрацию эффектов перекармливания. Возможно, что это обусловлено тем, что избыточное питание на поздних сроках беременности связано с более высокой частотой дистоций плода (Zaborski et al., 2009), что может осложнить условия проведения эксперимента.

Неадекватное питание стельных коров может нарушать лактогенез также из-за эндокринных модификаций в конце гестационного периода (Banchero et al., 2006). У млекопитающих начало лактогенеза запускается снижением уровня прогестерона и увеличением концентрации эстрогенов и гидрокортизона, которые вместе индуцируют синтез пролактина. Последний стимулирует синтез α -лактальбумина и лактозы – основного осмотически активного агента в секреторном эпителии молочных желез.

Хотя избыточное питание может принести некоторые преимущества, такие как повышенная мраморность мяса у потомства мясных пород (Duarte et al., 2014), в отношении ЖМ в конце периода стельности эта практика, по-видимому, представляет собой бесполезный запас питательных веществ и энергии. Негативные последствия неадекватного питания стельных коров могут сохраняться на протяжении всей жизни потомства (Marquez et al., 2017); так, снижение ЖМ при отёме может быть связано с недостаточностью питания матери в гестационный период (Café et al., 2006).

Миогенез. Рост мышц у животных в постнатальном периоде происходит за счёт гипертрофии существующих мышечных волокон (МВ) вследствие увеличения пула ядер МВ при гиперплазии сателлитных клеток (Thornton, 2019). Недостаточное питание стельной коровы может снижать количество мио ядер и ДНК в формирующихся мышцах плода за счёт воздействия на пролиферацию эмбриональных промиобластов (Bell, Greenwood, 2016). При изучении транскрипционного профиля скелетных мышц плода были выявлены 187 и 123 генов с пониженной и повышенной экспрессией, соответственно, в ответ на повышение уровня протеина в рационе стельных коров (Jaennings, 2016; Carvalho et al., 2022). Сниженный потенциал развития у новорожденных телят может быть следствием влияния неадекватного питания стельных коров на количество МВ в период органогенеза, поскольку в постнатальный период отсутствует образование новых МВ, а рост мышц происходит только за счёт гипертрофии предсуществующих МВ (Zhu et al., 2004).

Формирование мышечных волокон происходит в два этапа, называемых первичным и вторичным миогенезом. Первичный миогенез осуществляется в период между зачатием и вторым месяцем беременности, тогда как вторичный миогенез (когда формируется большинство волокон) происходит между вторым и седьмым месяцами беременности (Costa, 2021). Миогенез контролируется экспрессией миогенных регуляторных факторов (MRF), включая миогенный фактор 5 (Myf5), фактор миогенной дифференцировки 1 (MyoD), миогенин (MyoG) и миогенный регуляторный фактор-4 (MRF-4), экспрессия которых, в свою очередь, зависит от факторов питания матери (Mohammadabadi et al., 2021). Клетки, позитивные по Myf5, дают начало миообластам, в то время как клетки, негативные по MRF, могут создавать другие типы клеток, такие как адипобласты и фибробласты (Ladeira et al., 2016).

Эффекты нутритивного статуса матери на разных стадиях беременности. В научной литературе по фетальному программированию отмечается малое число исследований, проведенных в первые месяцы беременности (Zago et al., 2020). В этой связи важно подчеркнуть, что в этот период ткани матки особенно чувствительны к сдвигам в нутритивном статусе матери (Kruse et al., 2017). Малочисленность публикаций по первому триместру стельности у коров можно частично объяснить более высокими эмбриональными потерями, возможно, связанными с жёсткими условиями в питании матери, ухудшающими условия внутриутробного развития. Поэтому, учитывая это условие, при работе с алиментарными нарушениями на ранних сроках

стеклянности исследователям необходимо быть готовыми к возможному увеличению численности экспериментальных групп, что может усложнить и удорожить исследование.

На ранних сроках стельности потребности дойных коров в энергии и протеине незначительны. Количественно величины дополнительной потребности в обменной энергии и протеине во время беременности считаются значимыми (в практическом плане) только со 135 дней стельности, когда они составляют более 10% от поддерживающей потребности. С другой стороны, в плане выявления критических этапов развития, первые месяцы и первая половина лактации имеют несомненный приоритет, так как в этот период происходит ряд ключевых процессов, включая рост плаценты (Redmer et al., 2004) и развитие маточно-плацентарного сосудистого русла, которые обеспечивают поддержание ускоренного роста плода на более поздних сроках (Reynolds, Redmer, 1995). В эти же сроки происходит формирование нервной трубки (Ferreira et al., 2018), органов системы кровообращения, включая сердце, артерии, вены, капилляры (Hyttel, 2012) и органогенез плода (Duarte et al., 2013; Gionbelli et al., 2017). Поэтому исследования, посвящённые этому периоду пренатального развития, могут дать ответы на вопрос о модификациях морфо-функциональных и продуктивных показателей у рождённого потомства и в долгосрочной перспективе.

Большинство исследований, проведенных в середине и конце беременности, до последнего времени были сосредоточены на эффектах ограничения питательных веществ, и меньшее количество работ было ориентировано на регистрацию эффектов перекормливания. Возможно, что это обусловлено тем, что избыточное питание на поздних сроках беременности связано с более высокой частотой дистоний плода (Zaborski et al., 2009), что может осложнить условия проведения эксперимента.

Эффекты породы и стрессовых воздействий. Недостаточно также информации о том, можно ли экстраполировать результаты исследований по фетальному программированию для разных пород, поэтому необходимы дальнейшие исследования, чтобы прояснить этот вопрос, и исследователям рекомендуется изучить возможные взаимодействия между условиями питания матери и фактором породы (Prayaga, 2003; Prayaga et al., 2003).

Кроме того, эффекты фетального программирования, связанные с питанием матери во время беременности, зависят от пола. Эпигенетические влияния проявляются по-разному в зависимости от пола эмбриона что, по-видимому, обусловлено эволюционными механизмами (Copping et al., 2014; Batistel et al., 2019). Мало что известно о том, как самки могут «ощущать» пол плода своего потомства, чтобы способствовать адаптации к распределению материнских ресурсов в зависимости от условий окружающей среды и пола вынашиваемого плода (Love et al., 2005).

Кроме того, мало имеется сведений о возможных эффектах различных стрессовых состояний, которые могут перепрограммировать траекторию развития потомства в долгосрочной перспективе (например, при стрессе от воздействия факторов окружающей среды). Тепловой стресс может вызывать эпигенетические изменения у потомства, связанные с изменением паттернов экспрессии генов (Huber et al., 2020). Тепловой стресс влияет на функции плаценты, нарушая транспорт глюкозы, аминокислот и кислорода (более низкая проницаемость субстрата), что вызывает снижение плацентарного клиренса (Bell et al., 2002).

В целом, существует большой пробел в исследованиях, связанных с изучением влияния питания матери на ранних сроках беременности, у животных разных пород при воздействии стрессовых состояний и других факторов, влияющих на эффекты фетального программирования у продуктивных животных.

Общая характеристика и эпигенетические эффекты системы цитокинов

Структура и общие свойства цитокинов. Термин «цитокины» был предложен в 1974 году для обозначения сигнальных факторов, продуцируемых клетками иммунной системы, но в настоящее время известно, что цитокины вырабатываются в клетках разных органов и тканей,

они регулируют межклеточные и межсистемные взаимодействия, определяют стимуляцию или подавление роста клеток, их дифференцировку, функциональную активность, регулируют гемопоэз, ангиогенез и апоптоз. Существенный сдвиг в изучении цитокинов произошел в 80-е годы после получения рекомбинантных молекул, повторяющих биологические свойства природных цитокинов, открытия субъединичного строения рецепторов цитокинов и формированием понятия «цитокиновая сеть» (Castillo-Armengol et al., 2019).

Цитокины являются полипептидами или низкомолекулярными белками, часто гликозилированными, с молекулярной массой обычно до 50 кДа, которые не имеют антигенной специфичности биологического действия, хотя некоторые цитокины могут стимулировать антиген-зависимые процессы в иммунной системе, воздействуя на Т- и В-лимфоциты. Один и тот же цитокин может вырабатываться различными типами клеток организма в разных органах; они могут действовать на многие типы клеток, вызывая различные эффекты в зависимости от вида клеток-мишеней.

Для цитокинов характерна взаимозаменяемость биологического действия, т.е. несколько разных цитокинов могут вызывать один и тот же биологический эффект либо обладать схожей активностью. Один и тот же цитокин способен действовать на гистологически разные типы клеток, имеющих к нему рецепторы, и индуцировать одну или разную функциональную активность клеток-мишеней, т.е. цитокины проявляют плеiotропность. Плеiotропность и взаимозаменяемость биологического действия, а также эффекты взаимовлияния цитокинов проявляются, в частности, в отношении их влияния на процессы метаболизма, в частности, на метаболизм глюкозы и тканевых липидов.

Цитокины действуют на клетки различными путями: аутокринно – на клетку, синтезирующую и секретирующую данный цитокин; паракринно – на клетки, расположенные вне клетки-продуцента или эндокринно, т.е. дистантно на клетки любых органов и тканей после попадания цитокина в циркуляцию. В последнем случае действие цитокинов напоминает действие гормонов.

Цитокины могут действовать только на те клетки-мишени, которые экспрессируют специфические для них рецепторы. Поэтому ответ популяции активированных клеток-мишеней критически зависит от микроокружения и наличия соответствующих регуляторных сигналов. Цитокины индуцируют либо подавляют синтез других цитокинов и их рецепторов, участвуя в формировании цитокиновой сети.

Рецепторы цитокинов. Все рецепторы цитокинов представляют собой трансмембранные гликопротеины, у которых внеклеточная часть отвечает за связывание сигнальной молекулы. Как правило, эти рецепторы состоят более чем из одной субъединицы, причем высокоаффинное связывание является следствием взаимодействия с разными субъединицами. Одни субъединицы реагируют только с определенным сигнальным фактором, в то время как другие способны формировать общие рецепторы для разных цитокинов. Растворимый рецептор, связывающийся с цитокином, – это ферментативно отщепленный внеклеточный домен мембранного рецептора. Растворимые рецепторы сохраняют высокую аффинность в отношении своих лигандов и благодаря этому способны нейтрализовать цитокины, препятствуя их доступу к интактным мембранным рецепторам. В результате взаимодействия цитокинов с мембранным рецептором инициируется сигнал, передача которого в клетку обычно происходит либо по пути с участием янус-киназы (JAK-STAT) с активацией экспрессии гена в клетке, либо по пути Ras-MAP киназы (регуляции клеточного цикла)

Синтез рецепторов протекает более интенсивно и длительно, чем синтез соответствующих цитокинов. Неконтролируемое увеличение концентрации воспалительных цитокинов может служить причиной развития патологических состояний, в том числе септического шока и деструкции тканей. Наличие механизмов отрицательной обратной связи способствует предотвращению гиперпродукции цитокинов.

Модификации гистонов. Поливалентные модификации коровых белков (четырёх гистонов ядра) включают в себя ацетилирование, фосфорилирование, дезаминирование и убиквитинирование аминокислот терминальных аминокислот (Bannister, Kouzarides, 2011).

Модификации гистонов важны для регуляции структуры хроматина и его функции, что, в свою очередь, может влиять на многие связанные с ДНК процессы, такие как транскрипция, рекомбинация, репарация и репликация (Bannister, Kouzarides, 2011). Метилирование и ацетилирование остатков лизина в хвостах гистонов являются двумя наиболее распространёнными модификациями с различным распределением по эухроматину и гетерохроматину (Hung, Sellappan, 2008).

Ацетилирование лизина используется в регуляции связывания гистонов с ДНК в нуклеосомах и тем самым – в контроле экспрессии генов (Zhao et al., 2010). Убиквитинирование коровых гистонов играет важную роль в инициации и осуществлении транскрипции генов, сумоилирование гистонов является модификацией убиквитинирования (Barger, 2004);

Эпигенетические эффекты цитокинов. Изучение функциональной роли цитокиновой системы в организме животных неразрывно связано с эпигенетическими исследованиями. Эпигенетика определяется как изучение наследования модифицированных фенотипических признаков, которое происходит без изменения кодирующих последовательностей структурных генов. Механизмы возникновения эпигенетических факторов изучены пока недостаточно; предполагается, что они появляются в разных тканях в результате взаимодействий между клетками, опосредованных сигнальными функциями цитокинов. Эпигенетическое наследование модифицированных признаков имеет место в двух-трёх поколениях, а в последующих генерациях они элиминируются, если модифицирующий эпигенетический фактор перестаёт функционировать.

В последние десятилетия установлено, что определённые изменения условий внутриутробной жизни могут существенно влиять не только на показатели эмбриональной смертности, но и на жизнеспособность потомства. Получает распространение понимание того, что проблемы жизнеспособности у человека и у животных могут быть связаны с воздействием неблагоприятных факторов питания и окружающей среды во время беременности, что может запрограммировать плод на более высокий риск хронических заболеваний во взрослой жизни. Это нашло отражение в новой концепции, согласно которой источники здоровья и болезней следует искать в процессах раннего развития (Barker, 1995, 2004; Gillman, 2005; Swanson, Wadhwa, 2006; Carpinello et al., 2018); понимание физиологических и молекулярных механизмов этого феномена жизненно важно для поддержания оптимальных уровней здоровья у продуктивных животных.

Термин «фетальное программирование» (ФП) был определён в начале 1990-х г.г. как явление, связывающее долгосрочные негативные последствия для здоровья с неблагоприятными воздействиями в периоды внутриутробного и раннего постнатального развития (Khanal, Nielsen, 2017; Costa et al., 2021). В настоящее время содержательная основа феномена ФП трактуется как существование системы межклеточных коммуникаций, опосредованных сигнальной функцией цитокинов (Du et al., 2010), которые вызывают эпигенетические модификации экспрессии генов в разных тканях (Ramírez-Zamudio et al., 2022; Du, Tong et al., 2010; Carvalho et al., 2022). В последующем, в постнатальной жизни, эффекты, вызванные внутриутробными условиями, могут проявляться у потомства, в частности, в виде изменений скорости роста (Hoffman et al., 2017; Zago et al., 2020), соотношения мышечной и жировой ткани (Bonnet et al., 2010), выхода мяса (McLean et al., 2018) и его качества (Maresca et al., 2018). То есть, сдвиги в условиях питания матери могут вызывать фетальное программирование развития не только в поколении F1 (Underwood et al., 2010; Rodriguez et al., 2009), но в некоторых случаях – и в последующих поколениях.

Поскольку эпигенетические модификации экспрессии генов происходят, в основном, в ранние периоды онтогенеза, в том числе в эмбриональный и плодный периоды, в последнее

время основное внимание в исследованиях по этой проблеме уделяется эффектам ранней детерминации показателей здоровья, уровня защитных сил и потенциала жизнеспособности организма (Swanson et al., 2006; Barker, 2007).

В свете складывающихся в настоящее время представлений, для снижения потерь от вынужденной выбраковки молодняка и снижения сроков жизни продуктивного поголовья необходимо изменять расстановку акцентов в исследованиях и приоритет отдавать вложениям в новые направления фундаментальной биологии. В исследованиях по изучению возрастной динамики выживаемости дойных коров получены новые данные, хорошо коррелирующие с основными положениями концепции DOHaD. Результаты исследования, проведенного на большой популяции молочного скота, показали, что потенциал жизнеспособности, оцениваемой по средней (для выборки, стада или популяции) длительности продуктивной жизни коров, формируется в периоды, предшествующие достижению возраста репродуктивной зрелости, поскольку он (потенциал) манифестируется уже на первой лактации (Черепанов, 2020; Cherepanov et al., 2022). При изучении показателей пожизненного удоя и долголетия дойных коров была выявлена статистически значимая взаимосвязь между этими показателями и уровнем сохранности на первой/второй лактации (Зубенко, 2004).

Эти данные согласуются с информацией, полученной исследователями, работающими по проблемам ФП и передачи эпигенетических модификаций. Таким образом, выявляется возможность объединения достижений в понимании физиологических, эпигенетических и молекулярных механизмов DOHaD и результатов исследовательских работ на уровне организма и популяций животных, которые могут использоваться на практике, в том числе для улучшения племенных качеств и жизнеспособности продуктивных животных.

Таким образом, неадекватное питание, отклонения в температурном режиме, недостаточность кислородного обеспечения организма матери в период беременности и другие факторы существенно влияют на эмбриологическое программирование ключевых эндокринных органов, формирующих потенциал иммунного статуса и защитных функций (Gillman, 2005). В физиологических механизмах, лежащих в основе этого влияния, в значительной степени «задействована» обширная группа разнообразных семейств цитокинов.

Участие цитокинов в контроле экспрессии генов. Изменения в экспрессии генов, инициируемые цитокинами, осуществляются в основном, двумя основными молекулярными модификациями: метилированием ДНК и модификацией гистонов (Goldberg et al., 2007).

Метилирование ДНК осуществляется присоединением метильной группы к цитозиновым или адениновым нуклеотидам ДНК с последующей модификацией корового белка (гистона), «разматыванием» двухцепочечной ДНК и инициацией транскрипции. Метилирование ДНК происходит путём обратимой химической реакции, в результате чего метильная группа CH_3 присоединяется к углероду с образованием метилцитозина. Метильная группа метилцитозина находится в большой бороздке спирали ДНК, с которой взаимодействуют большинство ДНК-связывающих белков (Finnegan, Kovacs, 2000).

Метилирование цитозина осуществляется с участием цитозин-ДНК-метилтрансфераз, которые включают 3 семейства: МЕТ, хромометилазы, ДНК-метилтрансферазы *de novo* (Cao et al., 2000; Cao, Jacobsen, 2002). Большая часть (почти все) метилирования «стирается» в раннем эмбриогенезе за счёт деметилирования и/или гидроксирования метильных групп. Паттерн метилирования генома (распределение метилированных оснований) устанавливается заново в каждом поколении, в основном он не наследуется, но есть и исключения. После установления специфических паттернов метилирования, они поддерживаются в поколениях клеток, обеспечивая специфичность экспрессии генов. Таким образом, при смене поколений происходит последовательное циклическое метилирование/деметилирование по множеству позиций в геноме.

В настоящее время описаны два механизма репрессии генов при метилировании. В случае первого механизма с метилированными CpG-динуклеотидами связываются специфические белки, к которым затем присоединяются белки, участвующие в ремоделировании

хроматина, делая его транскрипционно неактивным (Jones, 2012). При альтернативном механизме метилирование препятствует связыванию ДНК с регуляторными белками, необходимыми для экспрессии генов. Чаще всего метилирование «выключает» ген, а деметилирование его «включает». У эукариот метилирование используется для стабильной репрессии собственных генов. В подавляющем большинстве случаев метилированию подвергаются цитозины, входящие в состав CpG-динуклеотидов. Около 80% CpG-динуклеотидов рассеяно по геному, однако 20% собраны в кластеры, так называемые CpG-островки. Эти последовательности имеют размеры от 200 п.н. до нескольких тысяч п.н. и характеризуются чрезвычайно высоким содержанием CpG-пар по сравнению с их содержанием в среднем по геному. В большинстве случаев они располагаются в промоторных регионах и первых экзонах генов и предполагается, что до 50-60% генов может содержать CpG-островки, ассоциированные с промоторами (Comb, Goodman, 1990).

Жировая ткань. Адипокины

Жировая ткань состоит из соматических клеток разного типа (зрелые адипоциты, преадипоциты, эндотелиальные клетки, фибробласты, тучные клетки, клетки иммунной системы), активно участвующих в регуляции функциональной активности органа посредством сложной сети эндокринных, паракринных и аутокринных сигнальных молекул цитокинов, влияющих на многие органы, включая гипоталамус, поджелудочную железу, печень, скелетные мышцы, почки, эндотелий и иммунную систему (Li et al., 2016; Coelho et al., 2013). В течение последних двух десятилетий всё большее внимание уделяется изучению жировой ткани как эндокринного органа, способного вырабатывать адипоцитокины - биологически активные вещества, синтезируемые жировой тканью и обладающие многочисленными метаболическими эффектами.

В настоящее время пока ещё не разработаны чёткие определения терминов «адипоцитокин» и «адипокин». Некоторые авторы описывают адипоцитокины как вещества, синтезированные в жировой ткани вследствие взаимодействия между адипоцитами и иммунными клетками (Сао, 2014), другие не выделяют различий между терминами «адипоцитокин» и «адипокин» (Booth et al., 2015), так что биологически активные вещества, продуцируемые жировой тканью, могут быть представлены как адипоцитокинами, так и адипокинами.

Адипонектин. Адипонектин представляет собой белок, состоящий из 244 аминокислот и имеющий коллагено-подобный участок. Данный адипоцитокин циркулирует в плазме крови в виде различных изоформ - низкомолекулярного тримера, среднемолекулярного гексамера и биологически активного высокомолекулярного олигомера. Получены данные, что адипонектин синтезируется не только адипоцитами жировой ткани, но и другими клетками, включая остеобласты, клетки паренхимы печени, миоциты, эпителиальные клетки и плацентарную ткань (Khoramipour et al., 2021)

Адипонектин взаимодействует с двумя типами рецепторов: AdipoR1 и AdipoR2. AdipoR1 расположен во многих тканях организма, преимущественно в скелетных мышцах. AdipoR2 представлен главным образом в клетках печени. Под действием адипонектина в скелетных мышцах происходит усиленное поглощение глюкозы, а также активируется процесс окисления жирных кислот. При изучении эффектов адипонектина на гепатоциты выявлено подавление процессов глюконеогенеза и гликогенолиза. Кроме того, адипонектин способен повышать активность карнитин-пальмитоилтрансферазы I и усиливать окисление жирных кислот в митохондриях клеток печени, одновременно снижая активность ключевых ферментов, участвующих в синтезе жирных кислот.

Высокая экспрессия адипонектина отмечается не только в скелетных мышцах и печени, но и в жировой ткани. Благодаря своей аутокринной активности, адипонектин способствует

дифференцировке клеток адипоцитов, стимулирует адипогенез, повышает содержание липидов в адипоцитах, а также усиливает инсулин-направленный транспорт глюкозы (Kim et al., 2007).

Лептин. Это белок, состоящий из 146 аминокислот (Cammisotto, Bendayan, 2007), который синтезируется преимущественно жировой тканью и в небольшом количестве в слизистой дна желудка. По своей структуре лептин схож с провоспалительными цитокинами, такими как ИЛ-6 и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКС-Ф). Лептин опосредует свои эффекты, связываясь со специфическими рецепторами (ObR), экспрессируемыми в головном мозге, а также в периферических тканях (нервной ткани, печени, поджелудочной железе, сердце и кишечнике) (Rabe et al., 2008). Главным органом-мишенью лептина служит дугообразное ядро гипоталамуса, которое играет важную роль в регулировании аппетита и энергетического гомеостаза. Лептин также воздействует на печень, скелетные мышцы и жировую ткань, ограничивает накопление триглицеролов в печени и скелетных мышцах.

RBP4. Это ретинолсвязывающий белок (витамин А, переносящий в кровеносном русле ретинол), относящийся к семейству транспортных белков липокалинов. Экспрессия RBP4 наиболее высока в печени, где содержится основное количество витамина А в организме. В настоящее время идентифицированы два рецептора RBP4 (STRA6 и RBPR2), которые опосредуют поглощение и высвобождение ретинола через клеточную мембрану (Alapatt et al., 2013; Munkhtulga et al., 2010).

В настоящее время наиболее детально изучено влияние данного адипоцитокина на метаболизм глюкозы и липидов у животных (Lee et al., 2013). Повышение уровня RBP4 увеличивает экспрессию основного фермента глюконеогенеза – фосфоенолпируваткарбоксикиназы в печени и нарушает действие инсулина в скелетных мышцах (Ma et al., 2016).

Таким образом, RBP4 – это не только белок, участвующий в транспорте ретинола, но и регуляторный фактор, оказывающий влияние на метаболизм глюкозы и липидов, а также участник иммунных реакций.

Трансформирующий фактор роста-β (TGFβ). TGFβ является членом большого семейства факторов роста у млекопитающих (Weiss, Attisano, 2013). Почти все клетки могут продуцировать TGFβ и реагировать на него. На клеточном уровне члены надсемейства TGF участвуют в регуляции многих процессов, таких как пролиферация, дифференцировка, гибель, организация цитоскелета, клеточная адгезия и миграция. Впервые обнаруженный как критический фактор для роста неиммунных клеток, TGFβ постепенно был признан важным цитокином в регуляции иммунных ответов (Chen, Konkel, 2010).

Передача сигналов TGFβ происходит через трансмембранные рецепторы серин/треонинкиназы типа I и типа II, которые рекрутируют и фосфорилируют активируемые рецептором Smads, включая Smad2 и Smad3, и канонические внутриклеточные медиаторы TGFβ.

Уровень TGFβ в жировой ткани связан с накоплением жира в теле (Yadav et al., 2011), хотя роль TGFβ в адипогенезе требует дальнейшего изучения. Хотя TGFβ положительно коррелирует с накоплением жировых депо на животных моделях и у людей, он ингибирует адипогенез в культуре клеток 3T3-F442A. С другой стороны, TGFβ способствует адипогенезу в плюрипотентных клетках-предшественниках во время начальной фазы экспансии жировой ткани и ингибирует его в популяциях коммитированных преадипоцитов (Yadav et al., 2011).

Печень. Гепатокины

Гепатокины представляют собой гормоноподобные белки, секретируемые гепатоцитами, и многие из них связаны с внепечёночной регуляцией метаболизма. Производство секретируемых факторов печенью контролирует гомеостаз питательных веществ и энергии. гепатоциты секретируют несколько сот отдельных типов гепатокинов, многие из которых участвуют в регуляции метаболических процессах (Stefan, Haring, 2013; Jensen-Cody, Potthoff,

2021). Гепатокины также могут опосредовать положительные эффекты хронических физических нагрузок или, по крайней мере, представлять собой биомаркеры вызванных нагрузками метаболических улучшений (Ennequin et al., 2019).

Печень является ключевым регулятором системного энергетического гомеостаза и может реагировать на избыток и дефицит питательных веществ с участием межорганных взаимосвязей с участием цитокинов. Регуляция системного энергетического гомеостаза печенью частично опосредована регуляцией метаболизма глюкозы и липидов. Понимание механизмов экспрессии гепатокинов и их связей с периферическими тканями необходимо для разработки стратегий предупреждения метаболических дисфункций (Eslam et al., 2020; Katsarou et al., 2020). Гепатокины, секретируемые в ответ на физическую нагрузку, вызывают благоприятные метаболические изменения в жировой ткани, кровеносных сосудах и скелетных мышцах, что может снизить вероятность ряда заболеваний (Seo et al., 2021).

Изучение механизмов гепатокин-опосредованной межорганный коммуникации важно для идентификации новых диагностических и/или терапевтических мишеней при общих метаболических патологиях (Kim et al., 2021) и при заболеваниях других органов, таких как сердце, мышцы и кости (Oh et al., 2016; Wang et al., 2021).

Несмотря на достигнутый в последние годы значительный прогресс в понимании физиологических функций гепатокинов, пока ещё мало известно о механизмах перепрограммирования транскрипции, трансляции, модификации и секреции гепатокинов (Wang et al., 2021). Идентификация и функциональная характеристика гепатокинов могут дать важные сведения, необходимые для понимания патогенеза метаболических нарушений (Esfahani et al., 2019).

Фетуины. Фетуин-А (альфа-2-HS-гликопротеин) был первым идентифицированным гепатокином, предположительно регулирующим метаболический гомеостаз посредством модулирования межорганных потоков, и одним из наиболее важных гепатокинов, регулирующих метаболизм у животных. Преимущественно синтезируемый и секретируемый печенью, фетуин-А представляет собой многофункциональный цитокин, в том числе он является эндогенным ингибитором тирозинкиназы и рецептора инсулина в печени, жировой ткани и скелетных мышцах (Iroz et al., 2015). Действие фетуин-А может усиливаться с участием NFkB и ERK1/2 после повышения уровня циркулирующих свободных жирных кислот и глюкозы соответственно. Фетуин-В значительно повышает риск развития стеатоза печени, опосредует нарушение действия инсулина и резистентность к глюкозе (Yakout et al., 2023).

Фоллистатин. Фоллистатин (FST) был впервые идентифицирован как гликопротеин, обнаруживаемый в большинстве тканей организма. FST действует как многогранный гепатокин, участвующий в процессах репродукции, роста мышц и регуляции метаболизма. FST действует как ингибитор членов суперсемейства TGF- β , включая миостатин и активины (Sidis et al., 2006; Brown et al., 2011), и может действовать как стимулятор роста скелетных мышц (Lee et al., 2010). Большинство эффектов FST на репродуктивное здоровье обусловлено его взаимодействием с активинами и фолликулостимулирующим гормоном, тогда как его влияние на рост мышц является результатом взаимодействия с миостатином (Sidis et al., 2006; Brown et al., 2011). FST секретируется широким спектром типов клеток; считается, что его уровни в плазме являются результатом паракринной/аутокринной передачи сигналов (Hansen, Plomgaard. 2016).

Скелетные мышцы. Миокины.

В настоящее время установлено, что ткань скелетных мышц продуцирует и секретирует цитокины и другие белки, получившие название «миокины», которые оказывают ауто-, пара- и/или эндокринные эффекты (Schnyder, Handschin, 2015). Таким образом, скелетные мышцы можно отнести к эндокринным органам. Со времени описания первых членов список миокинов постоянно рос, демонстрируя, что скелетные мышцы обладают способностью экспрессировать

несколько миокинов. Для большинства описанных в настоящее время миокинов сократительная активность является ключевым элементом регуляции экспрессии и секреции.

Миостатин. Миостатин, известный также как фактор дифференцировки роста-8 (GDF-8), является членом суперсемейства трансформирующего фактора роста β (TGF- β), который экспрессируется в развивающихся и взрослых скелетных мышцах (Matsakas, Diel, 2005). Ген миостатина высоко консервативен у разных видов позвоночных. Основная функция миостатина заключается в негативном регулировании мышечной массы через аутокринные и паракринные сигнальные пути. (McPherron et al., 1997; Chen, 2021). Мутации гена миостатина у некоторых пород крупного рогатого скота, включая пьемонтскую и бельгийскую голубую, приводят к выраженной мышечной гипертрофии (фенотипу с «двойной мускулатурой») (Kambadur et al., 1997; Grobet et al., 1997). Аналогичные фенотипы наблюдались у овец и собак (Mosher et al., 2007). У мышей с нокаутом гена миостатина, и, как следствие, с дефицитом миостатина, помимо выраженного гипертрофического фенотипа мышц, наблюдалось снижение общего и внутримышечного жира по сравнению с животными дикого типа (McPherron et al., 1997; McPherron, Lee, 2002). Увеличение мышечной массы у таких мышей сопровождалось увеличением расхода энергии в покое, снижением уровня в крови «гормона сытости» (лептина) и уменьшением содержания жира в теле (Lin et al., 2002).

Синтез миостатина. Как и другие члены семейства TGF- β , миостатин синтезируется в виде белка-предшественника – препромиостатина (375 аминокислот). Белок-предшественник гидролизуетс дважды: первый раз – с образованием сигнального пептида (24 аминокислоты с N-конца); второй - с образованием N-концевого пропептида и зрелого C-концевого миостатина (109 аа). Циркулирующая форма миостатина состоит из комплекса C-концевого димера миостатина и других белков, включая пропептид миостатина, которые ингибируют биологическую активность C-концевого дисульфид-связанного димера. Этот латентный комплекс активируется представителями семейства металлопротеаз костного морфогенетического белка-1/толлоида (BMP-1/TLD), что позволяет считать эти протеиназы потенциальными объектами воздействия для разработки агентов активации/деактивации миостатина *in vivo* (Wolfman et al., 2003; Lee, 2008).

Сигнальный путь миостатина. Миостатин передает свой сигнал в ядро посредством серии тандемных реакций. Димер миостатина сначала связывается с расположенным на внешней мембране клеток рецептором ActRIIB (рецепторы активина типа 2B), в результате ActRIIB активируется и, связываясь с мембранным белком ALK4 (активин рецепторподобная киназа 4) фосфорилирует его. Активный рецепторный комплекс далее фосфорилирует цитозольные белки Smad2 и Smad3, которые взаимодействуют с белком Smad4. Комплекс Smad2/3/4 проникает в ядро, связывается с ДНК и активирует транскрипцию генов-мишеней. Модуляция экспрессии транскрипционных мишеней рецептор-опосредованных белков Smad (R-Smad) регулируется ингибирующими белками Smad6. Белок Smad7 связывается с рецепторным комплексом, предотвращает связывание с ним и фосфорилирование белков Smad2 и Smad3, при этом сигнал миостатина блокируется, тогда как Smad6, в основном, функционирует в рамках пути костного морфогенного белка (член семейства TGF- β) (Cohen et al., 2015). У Smad7^{-/-} мышей замедлялись рост мышц, регенерация мышечных волокон, снижалась сила. Ген и белок Smad7 представляют потенциально значимую мишень в механизме ингибирования миостатина.

Связывание миостатина с ActRIIB (ACVR2B) ингибируется активин-связывающим белком фоллистатином и, при более высоких концентрациях – с пропептидом миостатина. Передача сигналов GDF11 (фактор дифференцировки роста 11 или костный морфогенетический белок 11 (BMP-11)) и миостатина модифицируется под влиянием внеклеточных связывающих белков, включающих в себя фоллистатин (FST), фоллистатин-подобный белок-3 (FSTL3), декорин и ассоциированные с фактором роста/дифференцировки сывороточные белки 1 и 2 (Sidis et al., 2006). Несмотря на их сходство в последовательности белка, использовании рецепторов и передаче сигналов, накопленные данные свидетельствуют о том, что GDF11 и миостатин во

многих ситуациях выполняют разные функции (Walker et al., 2016). GDF11 необходим для развития у млекопитающих, он регулирует старение многих тканей, тогда как миостатин выполняет функцию негативного регулятора массы постнатальных скелетных и сердечных мышц, оказывает модулирующее влияние на метаболические процессы.

Сигнальный путь BMP. Морфогенетические белки кости (BMP) являются членами суперсемейства TGF- β , которые вместе с миостатином вовлечены в широкий спектр ролей (Chen et al., 2004). Показано, что BMP являются секретируемыми факторами роста, которые инициируют передачу сигналов с поверхности клетки путём связывания с двумя рецепторами: рецептор I типа BMPRIА и BMPRIВ и рецептор II типа BMPR2, а также активиновые рецепторы первого ACVR1 и второго типа ACVR2 (ActRIIA и ActRIIB). Рецептор II типа связывается с лигандом в отсутствие рецептора I типа. Гетеродимерное образование типа I R и II R может происходить до или после связывания BMP, индуцируя пути передачи сигнала через SMAD и могут действовать аутокринным или паракринным образом, регулируясь специфическими антагонистами, а именно – ноггином и хордином, как ингибиторами белков BMP. Белки группы BMP потенциально полезны в терапии ряда заболеваний: рекомбинантные BMP2 (индуцирует образование костей и хрящей) и BMP7 хорошо проявили себя в клинических исследованиях при лечении разных видов костных патологий.

BMP функционируют в большинстве тканей, и специфический для типа клеток выход сигналов BMP необходим для правильного функционирования и дифференцировки тканей, в том числе для развития костей. В скелетных мышцах передача сигналов BMP необходима для пролиферации клеток-сателлитов, а её подавление запускает выход из клеточного цикла и дифференцировку *in vivo* (Friedrichs et al., 2011). Дефицит миостатина оказывает положительное влияние на формирование костей (Tang et al., 2020). Некоторые члены суперсемейства TGF- β активируют процессы адипогенеза и хондрогенеза (Hoffmann, Gross, 2001).

Выявлены перекрёстные взаимодействия между BMP и миостатином. Миостатин специфически противодействует BMP7, конкурируя за связывание с ActRIIB для регуляции адипогенеза (Rebbapragada et al., 2003). Накопленные данные показывают, что миостатин и BMP оказывают противоположное действие на скелетные мышцы. Более низкие концентрации фосфорилированного Smad2/3 приводят к высвобождению Smad4, который рекрутируется в сигнальный путь BMP, способствуя гипертрофии и противодействуя атрофии мышц (Sartori et al., 2013). И наоборот, больше Smad4 доступно для фосфорилированного Smad2/3, когда путь BMP заблокирован, или экспрессия миостатина увеличена, что приводит к атрофии (Sartori et al., 2013). Это указывает на то, что мышечная гипертрофия, вызванная ингибированием миостатина, является результатом активации пути BMP, что также свидетельствует о том, что передача сигналов BMP играет важную роль в контроле поддержания, роста и атрофии мышц. Однако, белки BMP выполняют функцию многофункционального фактора роста, они регулируют не только развитие мышц и рост костей, но и формирование эмбриональной оси (Bier, Robertis, 2015), развитие черепной кости (Chen et al., 2020) и нейроваскулярный гомеостаз (Petersen et al., 2021).

Механизм саморегуляции миостатина. В дополнение к участию в активации большого количества генов-мишеней, миостатин регулирует промотор своего гена посредством ингибирования отрицательной обратной связи. Миостатин может индуцировать подавление экспрессии Smad7, в то время как сверхэкспрессия Smad7, в свою очередь, ингибирует активность промотора гена миостатина (Forbes et al., 2006). В мышечных волокнах, экспрессирующих нефункциональный миостатин, экспрессия мРНК Smad7 снижается, в то время как экспрессия миостатина увеличивается (Forbes et al., 2006). Эти наблюдения показывают, что миостатин регулирует экспрессию своих генов в клетках мышечного происхождения через Smad7-зависимый механизм. У эукариот регуляция транскрипции не является единственным механизмом, с помощью которого контролируется экспрессия генов.

Например, повышенная экспрессия мышечных микроРНК miR-499 и miR-208a приводит к снижению экспрессии мРНК и активности миостатина (Bell et al., 2010; Li et al., 2013).

Миостатин участвует в регуляции роста и развития. В большинстве исследований показано, что миостатин тормозит процессы пролиферации и дифференцировки клеток-сателлитов скелетных мышц. (Taylor et al., 2001; Langley et al., 2002). Кроме того, эндогенный миостатин защищает недифференцированные миобласты от апоптоза, а его сверхэкспрессия ингибирует вывод миобластов в фазе G0/G1 из клеточного цикла и увеличивает агрегацию клеток в фазе G2. У овец фактор miR-27b может воздействовать на миостатин для регулирования пролиферации сателлитных клеток мышц (Zhang et al., 2018). Недавнее исследование внутриклеточной мишени миостатина, транскрипционного Smad2, показало, что подавление его экспрессии в первичных миобластах не влияет на эффективность миогенной дифференцировки, но приводит к образованию меньших по размеру мышечных волокон. Сверхэкспрессия Smad2 стимулирует экспрессию миогенина и усиливает дифференцировку и слияние клеток (Lamarche et al., 2021).

В исследованиях *in vitro* и *in vivo* проанализирована роль сигнального пути миостатина в деградации мышечного белка и показано, что Smad2 и Smad3 являются факторами транскрипции, опосредующими негативное влияние миостатина на мышечную массу. Ингибирование действия миостатина по сигнальному пути Smad2/3 (он индуцирует программу атрофии мышц) приводит к переключению на сигнальный путь IGF1/Akt/mTOR с индукцией программы мышечной гипертрофии; миостатин, белки семейств FoxO, Smad и mTOR синергетически влияют на процессы синтеза и деградации мышечного белка, тем самым регулируя мышечную массу (Amirouche et al., 2009; Sartori et al., 2009).

По сравнению с мышами дикого типа, гипертрофия мышц наблюдается с более высокой долей гликолитических и окислительных миофибрилл у мышей с нокаутом миостатина (Hennebry et al., 2009); это даёт основание предположить, что миостатин может влиять на содержание митохондрий в скелетных мышцах. Мыши с нокаутом гена миостатина также имеют сниженное содержание митохондриальной ДНК и меньший объём митохондрий в скелетных мышцах по сравнению с мышами дикого типа (Ploquin et al., 2012), т.е. миостатин способствует митохондриальному биогенезу (Ge et al., 2012).

Миостатин, как единственный известный ингибитор роста мышц, играет ключевую роль в пролиферации и дифференцировке мышечных клеток, трансформации типа мышечных волокон, физиологии мышц, а также в процессах синтеза и распада мышечного белка. Фактор дифференцировки роста 11 (GDF11 или BMP-11) и миостатин являются очень близкими членами суперсемейства TGF- β . Как и другие члены этого, белки-предшественники GDF11 и миостатина протеолитически обрабатываются с образованием биологически активных карбоксиконцевых димеров, а их активные домены имеют 90%-ную идентичность аминокислотной последовательности. Как GDF11, так и миостатин преимущественно используют киназы рецепторов активина II типа II-A и II-B (ActRIIB) и киназы 4 и 5 рецептора активина типа I (ALK4/5) для использования сигнального пути Smad 2/3 (Andersson et al., 2006). Несмотря на сходство в последовательности белка, использовании рецепторов и передаче сигналов, эти белки выполняют различные функции; GDF11 необходим для процессов развития и старения тканей у млекопитающих, рост костей и развитие нервов и миокарда (Walker et al., 2016).

Функции миостатина не ограничиваются скелетными мышцами, он может оказывать влияние на сердечную мышцу, адипоциты, кости и головной мозг (Rodgers, Garikipati, 2008). При этом может существовать взаимная регуляция функций миостатина и GDF11. Показано, что снижение активности миостатина повышает экспрессию GDF11, активирует сигнальный путь костного морфогенетического белка (BMP), способствует созреванию дифференцированных клеток и хондроцитов, ингибирует образование остеокластов и способствует остеогенной дифференцировке и остеогенезу (Suh et al., 2020).

Можно предположить, что миостатин может напрямую влиять на клеточную физиологию адипоцитов, хотя результаты опытов неоднозначны. Показано, что миостатин ингибирует дифференцировку преадипоцитов 3T3-L1 и снижает экспрессию адипогенных маркеров и факторов транскрипции, таких как γ -рецептор, активирующий пролиферацию пероксисом (PPAR γ), транскрипционный фактор ССААТ-энхансер-связывающий белок α (C/EBP α) и адипоцитарный белок 2 (aP2 или FABP4), осуществляющий перенос неэтерифицированных жирных кислот (Kim et al., 2001).

Напротив, в мультипотентной мезенхимальной клеточной линии (C3H10T1/2) миостатин способствовал адипогенезу, что больше соответствует данным о снижении жировых депо у животных с нокаутом миостатина (Artaza et al., 2005; Feldman et al., 2006). Само по себе применение фармакологических форм миостатина *in vivo* не вызывает повышения липолиза и уменьшения жировой массы (Stolz et al., 2008). Это позволяет предположить, что уменьшение жировых отложений у животных с отсутствием миостатина действительно связано с увеличением мышечной массы и только в меньшей степени – с прямым воздействием на жировую ткань.

Несмотря на то, что на момент открытия он не назывался миокином, миостатин является одним из первых представителей этого класса белков. Однако, поскольку физические нагрузки у животных и человека значительно снижают экспрессию миостатина в скелетных мышцах, он больше похож на «обратный» миокин по сравнению с большинством других членов семейства, экспрессия которых повышается при физических нагрузках.

Таким образом, с выявлением механизма взаимодействия сигнальных путей миостатина, GDF11 и BMP, роль миостатина в жировом обмене и развитии костей постепенно стала новой областью интенсивных исследований. Учитывая, что миостатин может координировать регуляцию развития скелетных мышц разными способами, ожидается, что углубленное изучение сигнального механизма и регуляторной сети миостатина ещё больше раскроет его роль в синтезе и деградации белка, метаболизме жиров и развитии костей.

Исследования по ингибированию миостатина для стимуляции роста скелетных мышц. В настоящее время ведутся поиск и разработка эффективных, безопасных и относительно недорогих блокаторов действия миостатина, которые можно использовать в период откорма животных с целью повышения мясной продуктивности. Естественные мутации гена миостатина вызывают фенотип «двойной» мускулатуры у различных животных, таких как крупный рогатый скот (McPherron, Lee, 1997) овцы (Clor et al., 2006), собаки (Mosher et al., 2007; Williams, 2004). Мыши с нокаутом гена миостатина демонстрировали фенотип с «двойной» мускулатурой и увеличение общей мышечной массы из-за гиперплазии и гипертрофии мышечных волокон. (Zhu et al., 2000). В настоящее время используется несколько экспериментальных молекулярных стратегий для улучшения производства мяса у продуктивных животных, например, с использованием РНК-интерференции или нокаута генов для получения генетически модифицированных овец и получения антител против миостатина у животных (Aiello et al., 2018; McPherron et al., 1997; Hu et al., 2010, 2013).

Особое внимание уделяется современным биотехнологическим методам. Существуют разные пути блокирования действия эндогенного миостатина с использованием рекомбинантных белков. Растворимый рекомбинантный рецептор ActR2B, выделенный из экспрессирующей клеточной культуры, связывается со свободным миостатином и блокирует его способность активировать собственные клеточные рецепторы. За две недели после введения мышам их мышечная масса увеличивалась на 60% (Lee et al., 2005).

Однако применение этих подходов на практике осложняется их высокой стоимостью и запретом на использование во многих странах генетически модифицированного скота. Поэтому целесообразен поиск более простых и безопасных биотехнологических методов для повышения мясной продуктивности скота. Антитела к миостатину и основным звеньям его сигнального пути являются перспективными молекулами для использования в этом направлении (Ruigrok et al.,

2011). Обычные антитела состоят из двух тяжёлых и двух лёгких цепей, что является серьезным препятствием для получения их рекомбинантных аналогов. Верблюдовые продуцируют функциональные антитела, которые называются однодоменными антителами, они лишены лёгких цепей и известны как нанотела (Hamers-Casterman et al., 1993; Ruigrok et al., 2011). Нанотела имеют общие характеристики обычных антител и подходят для исследований, диагностики и лечения заболеваний (Siontorou, 2013; Salvador et al., 2019).

Благодаря небольшому размеру, прочной структуре, простоте производства, высокому сродству и специфичности, нанотела стали идеальным исследовательским инструментом для разработки сложных нанобиотехнологий. (Wang et al. 2016). Была исследована возможность использования рекомбинантных нанотел ингибировать миостатин и способствовать росту мышц. Был получен одновариабельный домен тяжелой цепи рекомбинантного наноантитела против миостатина. Выбранный домен экспрессировали, очищали и оценивали на его цитотоксичность, аффинность и специфичность. Результаты показали, что полученное наноантитело может специфически обнаруживать и связывать миостатин, дополнительно ингибировать его активность и стимулировать рост мышц. Так, после внутримышечной инъекции наноантител к овечьему миостатину наблюдали значительное увеличение массы скелетных мышц (Ou et al., 2020).

В целом, в настоящее время активно разрабатываются разные способы ингибирования активности миостатина (Nielsen et al., 2021). Вместо дорогостоящих наноантител можно использовать рекомбинантный миостатин (pMCT) в составе вакцины для образования аутоантител к эндогенному белку самим организмом. Введение свиного pMCT мышам вызывало иммунную реакцию с выработкой антител, блокирующих как чужеродный, так и собственный белок; в результате вакцинации у мышей увеличивалась масса тела за счёт повышения роста мышечной ткани (Tang et al., 2007; Zhang et al., 2011, 2012). Выращивание продуктивного скота с помощью иммунорегуляторного метода может быть достаточно эффективным (Zakria et al., 2019).

Помимо участия в процессах формообразования скелетных мышц (McPherron, Lee, 1997a; Chen et al., 2021), MCT оказывает влияние на функциональную активность других тканей. Блокирование действия MCT или снижение уровня его экспрессии ведёт к снижению пролиферации адипоцитов и к уменьшению количества жировой ткани, при этом повышается плотность костей (Jackson et al., 2012; Chen et al., 2017). Аминокислотные последовательности и молекулярная структура MCT человека, обезьяны, мыши, крысы, коровы, овцы, курицы, индейки, рыбы имеют высокий уровень гомологии. Блокирование пути от гена MCT к его продукту и далее к клеткам-мишеням, имеющим соответствующий трансмембранный рецептор, оказывает выраженный положительный эффект на тканевый метаболизм (Шишкин, 2004).

Миостатин синтезируется в скелетных мышцах как препептид, состоящий из 375 аминокислот, и расщепляется на N-концевой пропептид и C-концевой зрелый белок (109 а.к.). Димер зрелого белка, образованный с помощью дисульфидной связи, обладает функциональной активностью. Зрелый MCT определяется в плазме крови как иммунореактивный белок. В настоящее время ведутся поиск и разработка эффективных, безопасных и относительно недорогих блокаторов действия MCT, которые можно было бы использовать в период откорма животных с целью повышения мясной продуктивности. Особое внимание уделяется современным биотехнологическим продуктам. Существуют разные пути блокирования действия эндогенного MCT с использованием рекомбинантных белков. Растворимый рекомбинантный рецептор ActR2B, выделенный из экспрессирующей клеточной культуры, связывается со свободным MCT и блокирует его способность активировать собственные клеточные рецепторы. За две недели после введения мышам их мышечная масса увеличивалась при максимальной дозе (50 мг/кг) на 60% (Lee et al., 2005). Инъекция моноклональных антител, обладающих высоким сродством к MCT, приводила к увеличению мышечной массы, плотности костной ткани у разных видов млекопитающих и птицы. Так, после внутримышечной инъекции рекомбинантных нанотел к овечьему миостатину у мышей наблюдали значительное увеличение массы скелетных

мышц; введённые антитела к овечьему МСТ ингибировали эндогенный МСТ и у мышей (Ou et al., 2020).

Вместо дорогостоящих антител гораздо выгоднее использовать рекомбинантный миостатин (рМСТ) в составе вакцины для образования антител к эндогенному белку самим организмом. Введение свиного рМСТ мышам вызывало иммунную реакцию с выработкой антител, блокирующих как чужеродный, так и собственный белок; в результате вакцинации у мышей увеличивалась масса тела за счёт повышения роста мышечной ткани (Tang et al., 2007; Zhang et al., 2011, 2012). Кодированная последовательность свиного рМСТ была субклонирована в вектор экспрессии дрожжей, управляемый индуцируемым медью промотором. Пероральное введение с кормом и инъекция термоубитой цельной рекомбинантной вакцины на основе *Saccharomyces cerevisiae* давали схожий по эффективности иммунный ответ, который измерялся по наличию специфичных к МСТ антител в сыворотке крови (Zhang et al., 2011, 2012). Аналогичный результат был получен и на кроликах (Liu et al., 2016). Эффективным оказалось включение в целевой ДНК-вектор дрожжевой вакцины комбинированного вектора shIL21-MSTN под cmv-промотором (shIL21 – короткая шпилька РНК-IL21). Титр антител, специфичных к МСТ, был намного выше, чем включение одного cmv-MSTN. Сообщается о получении рМСТ яка, экспрессированного в *E. coli* с хорошим выходом (содержание целевого белка составляло 21% от общего количества продуктов экспрессии). После иммунизации им кроликов ИФА показал высокий титр антител против рМСТ яка (Xu et al., 2012).

Выращивание продуктивного скота с помощью иммунорегуляторного метода может быть достаточно эффективным (Zakria et al., 2019). В настоящее время активно разрабатываются способы ингибирования активности МСТ на разных уровнях (Nielsen et al., 2021):

- системное введение антител против МСТ;
- сверхэкспрессия или введение пропептида МСТ (пропептид является ингибитором функционально активного димера зрелого белка);
- системное введение рецептора ActR2B; введение антител против ActR2B;
- сверхэкспрессия или введение фоллистатина, ингибитора МСТ;
- использование РНК-интерференции и анти-олигонуклеотидов против МСТ ActR2B;
- редактирование гена МСТ с использованием системы AAV-Cas9 (система редактирования CRISPR/Cas с использованием аденоассоциированного вируса для доставки её компонентов).
- получение трансгенных животных-моделей с нокаутом гена миостатина.

Отечественный опыт получения бактериального штамма, экспрессирующего рекомбинантный миостатин с повышенной иммуногенностью.

На первом этапе исследования была поставлена задача получить плазмиду для экспрессии рекомбинантного миостатина (рМСТ) и штамм-продуцент *E. coli*, экспрессирующий рекомбинантный белок (РБ) (Колоскова и др., 2022). В дальнейшем предполагалось применение этого продукта для повышения мясной продуктивности животных за счёт индукции синтеза специфических аутоантител к эндогенному миостатину и блокированию его действия для стимуляции наращивания массы мышц.

Поскольку практически у всех сельскохозяйственных животных аминокислотная последовательность МСТ идентична, в качестве модельного животного для изучения иммуногенности рМСТ использовали овцу. Период выращивания и откорма мелкого скота длится 5-6 месяцев, что позволяет в приемлемые сроки оценить не только иммуногенность рМСТ, но и эффективность его влияния на рост мышечной ткани у молодняка.

Ген *MSTN* овцы, выбор последовательности для кодирования рекомбинантного белка. Для получения РБ была выбрана аминокислотная последовательность зрелого МСТ овцы, образующегося в результате протеолитического расщепления промиостатина на пропептид и зрелый МСТ (109 а.к.).

Все аминокислоты, кроме триптофана, кодируются более чем одним кодоном. Синонимичные кодоны используются у разных организмов с различной частотой. У млекопитающих и у *E. coli* типы предпочтения кодонов различаются. Исследование частоты применения кодонов в 4 290 генах *E. coli* показало, что одни из синонимичных кодонов используются реже, чем другие (Novy et al., 2001). Клонированные гены, обогащённые редкими для *E. coli* кодонами, часто неэффективно экспрессируются в ней из-за нехватки соответствующих тРНК (Macrides, 1996).

Анализ последовательности кодонов для синтеза рМСТ в *E. coli* в программе Rare Codon Caltor (<http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html>) показал низкую частоту встречаемости для 13 кодонов из 109 (12%), что могло бы существенно снизить эффективность синтеза РБ при использовании оригинальной кодирующей последовательности, клонированной в плазмиду-вектор. Так, глицин оказался представленным редкими для *E. coli* кодонами GGA и GGG с частотой встречаемости 0,12 и 0,16 соответственно, вместо часто используемых синонимичных кодонов GGT и GGC (0,33 и 0,39).

Последовательность синтетического гена, кодирующего зрелый МСТ, была оптимизирована для эффективной экспрессии в *E. coli* и фланкирована сайтами для клонирования в плазмиду-вектор рЕТ-28a(+): ggatcc – XhoI, ctcgag – BamHI.

Наиболее распространённые экспрессионные плазмиды являются результатом множества комбинаций репликонов, промоторов, маркеров отбора, нескольких сайтов клонирования и стратегий удаления слитого белка. Промоторная система T7, присутствующая в рЕТ-векторах, способна давать высокую экспрессию РБ: целевой белок может составлять 50% от общего клеточного белка. В этой системе целевой ген клонируется за промотором, распознаваемым РНК-полимеразой фага T7.

В программе Vector NTI транслированная аминокислотная последовательность полностью соответствует сиквенсу зрелого МСТ овцы, тогда как схожесть исходной нуклеотидной и адаптированной последовательностей составляет 78,3%.

Запланированный рекомбинантный белок содержит 143 аминокислоты, кодирующие: 6xHis (полигистидиновый тэг для очистки на Ni-сефарозе); тромбиновый сайт, T7 тэг (11 а.к.), последовательность МСТ, соответствующая зрелому миостатину (109 аминокислот). Теоретическая молекулярная масса 15,92 кДа.

Для производства рекомбинантных белков наиболее часто используется штамм *E. coli* BL21 (DE3): в нём отсутствуют Лоп-протеазы, которые разрушают многие чужеродные белки, и протеаза внешней мембраны OmpT, функция которой заключается в разрушении внеклеточных белков, что позволяет избежать деградации целевого белка (Rozkov, Enfors 2004). Потеря экспрессирующей плазмиды предотвращается благодаря мутации hsdSB, присутствующей в штамме BL21. В результате нарушается метилирование и деградация ДНК. Чаще всего штамм BL21(DE3) используется вместе с плазмидой - вектором и системой экспрессии, основанной на промоторе T7, с высокой скоростью транскрипции. Целевой белок транскрибируется фаговой T7 РНК-полимеразой, которая быстрее по сравнению с нативными полимеразми *E. coli*. В штамме BL21(DE3) профаг λDE3 интегрирован в хромосому BL21 и содержит ген T7 RNAP под промотором lacUV5. Система T7 индуцируется однократным добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) (Rosano et al., 2014). Клетки *E. coli* не способны гидролизовать ИПТГ, для эффективной индукции требуется его низкая концентрация 0,1–2,0 мМ. Таким образом создается система сверхэкспрессии РБ: чем больше синтезируется мРНК, тем больше белка может быть произведено. Однако, эта система не подходит для токсичных РБ.

Получение штамма-продуцента – трансформация E. coli плазмидой, несущей целевой ген. Наиболее доступным является метод химической трансформации: клетки приобретают способность поглощать плазмидную ДНК извне, т.е. становятся компетентными. Для

трансформации штамма-продуцента *E. coli*. BL21(DE3) лигазной смесью был применён метод химической трансформации с использованием хлорида кальция.

Выросшие на селективной канамицин-содержащей среде ЛБ-агароза клоны проверяли на наличие вставки методом ПЦР со стандартными праймерами T7f/T7rev. Один из клонов использовали для подбора условий выращивания, индукции и наработки рМСТН.

Подбор условий культивирования. Проверка эффективности индукции синтеза РБ. При подборе условий роста штамма-продуцента с целью оптимизации наработки рекомбинантного белка учитывали следующие факторы: 1) доля рМСТ в суммарном бактериальном белке, 2) содержание РБ в общем объёме клеточной культуры.

При проверке эффективности индукции синтеза рМСТ определяли влияние введения ИПТГ на рост культуры-продуцента и эффективность синтеза рМСТ. Введение ИПТГ приводило к резкому замедлению роста клеточной культуры в сравнении с контролем, что свидетельствовало о переключении метаболических процессов бактерии на синтез РБ. Методом ПААГ-электрофореза было показано, что *E. coli* BL21/pET28-MSTN при индукции 1 мМ ИПТГ экспрессирует РБ массой около 16 кДа, что соответствует вычисленному значению.

Ранняя индукция на стадии низкой оптической плотности приводила к высокому содержанию рМСТ в суммарном бактериальном белке (~60%), но низкому выходу бактериальной биомассы. При индукции на более поздних стадиях относительная доля рМСТ снижалась. Длительность культивирования при 37°C до прекращения роста биомассы была 6-7 часов. Исходя из полученных результатов, оптимальной является индукция экспрессии на уровне роста бактериальной массы, соответствующем 0,25-0,30 о.е. с более длительной инкубацией при температурах ниже 37°C.

Полученный рекомбинантный МСТ можно использовать в качестве антигена для индукции синтеза специфических аутоантител к эндогенному МСТ с целью блокирования его действия и повышения мясной продуктивности животных.

Второй этап исследования. Несмотря на то, что при иммунизации кроликов рекомбинантным миостатином яка (продуцент *E. coli*) в экспериментах китайских ученых ИФА показал титр антител к МСТ (Xu et al., 2012), сообщение о вакцинации яков рМСТ с целью повышения мясной продуктивности не было подтверждено дальнейшими публикациями. О других исследованиях зарубежных ученых о возможности использования рМСТ (в частности, зрелого миостатина) в качестве «вакцины мясной продуктивности», не сообщалось. Возможно, исследователи столкнулись с проблемой слабой аутоиммунной реакции у вакцинированных рМСТ яков, не приведшей к увеличению мышечной массы экспериментальных животных. С аналогичной проблемой столкнулись и авторы: у вакцинированных рМСТ (зрелый белок) кроликов среднесуточные привесы были вдвое выше, чем у контрольных животных, но титр антител был невысоким (Колоскова, Езерский, 2023). При вакцинировании 4-6 месячных баранчиков повышение титра антител к миостатину наблюдали, в основном, при подкожном вакцинировании животных, что сопровождалось более высокими приростами массы (Езерский, Колоскова, 2024; Жукова, Колоскова, 2024).

В связи с полученными результатами возникает предположение о недостаточной антигенной способности рМСТ для активации иммунного ответа, способного блокировать эндогенный белок. В функциональном состоянии зрелый миостатин состоит из двух С-концевых мономеров, связанных двухцепочечной дисульфидной связью между остатками CYS339, при этом каждый мономер содержит четыре цистиновых остатка. В результате, в рекомбинантном миостатине бактериального происхождения, скорее всего, содержатся неклассические дисульфидные связи с образованием ди- и тример, что авторы наблюдали при проведении ПААГ-электрофореза. Итоговый белок существенно деформируется, предположительно, с образованием новых эпитопов, неузнаваемых компонентами иммунной системы на эндогенном белке. Полученный рМСТ обладает очень низкой растворимостью и после аффинной очистки в денатурированном виде находится в 8М мочеvine. Не исключено, что, будучи введенным в

составе вакцины рМСТ, хаотроп, вследствие быстрой диффузии остаётся в неактивном агрегированном состоянии в месте инъекции.

Есть основание предполагать, что замена реакционно способного цистеина на серин не изменит физико-химических характеристик рекомбинантного МСТ, но предотвратит его агрегирование, повысит растворимость белка. Показано, что активность рекомбинантного интерлейкина-18 (IL-18), склонного к образованию мультимеров, приводящих к образованию неактивных агрегатов, может быть восстановлена и даже увеличена после замены цистеина на серин (Saetang et al., 2022). Одним из условий антигенности для стимуляции иммунного ответа является чужеродность антигена, и замена одной аминокислоты на другую способна повысить иммуногенность белка.

Целью второго этапа исследования было получение рекомбинантного миостатина с модифицированным аминокислотным составом для повышения его иммуногенности (рмМСТ). Аминокислотная последовательность рекомбинантного модифицированного миостатина (рмМСТ) полностью соответствовала таковой для ранее использованного нами рМСТ, с полной заменой Cys/Ser. С использованием программы PROTPARAM (<https://www.protparam.net/index.html>) было проведено сравнение физико-химических свойств рекомбинантных белков исходного и модифицированного МСТ, содержащих гистидиновый, тромбиновый и T7 тэги: основные физико-химические свойства двух белков примерно одинаковы, поэтому для наработки и выделения рмМСТ были применены методы, отработанные для рМСТ (Колоскова с соавт., 2024).

Экспрессирующую плазмиду *pET-28a(+)**mMSTN* получали как и ранее *pET-28a(+)**MSTN*. За основу нуклеотидной последовательности, кодирующей рмМСТ, был взят оптимизированный сиквенс для рМСТ, в котором кодирующие цистеин триплеты были заменены на триплеты для серина. Синтетический ген *mMSTN* клонировали в плазмиду *pET-28a(+)*, предназначенную для экспрессии N-терминированных 6xHis-тэгированных белков с тромбиновым сайтом. Для производства рмМСТ использовали штамм *E. coli* BL21 (DE3). Методика получения компетентных клеток, их трансформации и ПЦР детекции интегрированной плазмиды описана ранее (Колоскова и др., 2022). Методом ПААГ-электрофореза было показано, что *E. coli* BL21/*pET28-mMSTN* при индукции 1 мМ ИПТГ экспрессирует РБ массой около 16 кДа, что соответствует теоретическому значению.

Рекомбинантный мМСТ с высокой эффективностью нарабатывался в виде телец включения, и, в денатурирующем буфере очищался методом металл-хелатной хроматографии на никель-содержащем носителе. В условиях диализа у рМСТ, кроме ди- и тримерных полос находили появление и тетрамера (64 кДа), частичный гидролиз белка, выразившийся в появлении полос с массой, меньше чем у мономера. Качество очищенного рмМСТ было выше, чем у выделенного в аналогичных условиях рМСТ.

Таким образом, на втором этапе была создана плаزمид, несущая оптимизированную для синтеза в *E. coli* нуклеотидную последовательность, кодирующую модифицированный зрелый миостатин. Полученной плазмидой был трансформирован штамм *E. coli* BL21(DE3) и получен штамм-продуцент рекомбинантного модифицированного миостатина *E. coli* BL21(DE3)/*pET-28a(+)-mMSTN*, с высокой эффективностью биосинтеза рекомбинантного белка. Рекомбинантный мМСТН потенциально обладает более иммуногенными свойствами, чем его прототип и может быть применен в качестве антигена для иммунизации животных при минимальной обработке РБ.

При иммунизации кроликов рекомбинантным миостатином яка (продуцент *E. coli*), ИФА показал высокий титр антител к МСТ (Xu et al., 2012). Однако, сообщение о вакцинации яков рМСТН с целью повышения мясной продуктивности не было подтверждено дальнейшими публикациями. Других исследований зарубежных ученых о возможности использования рМСТ (в частности, зрелого миостатина) в качестве «вакцины мясной продуктивности», в частности, зрелого миостатина, мы не обнаружили. Вполне вероятно, китайские исследователи столкнулись

с проблемой слабой аутоиммунной реакции у вакцинированных рМСТ яков, не приведшей к увеличению мышечной массы экспериментальных животных. С аналогичной проблемой в исследованиях столкнулись и мы: на фоне вакцинирования кроликов рМСТ (зрелый белок) у опытных животных среднесуточные привесы были вдвое выше, чем у контрольных кроликов, но титр антител был невысоким (Колоскова, Езерский, 2023). При вакцинировании 4-6 месячных баранчиков повышение титра антител к миостатину наблюдали, в основном, только при подкожном вакцинировании животных, что сопровождалось более высокими приростами массы (Езерский, Колоскова, 2024; Жукова, Колоскова, 2024).

В связи с полученными результатами возникает предположение о недостаточной антигенной способности рМСТ для активации иммунного ответа, способного блокировать эндогенный МСТ. В функциональном состоянии зрелый МСТ состоит из двух С-концевых мономеров (109 аминокислот), связанных двухцепочечной дисульфидной связью между остатками CYS339. Каждый мономер содержит четыре цистиновых узла (дисульфидные связи). Рекомбинантный миостатин бактериального происхождения в результате неправильного фолдинга образует неправильные дисульфидные связи, вторичную и третичную структуры (ди- и тримеры, что мы наблюдали при проведении ПААГ-электрофореза). Это существенно деформирует итоговый белок предположительно с образованием новых иммуногенных эпитопов, не узнаваемых компонентами иммунной системы на эндогенном белке. Кроме того, полученный рМСТ обладает очень низкой растворимостью и после аффинной очистки в растворенном виде находится в 8М мочеvine. Не исключено, что, будучи введенным в составе вакцины, рМСТ вследствие быстрой диффузии хаотропа остаётся в неактивном агрегированном состоянии в месте инъекции.

Есть основание предполагать, что замена реакционно способного цистеина на серин не изменит физико-химических характеристик рекомбинантного МСТ, но предотвратит его агрегирование, повысит растворимость белка. Показано, что активность рекомбинантного интерлейкина-18 (IL-18), склонного к образованию мультимеров, приводящих к образованию неактивных агрегатов, может быть восстановлена и даже увеличена после замены цистеина на серин (Saetang et al., 2022). Кроме того, поскольку обязательным условием антигенности для стимуляции иммунного ответа является чужеродность антигена, замена одной аминокислоты на другую способна повысить иммуногенность белка.

Получение стабильного штамма-продуцента *E. coli*, экспрессирующего рМСТ с высокой иммуногенностью, может дать возможность синтеза не только белка для использования в инъекционных вакцинах, но и стать базой для разработки иммуногенного препарата на основе активной или инактивированной культуры штамма-продуцента для применения как в качестве инъекционной формы, так и вакцины для перорального введения.

Целью последующего этапа исследования было получение рекомбинантного миостатина с модифицированным аминокислотным составом для повышения его иммуногенности. В метаболическом пути действия МСТ на повышение массы мышц был выбран зрелый белок, как активный эффектор запуска угнетения анаболических процессов. На первом этапе исследования иммунизация овец рМСТ с целью образованием ауто-антител к эндогенному белку подтвердила возможность использования выбранного подхода, однако эффективность иммунного ответа оказалась недостаточной для блокировки биологической функции эндогенного белка (Колоскова, Езерский, 2023).

Аминокислотная последовательность рекомбинантного модифицированного миостатина. Аминокислотную последовательность белка зрелого миостатина анализировали с целью модификации, удовлетворяющей требованиям сохранения основной первичной структуры и, одновременно, внесения аминокислотных замен, способствующих формированию эпитопов, способствующих образованию антител, узнающих «чужое» и «свое».

Для создания рМСТН была выбрана аминокислотная последовательность зрелого белка миостатина (из NCBI Reference Sequence: NP_001009428.1). В функциональном состоянии

зрелый миостатин состоит из двух С-концевых мономеров, связанных двухцепочечной дисульфидной связью между остатками CYS339. Каждый мономер содержит четыре цистеиновых узла (дисульфидные связи). Боковой радикал цистеина с одной стороны, гидрофилен, с другой – сульфгидрильная группа легко вступает в реакции образования дисульфидных связей, приводя как к внутри- так и к межмолекулярным сшивкам. Это может негативно сказываться на стабильности белка в растворе, его агрегации и потере свойств. Проблема может быть решена заменой цистеина гидрофильным, но химически менее активным серином (Saetang, 2022).

С использованием программы PROTPARAM (<https://www.protparam.net/index.html>) было проведено сравнение физико-химических свойств рекомбинантных белков исходного и модифицированного МСТН, содержащих гистидиновый, тромбиновый и Т7 тэги. Полученные результаты свидетельствуют о том, что основные физико-химические свойства двух белков примерно одинаковы, поэтому к наработке и выделению рММСТН могут быть применены методы, отработанные для рМСТН.

Получение экспрессирующей плазмиды рЕТ-28a(+)-mMSTN. У млекопитающих и у *E. coli* типы предпочтения кодонов различаются. Наличие редких кодонов в последовательности клонируемого гена может препятствовать его эффективной трансляции. У *E. coli* в таких случаях может не хватать тРНК, узнающих редко используемые кодоны (Novy et al., 2001). За основу нуклеотидной последовательности, кодирующей рММСТН, был взят оптимизированный сиквенс для рМСТ, в котором триплеты, кодирующие цистеин были заменены на триплеты для серина.

Проверенная программой <http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html>, нуклеотидная последовательность, не содержит редких кодонов. Синтетический ген mMSTN клонировали в экспрессирующую плазмиду рЕТ-28a(+), предназначенную для экспрессии N-терминированных 6xHis-тэгированных белков с тромбиновым сайтом. Синтетический ген mMSTN и рЕТ-28a(+) обрабатывали рестриктазами XhoI и BamHI. Очищенные фрагменты BamHI/MSTN/XhoI и BamHI/ рЕТ-28a(+)/ XhoI лигировали, в результате была получена плазида рЕТ-28a(+)-mMSTN. Получение бактериального штамма-продуцента рММСТН. Для производства рММСТН использовали штамм *E. coli* BL21 (DE3). Были проведены этапы получения компетентных клеток, их трансформации и ПЦР-детекции интегрированной плазмиды (Колоскова и др., 2022). Один из положительных клонов использовали для подбора условий культивирования и проверки эффективности индукции синтеза рекомбинантного белка.

Методом ПААГ-электрофореза было показано, что *E. coli* BL21/pET28-mMSTN при индукции 1 мМ ИПТГ экспрессирует РБ массой около 16 кДа, что соответствует теоретическому значению. Наличие на N- или С-конце РБ полигистидиновой последовательности (6xHis) позволяет производить очистку белка с помощью Ni-агарозы (сефарозы). Образование нерастворимых телец включения, состоящих из агрегатов РБ и примеси бактериальных белков – одна из проблем получения рекомбинантных белков в клетках *E. coli*. С другой стороны, экспрессия в форме телец включения может быть и преимуществом: выделение из клеточного гомогената – это обычно удобный и эффективный способ очистки РБ. В денатурирующих условиях 6xHis тэг полностью доступен для связывания с Ni-сефарозой, уменьшается вероятность неспецифического взаимодействия сорбента с бактериальными белками. Рекомбинантные белки, полученные из телец включения в жестких денатурирующих условиях, пригодны для иммунизации (Macrides, 1996).

Осадок *E. coli* BL21/pET28-mMSTN ресуспендировали в лизирующем буфере с лизоцимом, суспензию обрабатывали ультразвуком, центрифугировали. Практически весь рММСТН в виде телец включения оставался в осадке, который ресуспендировали в лизирующем буфере с 8 М мочевиной и 20 мМ имидазолом (конкурент гистидина в связях с никелем), суспензию обрабатывали ультразвуком. Осветленный лизат, полученный после центрифугирования, содержал значительное количество рММСТН. В проскоке, полученном после пропускания лизата через колонку с Ni-сефарозой, оставался рММСТН).

В условиях диализа у рМСТ, кроме ди- и тримерных полос находили появление и тетрамера (64 кДа), т.е. происходил частичный гидролиз белка, выразившийся в появлении полос

с массой, меньше чем у мономера. Качество (чистота) рМСТ, очищенного металлохелатной хроматографией из лизированных телец включения, было выше, чем у выделенного в аналогичных условиях рМСТ. Без дальнейшей очистки рМСТ использовали для иммунизации животных.

Таким образом, на основе рЕТ-28a(+) создана плазмида, несущая оптимизированную для синтеза в *E. coli* нуклеотидную последовательность, кодирующую модифицированный зрелый миостатин с повышенной иммуногенностью. Полученной плазмидой трансформирован штамм *E. coli* BL21(DE3). Посредством трансформации плазмиды рЕТ-28a(+)-mMSTN со вставкой кДНК модифицированного зрелого миостатина, в компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3), получен штамм-продуцент рекомбинантного модифицированного миостатина, слитого с гексагистидиновым тэгом. Штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/рЕТ-28a(+)-mMSTN предназначен для наработки рМСТН. Эффективность биосинтеза рекомбинантного белка, индуцированная ИПТГ, достаточно высокая. Рекомбинантный мМСТН потенциально обладает более иммуногенными свойствами, чем его прототип и может быть применен в качестве антигена для иммунизации животных при минимальной обработке.

Третий этап исследования: оценка влияния вакцинации рМСТ на прирост ЖМ у овец в условиях пастбищно-загонного содержания. В ранее проведенных экспериментах был использован рекомбинантный зрелый миостатин (рМСТ), продукт экспрессии созданного ранее штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/рЕТ-MSTN. У иммунизированных им мышей, кроликов, баранов с применением разных адъювантов и способов иммунизации также был отмечен антительный ответ и тенденция к увеличению живой массы (Жукова, Колоскова, 2024; Колоскова, Езерский, 2023). Задачей данного этапа исследований была оценка влияния трёхкратной вакцинации на приросты живой массы овец в естественных условиях традиционного овцеводства

Ранее было показано, что подкожная вакцинация рМСТ индуцирует синтез аутоантител к МСТ, коррелирующий с приростом живой массы у кроликов (Колоскова, Езерский, 2023) и у 4-х месячных баранов (Жукова, Колоскова, 2024). Живая масса баранов через 28 суток после иммунизации была выше, чем у контрольных, в среднем на 1,5 кг. На данном этапе исследований оценивали прирост живой массы у ягнят в зависимости от пола и количества вакцинаций. Если ранее спустя месяц после начала эксперимента наблюдался заметный прирост живой массы, то на 80-е сутки эксперимента (50 суток после второй иммунизации) все животные прибавили в массе, и у ягнят опытной группы приросты ЖМ были выше, особенно у баранчиков.

За откормочный период (около 4,5 месяца) прирост живой массы у баранов опытной группы был в среднем на 4,6 кг выше, чем у животных контрольной группы. Вакцинация рМСТ оказала позитивное влияние, хотя и не такое выраженное, как у баранов, на привесы у овец: средняя масса у овец опытной группы была почти на 2 кг больше, чем у овец контрольной группы.

Сниженные приросты ЖМ в начале эксперимента (в первые 30 суток), объясняются как переходом животных, собранных на откормочных площадках, на пастбищное содержание, так и резким изменением рациона. Это сильные стресс-факторы как для самого животного, так и для микробиоты его желудочно-кишечного тракта.

Было отмечено, что у ягнят опытных групп (в том числе, иммунизированных рМСТ с применением полного адъюванта Фрейнда) на протяжении эксперимента не было падежа, тогда как в контрольной группе было потеряно 4 ягнёнка по причине кишечных заболеваний. Бактериальные компоненты и инактивированные бактерии применяются в качестве иммуномодуляторов и вакцин (Александрова и др., 2011; Светоч и др., 2020; Chen et al., 2017). В опытах авторов рМСТ набавывался в виде телец включения, и, несмотря на очистку, используемый для вакцинации раствор, кроме основного белка (около 50%), содержал примеси бактериальных белков *E. coli*, которые, предположительно, способствовали дополнительной стимуляции иммунитета (Колоскова, Езерский, 2023). Возможно, тщательная очистка РБ от

бактериальных белков не обязательна: плюсы – не только снижение себестоимости вакцины, но и, возможно, улучшение его качества: синергизм иммуномодулирующих свойств бактериальных компонентов и действия РБ-антигена, предположительно, должен привести к увеличению основного антительного ответа и повысить сопротивляемость бактериальным инфекциям.

Таким образом, результаты проведенного на молодняке овец эксперимента по иммунизации животных модифицированным рекомбинантным миостатином для индукции синтеза специфических аутоантител свидетельствуют о перспективности продолжения исследований для повышения стимуляции наращивания массы мышц и качества получаемой мясной продукции.

Заключение

Многочисленные семейства цитокинов вырабатываются в клетках разных органов и тканей, они регулируют межклеточные и межсистемные взаимодействия, определяют стимуляцию или подавление роста клеток, их дифференцировку и функциональную активность. Установлено, что закладка эпигенетических эффектов цитокинов в эмбриональный и плодный периоды может определять потенциал продолжительности жизни, поэтому основное внимание в исследованиях по проблеме повышения уровня «первичного» здоровья необходимо уделять эффектам ранней детерминации показателей здоровья, уровня защитных сил и потенциала жизнеспособности организма у продуктивных животных.

В последние десятилетия получает распространение понимание того, что проблемы жизнеспособности животных могут быть связаны с воздействием неблагоприятных факторов питания и окружающей среды во время беременности, что может запрограммировать плод на более высокий риск хронических заболеваний во взрослой жизни. Это нашло отражение в новой концепции DOHaD («Ду Эйч Ди», Developmental Origins of Health and Disease), согласно которой источники здоровья и болезней следует искать в процессах раннего развития. Понимание физиологических, эпигенетических и молекулярных механизмов DOHaD жизненно важно для поддержания оптимальных уровней здоровья у продуктивных животных.

В исследованиях по изучению возрастной динамики выживаемости коров молочного направления продуктивности, проведенных во ВНИИФБиП в последние годы хорошо коррелирующие с основными положениями концепции DOHaD. Результаты исследования, проведенного на большой популяции молочного скота, показано, что потенциал жизнеспособности, оцениваемой по средней (для выборки, стада или популяции) длительности продуктивной жизни коров, формируется в периоды, предшествующие достижению возраста репродуктивной зрелости, так как он (потенциал) манифестируется уже на первой лактации. Таким образом, выявляется возможность объединения достижений в понимании физиологических, эпигенетических и молекулярных механизмов DOHaD и результатов исследовательских работ на уровне организма и популяций животных, которые могут использоваться на практике, в том числе для улучшения племенных качеств и жизнеспособности продуктивных животных.

В процессе исследований по ингибированию миостатина для стимуляции роста скелетных мышц в последние годы ведутся поиск и разработка эффективных, безопасных и относительно недорогих блокаторов действия миостатина, которые можно использовать в период откорма животных с целью повышения мясной продуктивности. Результаты проведенного авторами на молодняке овец эксперимента по иммунизации животных модифицированным рекомбинантным миостатином для индукции синтеза специфических аутоантител свидетельствуют о перспективности продолжения исследований для повышения стимуляции наращивания массы мышц и качества получаемой мясной продукции.

Список литературы

1. Богомолова Т.Г., Добровольская О.А., Мировская А.А., Аль-Шехадат Р.И., Федорова Е.А., Духовлинов И.В., Симбирцев А.С. Разработка кандидатной субстанции рекомбинантного белка CRM197. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016. Т. 15. № 1. с. 93-98. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-1-93-98
2. Езерский В.А., Колоскова Е.М. Зависимость антительного ответа молодняка овец от способа иммунизации рекомбинантным миостатином // Биомедицина. 2024. Т. 20. № 3Е. с. 42–48. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-42-48>
3. Жукова О.Б., Колоскова Е.М. Иммунизация ягнят рекомбинантным миостатином влияет на показатели роста // Биомедицина. 2024. Т.20. № 3Е. с. 54–58. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-54-58>
4. Зубенко Э.В., Некрасов Д.К. Прогнозирование племенной ценности быков-производителей по пожизненной продуктивности их дочерей с использованием полифакторных селекционных индексов. // Проблемы биологии продуктивных животных. 2024. № 4. с. 68-80.
5. Колоскова Е.М., Езерский В.А., Жукова О.Б. На пути к разработке биоинженерных методов повышения мясной продуктивности животных: получение бактериального штамма – продуцента рекомбинантного миостатина. // Проблемы биологии продуктивных животных. 1922. № 4. С. 49-60.
6. Колоскова Е.М., Езерский В.А., Жукова О.Б. Получение рекомбинантного модифицированного миостатина с повышенной иммуногенностью. Проблемы биологии продуктивных животных. 2024;4:19-28.
7. Колоскова Е.М., Езерский В.А.. Рекомбинантный миостатин: выделение и использование в вакцинах. // Биомедицина. 2023. № 3 (в печати)
8. Кукес В.Г., Газданова А.А., Фуралев В.А., Маринин В.Ф., Перков А.В., Ленкова Н.И., Соловьева С.А., Рязанцева О.В. Современное представление о биологической роли и клиническом значении миостатина – главного регулятора роста и дифференцировки мышц. // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2021. Т. 16. № 3. с. 327-332. DOI: 10.14300/mnnc.2021.16079
9. Черепанов Г.Г. Новые подходы в изучении жизнеспособности высокоудойных коров: концепции, модели, анализ данных. // Проблемы биологии продуктивных животных 2022. № 2. С. 5-42.
10. Черепанов Г.Г. Физиологический мониторинг на основе систем биосенсоров и технологий Big Data: возможности и перспективы для повышения жизнеспособности высокоудойных коров. // Проблемы биологии продуктивных животных. 2021. № 1: с. 75-86.
11. Шишкин С.С. Миостатин и некоторые другие биохимические факторы, регулирующие рост мышечных тканей у человека и ряда высших позвоночных. // Успехи биологической химии. 2004. № 44. с. 209-262.
12. Aiello D.; Patel K.; Lasagna E. The myostatin gene: An overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals. // *Anim. Genet.* 2018. 49: 505-519, doi:10.1111/age.12696.
13. Alapatt P., Guo F., Komanetsky S.M., et al. Liver retinol transporter and receptor for serum retinol-binding protein (RBP4). // *J. Biol. Chem.* 2013. 288(2): 1250-1265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.369132>.
14. Amirouche A., Durieux A.-C., Banzet S. et al. Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. // *Endocrinology*. 2009. 150(1): 286-294. DOI:10.1210/en.2008-0959
15. Andersson O., Reissmann E., Jörnvall H., Ibáñez C.F. (). Synergistic interaction between Gdf1 and Nodal during anterior axis development. // *Develop. Biol.* 2006. 293(2): 370-381. doi:10.1016/j.ydbio.2006.02.002

16. Artaza J.N. et al., Myostatin inhibits myogenesis and promotes adipogenesis in C3H 10T(1/2) mesenchymal multipotent cells. // *Endocrinology*, 2005. 146(8): 3547- 3557.
17. Banchero G.E., Clariget R.P., Bencini R., Lindsay D.R., Milton J.T., Martin G.B. Endocrine and metabolic factors involved in the effect of nutrition on the production of colostrum in female sheep. // *Reprod. Nutr. Dev.* 2006. 46: 447-460. doi: 10.1051/rnd:2006024
18. Barb C., Kraeling R. Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. // *Anim. Reprod. Sci.* 2004. 82: 155-167. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.032
19. Barker D.J.P. Fetal origins of coronary heart disease. // *Brit. Med. J.* 1995. 1311: 171-174.
20. Barker D.J.P. The developmental origins of adult disease. // *J. Am. Coll. Nutr.* 2004. 23(Suppl. 6): 588-595. doi: 10.1080/07315724.2004.10719428
21. Bannister A.J., Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. // *Cell. Res.* 2011. 21: 381-395. DOI: 10.1038/cr.2011.22
22. Barker D.J.P. Fetal origins of coronary heart disease. *Brit. Med. J.* 1995. 1311: 171-174.
23. Batistel F., Alharthi A.S., Yambao R.R. et al. Methionine supply during late-gestation triggers offspring sex-specific divergent changes in metabolic and epigenetic signatures in bovine placenta. // *J. Nutr.* 2019. 149: 6-17. doi: 10.1093/jn/nxy240
24. Bell A.W., Greenwood P.L. Prenatal origins of postnatal variation in growth, development and productivity of ruminants. // *Anim. Prod. Sci.* 2016. 56: 1217-1232. doi: 10.1071/AN15408.
25. Bell A.W., Ehrhardt R.A. Regulation of placental nutrient transport and implications for fetal growth. // *Nutr. Res. Rev.* 2002. 15: 211-230. doi: 10.1079/NRR200239
26. Bell M.L., Buvoli M., Leinwand L.A.). Uncoupling of expression of an intronic microRNA and its myosin host gene by exon skipping. // *Mol. Cell Biol.* 2010 30(8): 1937-1945. doi:10.1128/MCB.01370-09
27. Bier E., De Robertis E.M. Embryo development. BMP gradients: a paradigm for morphogen-mediated developmental patterning. // *Science*. 2015. 348(6242): aaa5838. doi:10.1126/science.aaa5838
28. Bonnet M., Cassar-Malek I., Chilliard Y., Picard B. Ontogenesis of muscle and adipose tissues and their interactions in ruminants and other species. // *Anim. Int. J. Anim. Biosci.* 2010. 4: 1093. doi: 10.1017/S1751731110000601
29. Booth A, Magnuson A, Fouts J, et al. Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. // *Horm. Molec. Biol. Clin. Invest.* 2015. 21(1): 57-74. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0037>
30. Brown M.L. et al. Follistatin and follistatin like-3 differentially regulate adiposity and glucose homeostasis. // *Obesity*. 2011. 19(10):1940-1949.
31. Cafe L.M., Hennessy D.W., Hearnshaw H., Morris S.G., Greenwood P.L. Influences of nutrition during pregnancy and lactation on birth weights and growth to weaning of calves sired by Piedmontese or Wagyu bulls. // *Austr. J. Exp. Agric.* 2006. 46: 245-255. doi: 10.1071/EA05225
32. Carpinello, O.J.; DeCherney, A.H.; Hill, M.J. Developmental Origin of Health and Disease: the history of the Barker hypothesis and assisted technology. // *Semin. Reprod. Med.* 2018. 36: 177-182. doi: 10.1055/s-0038-1675779
33. Cammisotto P.G., Bendayan M. Leptin secretion by white adipose tissue and gastric mucosa. // *Histol. Histopath.* 2007. 22(2): 199-210. <https://doi.org/10.14670/HH-22.199>.
34. Cao X., Springer N.M., Muszynski M.G., Phillips R.L., Kaeppler S., Jacobsen S.E. Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases. // *PNAS USA*. 2000. 97(9): 4979-4984. DOI:10.1073/pnas.97.9.4979
35. Cao X., Jacobsen S. Role of the arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. // *Curr. Biol.* 2002. 12: 1138-1144.
36. Cao H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. // *J. Endocrin.* 2014. 220(2): T47-T59. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0339>
37. Carvalho E.B., Costa T.C., Sanglard L.P., Nascimento K.B., Meneses J.A.M., Galvão M.C., Serão N.V.L., Duarte M.S., Gionbelli M.P. Transcriptome profile in the skeletal muscle of cattle progeny

- as a function of maternal protein supplementation during mid-gestation. // *Livest. Sci.* 2022. 263: 104995. doi: 10.1016/j.livsci.2022.104995.
37. Chen D., Zhao M., Mundy G. R. Bone morphogenetic proteins. // *Growth factors*. 2004. 22(4): 233-241. doi:10.1080/08977190412331279890
 38. Chen W., Konkel J.E. TGF-beta and 'adaptive' Foxp3(+) regulatory T cells. // *J. Mol. Cell. Biol.* 2010. 2(1): 30-36
 39. Chen G., Xu H., Yao Y. et al. BMP signaling in the development and regeneration of cranium bones and maintenance of calvarial stem cells. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. 8: 135. doi:10.3389/fcell.2020.00135
 40. Chen M.M. Regulation of myostatin on the growth and development of skeletal muscle. // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021. 9(Art. 785712): 1-10. DOI: 10.3389/fcell.2021.785712
 41. Cherepanov G.G. Prediction of cows viability: a new look at the old problem. // *Agric. Res. Technol. (ARTOAJ)*. 2018. Vol. 141. Issue 5: *ARTOA J. MS.* ID.555931; doi: 10.19080/ARTOAJ.2018.14.555931.
 42. Cherepanov G.G., Kharitonov E.L., Ostrenko K.S. In silico predictions on the productive life span and theory of its developmental origin in dairy cows. // *Animals*. 2022. 12(6): 684-698.
 43. Coelho M., Oliveira T., Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. // *Arch Med Sci.* 2013. 9(2): 191-200.
 44. Comb M., Goodman H.M. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. // *Nucleic. Acids Res.* 1990. 18(13): 3975-3982. DOI: 10.1093/nar/18.13.3975
 45. Copping K., Hoare A., Callaghan M., McMillen I., Rodgers R., Perry V. Fetal programming in 2-year-old calving heifers: Peri-conception and first trimester protein restriction alters fetal growth in a gender-specific manner. // *Anim. Prod. Sci.* 2014. 54: 1333-1337. doi: 10.1071/AN14278
 46. Dickinson S.E., Elmore M.F., Kriese-Anderson L. et al, Evaluation of age, weaning weight, body condition score, and reproductive tract score in pre-selected beef heifers relative to reproductive potential. // *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2019. 10: 18. doi: 10.1186/s40104-019-0329-6
 47. Du M., Yan X., Tong J.F., Zhao J., Zhu M.J. Maternal obesity, inflammation, and fetal skeletal muscle development. // *Biol. Reprod.* 2010. 82: 4-12. doi: 10.1095/biolreprod.109.077099
 48. Du M., Tong J., Zhao J., Underwood K.R., Zhu M., Ford S.P. Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. // *J. Anim. Sci.* 2010. 88: E51-E60. doi: 10.2527/jas.2009-2311
 49. Duarte M.S., Gionbelli M.P., Paulino P.V.R. et al. Effects of maternal nutrition on development of gastrointestinal tract of bovine fetus at different stages of gestation. // *Livest. Sci.* 2013. 153: 60-65. doi: 10.1016/j.livsci.2013.01.006
 50. Duarte M.S., Gionbelli M.P., Paulino P.V.R. et al. Maternal overnutrition enhances mRNA expression of adipogenic markers and collagen deposition in skeletal muscle of beef cattle fetuses. // *J. Anim. Sci.* 2014. 92: 3846-3854. doi: 10.2527/jas.2014-7568
 51. Ennequin G., Sirvent P., Whitham M. Role of exercise-induced hepatokines in metabolic disorders. // *Am. J. Physiol. Endocrin. Metab.* 2019. 317(1): E11-E24. doi: 10.1152/ajpendo.00433.2018. PMID 30964704. S2CID 106409704
 52. Esfahani M., Baranchi M., Goodarzi M.T. The implication of hepatokines in metabolic syndrome. // *Diab. Metab. Syndr.* 2019. 13 (4): 2477-2480. doi: 10.1016/j.dsx.2019.06.027. PMID 31405664. S2CID 198296158.
 53. Feldman B.J. et al. Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2006. 103(42): 15675- 156.
 54. Ferreira A.O., Vasconcelos B.G., Favaron P.O. et al. Desenvolvimento do sistema nervoso central de bovinos. // *Pesqui. Vet. Bras.* 2018. 38: 147-153. doi: 10.1590/1678-5150-pvb-5020
 55. Ferreira M.F.L., Rennó L.N., Detmann E. et al. Performance, metabolic and hormonal responses of grazing Nelore cows to an energy-protein supplementation during the pre-partum phase. // *BMC Vet. Res.* 2020. 16: 108.

56. Finnegan E.J., Kovac K.A. Plant DNA methyltransferases. // *Plant Mol. Biol.* 2000. 43 (2-3): 189-201. DOI: 10.1023/a:1006427226972
57. Forbes D., Jackman M., Bishop A., Thomas M., Kambadur R. Sharma M. Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. // *J. Cell. Physiol.* 2006. 206(1): 264-272. doi:10.1002/jcp.20477
58. Friedrichs M., Wirsdörfer F., Flohé S. B., Schneider S., Wuelling M., Vortkamp A. BMP signaling balances proliferation and differentiation of muscle satellite cell descendants. // *BMC Cell. Biol.* 2011. 12(1), 26. doi:10.1186/1471-2121-12-26
59. Ge X., Vajjala A., McFarlane C., Wahli W., Sharma M., Kambadur R. Lack of Smad3 signaling leads to impaired skeletal muscle regeneration. // *Am. J. Physiol. Endocr. Metab.* 2012. 303(1): E90-E102. doi:10.1152/ajpendo.00113.2012
60. Gillman M.W. Developmental origins of health and disease. // *N. Engl. J. Med.* 2005. 353: 1848-1850.
61. Gionbelli T., Rotta P., Veloso C. et al. Intestinal development of bovine fetuses during gestation is affected by foetal sex and maternal nutrition. // *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2017. 101: 493-501. doi: 10.1111/jpn.12572 [
62. Goldberg A.D., Allis C.D., Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. // *Cell.* 2007. 128: 635-638. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.006
63. Grobet L. et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double- muscled phenotype in cattle. // *Nat. Genet.*, 1997. 17(1): 71- 74.
64. Gurevitch J., Koricheva J., Nakagawa S., Stewart G. Meta-analysis and the science of research synthesis. // *Nature.* 2018. 555: 175-182. doi: 10.1038/nature25753
65. Hamers- Casterman C.; Atarhouch T.; Muyldermans S. et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. // *Nature.* 1993, 363, 446– 448, doi:10.1038/363446a0
66. Hansen J.S., Plomgaard P.. Circulating follistatin in relation to energy metabolism. // *Mol. Cell. Endocr.* 2016. 433: 87-93.
67. Hoffmann A., Gross G. BMP signaling pathways in cartilage and bone formation. // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2001. 11(1-3): 23-45. doi: 10.1615/critreveukargeneexpr.v11.i1-3.20
68. Hoffman M., Reed S., Pillai S., Jones A., McFadden K., Zinn S., Govoni K. Physiology and endocrinology symposium: The effects of poor maternal nutrition during gestation on offspring postnatal growth and metabolism. // *J. Anim. Sci.* 2017. 95: 2222-2232. doi: 10.2527/jas.2016.1229
69. Hu S.; Chen C.; Sheng J., Sun Y., Cao X., Qiao J. Enhanced muscle growth by plasmid- mediated delivery of myostatin propeptide. // *J. Biomed. Biotechn.* 2010. 862591. doi:10.1155/2010/862591
70. Hu S.; Ni W.; Sai W. et al. Knockdown of myostatin expression by RNAi enhances muscle growth in transgenic sheep. // *PLoS One.* 2013. 8: 58521. doi:10.1371/journal.pone.0058521
71. Huber E., Notaro U.S., Recce S., Rodríguez F.M., Ortega H.H., Salvetti N.R., Rey F. Fetal programming in dairy cows: Effect of heat stress on progeny fertility and associations with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis functions. // *Anim. Reprod. Sci.* 2020. 216: 106348. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106348
72. Hung J., Sellappan S. Epigenetic modifications regulate gene expression. // *Path. Mag.* 2008. 8: 1-5.
73. Hyttel P., Sinowatz F., Vejlsted M. *Embriologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda. 2012.
74. Jensen-Cody S.O., Potthoff M.J. Hepatokines and metabolism: Deciphering communication from the liver. // *Mol. Metab.* 2021. 44:101138. doi:10.1016/j.molmet.2020.101138.
75. Jones P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. // *Nat. Rev. Genet.* 2012. 13(7): 484-492. DOI: 10.1038/nrg3230
76. Kabaran S., Besler H.T. Do fatty acids affect fetal programming? // *J. Health Popul. Nutr.* 2015. 33: 14. doi: 10.1186/s41043-015-0018-9
77. Kambadur R. et al. Mutations in myostatin (GDF8) in double- muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. // *Genome Res.* 1997. 7(9): 910- 916

78. Khanal P., Nielsen M.O. Impacts of prenatal nutrition on animal production and performance: A focus on growth and metabolic and endocrine function in sheep. // *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2017. 8: 75. doi: 10.1186/s40104-017-0205
79. Khoramipour K., Chamari K., Hekmatikar A.A. et al. Adiponectin: structure, physiological functions, role in diseases, and effects of nutrition. // *Nutrients.* 2021. 13(4): 1180. <https://doi.org/10.3390/nu13041180>
80. Kim et al. Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3- L1 cultures. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2001. 281(4): 902- 906.
81. Kim J.Y., Van De Wall E., Laplante M. et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. // *J. Clin. Investig.* 2007. 117: 2621-2637. <https://doi.org/10.1172/JCI31021>.
82. Kim T.H., Hong D.G., Yang Y.M. (December). Hepatokines and non-alcoholic fatty liver disease: linking liver pathophysiology to metabolism. // *Biomedicines.* 2021. 9(12): 1903. doi: 10.3390/biomedicines9121903. PMC 8698516. PMID 34944728
83. Ladeira M., Schoonmaker J., Gionbelli M., Dias J., Gionbelli T., Carvalho J.R., Teixeira P. Nutrigenomics and beef quality: A review about lipogenesis. // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. 17: 918. doi: 10.3390/ijms1706
84. Lamarche É., AlSudais H., Rajgara R., Fu D., Omaiche S., Wiper-Bergeron N. SMAD2 promotes myogenin expression and terminal myogenic differentiation. // *Development.* 2021. 148(3). doi:10.1242/dev.195495
85. Langley B., Thomas M., Bishop A., Sharma M., Gilmour S., Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. // *J. Biol. Chem.* 2002. 277(51): 49831-9840. doi:10.1074/jbc.M204291200
86. Lee S.J., Reed L.A., Davies M.V. et al. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2005. 102(50): 18117-18122. DOI: 10.1073/pnas.0505996102
87. Lee S. J. Genetic analysis of the role of proteolysis in the activation of latent myostatin. // *PLoS One.* 2008. 3(2): e1628. doi:10.1371/journal.pone.0001628
88. Lee S.A., Yuen J.J., Jiang H. et al. Adipocyte specific overexpression of retinol-binding protein 4 causes hepatic steatosis in mice. // *Hepatology.* 2016. 64: 1534-1546.
89. Li X., Wang J., Jia Z. et al. MiR-499 regulates cell proliferation and apoptosis during late-stage differentiation via Sox6 and cyclin D1. // *PLoS One.* 2013. 8(9): e74504. doi: 10.1371/journal.pone.0074504. eCollection 2013
90. Lin J. et al. Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. // *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 2002. 291(3): 701- 706.
91. Love O.P., Chin E.H., Wynne-Edwards K.E., Williams T.D. Stress hormones: A link between maternal condition and sex-biased reproductive investment. // *Am. Nat.* 2005. 166: 751-766. doi: 10.1086/497440.
92. Ma X., Zhou Z., Chen Y. et al. RBP4 functions as a hepatokine in the regulation of glucose metabolism by the circadian clock in mice. // *Diabetologia.* 2016. 59: 354-362. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3807-1>
93. Maresca S., Valiente S.L., Rodriguez A.M., Long N.M., Pavan E., Quintans G. Effect of protein restriction of bovine dams during late gestation on offspring postnatal growth, glucose-insulin metabolism and IGF-1 concentration. // *Livest. Sci.* 2018. 212: 120-126. doi: 10.1016/j.livsci.2018.04.009
94. Marquez D., Paulino M., Rennó L. et al. Supplementation of grazing beef cows during gestation as a strategy to improve skeletal muscle development of the offspring. // *Animal.* 2017. 11: 2184-2192. doi: 10.1017/S1751731117000982
95. Matsakas A., Diel P. The growth factor myostatin, a key regulator in skeletal muscle growth and homeostasis. // *Int. J. Sports Med.* 2005. 26. 83-89, doi:10.1055/s- 2004- 830451

96. McLean K.J., Boehmer B.H., Spicer L.J., Wettemann R.P. The effects of protein supplementation of fall calving beef cows on pre-and postpartum plasma insulin, glucose and IGF-I, and postnatal growth and plasma insulin and IGF-I of calves. // *J. Anim. Sci.* 2018. 96: 2629-2639. doi: 10.1093/jas/sky173
97. McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- beta superfamily member. // *Nature*. 1997. 387(6628): 83- 90
98. Mellor D., Flint D., Vernon R., Forsyth I. Relationships between plasma hormone concentrations, udder development and the production of early mammary secretions in twin-bearing ewes on different planes of nutrition. // *Q. J. Exp. Physiol. Transl. Integr.* 1987. 72: 345-356. doi: 10.1113/expphysiol.1987.sp003080
99. Mohammadabadi M., Bordbar F., Jensen J., Du M., Guo W. Key genes regulating skeletal muscle development and growth in farm animals. // *Animals*. 2021. 11: 835. doi: 10.3390/ani11030835
100. Munkhtulga L, Nagashima S., Nakayama K., et al. Regulatory SNP in the RBP4 gene modified the expression in adipocytes and associated with BMI. // *Obesity*. 2010. 18: 1006-1014. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.358>
101. Mosher D.S., Quignon P., Bustamante C.D. et al. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. // *PLoS Genet.* 2007, 3, e79, doi:10.1371/journal.pgen.0030079.
102. Nielsen T.L., Vissing J., Krag T.O. Antimyostatin treatment in health and disease: the story of great expectations and limited success. // *Cells*. 2021. 10(3): 533. DOI: 10.3390/cells10030533
103. Novosel'tsev, V.N., Novosel'tseva, J.A., Bojko, S.M., Yashin, A.I. Homeostasis and aging: slow-fast mathematical model of senescence and death. In: *Modeling and Control in Biomedical Systems*. Karlsburg/Greifswald, 2000. P. 71-76.
104. Oh Kyoung-Jin et al. Metabolic adaptation in obesity and type II diabetes: myokines, adipokines and hepatokines. // *MDPI (Multidisciplinary Digital Publishing Institute)*. 2016. 22 Dec. <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/1/8>
105. Opsomer G., Van Eetvelde M., Kamal M., Van Soom A. Epidemiological evidence for metabolic programming in dairy cattle. // *Reprod. Fertil. Dev.* 2016. 29: 52-57. DOI: 10.1071/RD1641
106. Ou K., Li Y., Wu P. et al. A novel nanobody directed against ovine myostatin to enhance muscle growth in mouse. // *Animals (Basel)*. 2020. 10(Art. 1398): 1-9. DOI: 10.3390/ani10081398
107. Petersen M.A., Tognatta R., Meyer-Franke A. et al. BMP receptor blockade overcomes extrinsic inhibition of remyelination and restores neurovascular homeostasis. // *Brain*. 2021. 144(8): 2291-2301. doi:10.1093/brain/awab106
108. Pfeifer L.F., Castro N.A., Neves P.M., Cestaro J.P., Siqueira L.G. Development and validation of an objective method for the assessment of body condition scores and selection of beef cows for timed artificial insemination. // *Livest. Sci.* 2017. 197: 82-87. doi: 10.1016/j.livsci.2017.01.011
109. Pfeifer L.F.M., Rodrigues W.B., Nogueira E. Relationship between body condition score index and fertility in beef cows subjected to timed artificial insemination. // *Livest. Sci.* 2021. 248: 104482. doi: 10.1016/j.livsci.2021.104482
110. Ploquin C., Chabi B., Fouret G. et al. Lack of myostatin alters intermyofibrillar mitochondria activity, unbalances redox status, and impairs tolerance to chronic repetitive contractions in muscle. // *Am. J. Physiol. Endocr. Metab.* 2012. 302(8): E1000–E1008. doi:10.1152/ajpendo.00652.201
111. Prayaga K. Evaluation of beef cattle genotypes and estimation of direct and maternal genetic effects in a tropical environment. 1. Growth traits. // *Aust. J. Agric. Res.* 2003. 54: 1013-1025. doi: 10.1071/AR03071
112. Ramírez-Zamudio G.D., da Cruz W.F., Schoonmaker J.P. et al. Effect of rumen-protected fat on performance, carcass characteristics and beef quality of the progeny from Nellore cows fed by different planes of nutrition during gestation. // *Livest. Sci.* 2022. 258: 104851. doi: 10.1016/j.livsci.2022.104851

113. Redmer D., Wallace J., Reynolds L. Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development. // *Domest. Anim. Endocrinol.* 2004. 27: 199-217. doi: 10.1016/j.domaniend.2004.06.006
114. Reynolds L.P., Redmer D.A. Utero-placental vascular development and placental function. // *J. Anim. Sci.* 1995. 73: 1839-1851. doi: 10.2527/1995.7361839x
115. Rodgers B.D., Garikipati D. K. Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review. // *Endocr. Rev.* 2008. 29(5): 513-534. doi:10.1210/er.2008-0003
116. Ruigrok V.J., Levisson M. Eppink M.H., Smidt H., van der Oost J. Alternative affinity tools: More attractive than antibodies? // *Biochem. J.* 2011. 436: 1-13, doi:10.1042/bj20101860.
117. Rutten C.J., Velthuis A.G.J., Steeneveld W., Hogeveen H. Invited review: Sensors to support health management on dairy farms. // *J. Dairy Sci.* 2013. 96: 1928-1952. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6107> 23462176
118. Salvador J.P., Vilaplana L., Marco M.P. Nanobody: Outstanding features for diagnostic and therapeutic applications. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. 411: 1703-1713. doi:10.1007/s00216-019-01633-4
119. Sartori R., Milan G., Patron M. et al. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2009. 296(6): 1248-1257. doi:10.1152/ajpcell.00104.2009
120. Sartori R., Schirwis E., Blaauw B. Bortolanza S., Zhao J., Enzo E. et al. BMP signaling controls muscle mass. // *Nat. Genet.* 2013. 45(11): 1309-1318. doi:10.1038/ng.2772
121. Seo D.Y., Park S.H., Marquez J., Kwak H.B., Kim T.N., Bae J.H. et al. hepatokines as a molecular transducer of exercise. // *J. Clin. Med.* 2021. 10(3): 385. doi:10.3390/jcm10030385.
122. Schnyder S., Handschin C. Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 α , myokines and exercise. // *Bone.* 2015. Nov 80: 115-125.
123. Sidis Y., Mukherjee A., Keutmann H., Delbaere A., Sadatsuki M., Schneyer A. Biological activity of follistatin isoforms and follistatin-like-3 is dependent on differential cell surface binding and specificity for activin, myostatin, and bone morphogenetic proteins. // *Endocrinology.* 2006. 147(7): 3586-3597. doi: 10.1210/en.2006-0089
124. Singh K., Molenaar A.J., Swanson K.M., Gudex B., Arias J.A., Erdman R.A., Stelwagen K.. Epigenetics: a possible role in acute and transgenerational regulation of dairy cow milk production. // *Animal*, 2012. 6: 375-381. <https://doi.org/10.1017/S1751731111002564>
125. Siontorou C.G. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. // *Int. J. Nanomed.* 2013. 8: 4215–4227. doi:10.2147/ijn.s39428
126. Smati S., Régnier M., Fougeray T., Polizzi A., Fougerat A., Lasserre F. et al. Regulation of hepatokine gene expression in response to fasting and feeding: Influence of PPAR- α and insulin-dependent signalling in hepatocytes. // *Diab. Metab.* 2020. 46(2): 129-136. doi:10.1016/j.diabet.2019.05.005
127. Starbuck M.J., Dailey R.A., Inskeep E.K. Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle. // *Anim. Reprod. Sci.* 2004. 84: 27-39. doi: 10.1016/j.anireprosci.2003.12.009
128. Stefan N., Haring H.U. The role of hepatokines in metabolism. // *Nature Rev. Endocr.* 2013. 9(3): 144-152.
129. Stolz L.E. et al. Administration of myostatin does not alter fat mass in adult mice. // *Diab. Obes. Metab.* 2008. 10(2): 135- 142.
130. Suh J., Kim N.-K., Lee S.-H. et al. GDF11 promotes osteogenesis as opposed to MSTN, and follistatin, a MSTN/GDF11 inhibitor, increases muscle mass but weakens bone. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. 117(9): 4910-4920. doi:10.1073/pnas.1916034117
131. Swanson J.M., Wadhwa P.D. (Eds). *Genes, Environments and Human Development, Health and Disease* (GEHDHD) meeting. Arnold and Mabel Beckman Center of the National Academy of Sciences. September 7-8, 2006.
132. Swanson T., Hammer C., Luther J., Carlson D., Taylor J., Redmer D., Neville T., Reed J., Reynolds L., Caton J. Effects of gestational plane of nutrition and selenium supplementation on mammary

- development and colostrum quality in pregnant ewe lambs. // *J. Anim. Sci.* 2008. 86: 2415-2423. doi: 10.2527/jas.2008-0996
133. Tang L., Yan Z., Wan Y., Han W., Zhang Y. Myostatin DNA vaccine increases skeletal muscle mass and endurance in mice. // *Muscle Nerve*. 2007. 36(3):342-348. doi: 10.1002/mus.20791
 134. Tang L., Kang Y., Sun S., Zhao T. et al. Inhibition of MSTN signal pathway may participate in LIPUS preventing bone loss in ovariectomized rats. // *J. Bone Miner. Metab.* 2020. 38(1): 14-26. doi: 10.1007/s00774-019-01029-5
 135. Taylor W.E., Bhasin S., Artaza J., Byhower F. et al. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. // *Am. J. Physiol. Endocr. Metab.* 2001. 280(2): 221-228. doi: 10.1152/ajpendo.2001.280.2.E221
 136. Underwood K., Tong J., Price P., Roberts A., Grings E., Hess B., Means W., Du M. Nutrition during mid to late gestation affects growth, adipose tissue deposition, and tenderness in cross-bred beef steers. // *Meat Sci.* 2010. 86: 588-593. doi: 10.1016/j.meatsci.2010.04.008
 137. Walker R.G., Poggioli T., Katsimpardi L., Buchanan S.M. et al. Biochemistry and biology of GDF11 and myostatin. // *Circ. Res.* 2016. 118(7): 1125-1142. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308391
 138. Wang Y., Fan Z., Shao L., Kong X., Hou X. Tian D., Sun Y., Xiao Y., Yu L. Nanobody- derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications. // *Int. J. Nanomed.* 2016. 11: 3287-3303. doi: 10.2147/ijn.s107194
 139. Wang F., So K.F., Xiao J., Wang H. Organ-organ communication: The liver's perspective. // *Theranostics*. 2021. 11(7): 3317-3330. doi: 10.7150/thno.55795.
 140. Weiss A., Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2013. 2(1): 47-63.
 141. Williams M.S. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. // *N. Engl. J. Med.* 2004. 351: 1030-1031.
 142. Rabe K., Lehrke M., Parhofer K.G. et al. Adipokines and insulin resistance. // *Mol. Med.* 2008.14(11-12): 741-51 <https://doi.org/10.2119/2008-00058>
 143. Rebbapragada A., Benchabane H., Wrana J. L., Celeste A. J. Attisano L. Myostatin signals through a transforming growth factor β -like signaling pathway to block adipogenesis. // *Mol. Cell Biol.* 2003. 23(20): 7230-7242. doi:10.1128/MCB.23.20.7230-7242.2003
 144. Wolfman N.M., McPherron A.C., Pappano W.N., Davies M.V. et al. Activation of latent myostatin by the bmp-1/ tolloid family of metalloproteinases. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003. 100(26): 15842-15846. doi: 10.1073/pnas.2534946100
 145. Yadav H., Quijano C., Kamaraju A.K., et al. Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF-beta/Smad3 signaling. // *Cell Metab.* 2011; 14(1): 67-79.
 146. Yakout S.M., Hussein S., Al-Attas O.S., Hussain S.D., Saadawy G.M., Al-Daghri N.M. Hepatokines fetuin A and fetuin B status in women with/without gestational diabetes mellitus. // *Am. J. Transl. Res.* 2023. 15(2): 1291-1299. PMC 10006815. PMID 36915725
 147. Zaborski D., Grzesiak W., Szatkowska I., Dybus A., Muszynska M., Jedrzejczak M. Factors affecting dystocia in cattle. // *Reprod. Domest. Anim.* 2009. 44: 540-551. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01123.x.
 148. Zago D., Canozzi M.E.A., Barcellos J.O.J. Pregnant beef cow's nutrition and its effects on postnatal weight and carcass quality of their progeny. // *PLoS One*. 2020. 15: e0237941. doi: 10.1371/journal.pone.0237941.
 149. Zakria H.M., Han B., Yue F. et al. Significant body mass increase by oral administration of a cascade of shIL21-MSTN yeast-based DNA vaccine in mice. // *Biomed. Pharmacother.* 2019. 118(Art. 109147). DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109147.
 150. Zhang T., Yang H., Wang R. et al. Oral administration of myostatin-specific whole recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* vaccine increases body weight and muscle composition in mice. // *Vaccine*. 2011. 29(46): 8412-8416. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.007

151. Zhang T., Sun L., Xin Y. et al. A vaccine grade of yeast *Saccharomyces cerevisiae* expressing mammalian myostatin. // *BMC Biotechnol.* 2012. 12(Art. 97). DOI: 10.1186/1472-6750-12-97
152. Zhao S., Xu W., Jiang W., Yu W. et al. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. // *Science.* 2010. 327: 1000-1004. DOI: 10.1126/science.1179689
153. Zhang W., Wang S.-Y., Deng S.-Y., Gao L., Yang L.-W., Liu X.-N. et al. MiR-27b promotes sheep skeletal muscle satellite cell proliferation by targeting myostatin gene. // *J. Genet.* 2018. 97(5), 1107-1117. doi: 10.1007/s12041-018-0998-5
154. Zhu X.; Hadhazy M.; Wehling M.; Tidball J.G.; McNally E.M. Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. // *FEBS Lett.* 2000. 474: 71-75. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01570

References (for publications in Russian)

1. Alexandrova M.V., Radchenko V.V., Lipkin V.M. [Inactivated bacterial culture suspension *E. coli* - is an active constituent of the pharmaceutical products]. *Setevoe izdanie: Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. (Online publication "Modern problems of science and education"). 2011. 6.
2. Cherepanov G.G. [New approaches to studying the viability of high-yielding cows: concepts, models, data analysis]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* (Productive animal biology). 2022. 2: 5-42.
3. Cherepanov G.G. [Physiological monitoring based on biosensor systems and Big Data technologies: possibilities and prospects for increasing the viability of high-yielding cows]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* (Productive animal biology). 2021. 1: 75-86.
4. Epishko O.A., Sonich N. A., Tanana L. A., Cheburanov E. S., Petrova A. P., Vertinskaya O. V., Glazev A. A. [Polymorphism of the myostatin gene (MSTN) and its relationship with slaughter parameters of cattle]. *Sel'skoe hozyajstvo - problemy i perspektivy: sbornik nauchnykh trudov. Zootekhniya* (Agriculture - problems and prospects: collection of scientific papers. Animal science). 2018. 41: 85-96.
5. Ezerskiy V.A., Koloskova E.M. [Dependence of the antibody response of young sheep on the method of immunization with recombinant myostatin]. *Biomeditsina* (J. Biomed.) 2024, 20(3E): 42–48. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-42-48>
6. Koloskova E.M., Ezerskiy V.A., Zhukova O.B. [On the way to the development of bioengineered methods for increasing meat productivity of animals: obtaining a bacterial strain producing recombinant myostatin]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* (Productive Animal Biology). 2022. 4: 49-60.
7. Koloskova E.M., Ezerskiy V.A. [Recombinant myostatin: Isolation and use in vaccines]. *Biomeditsina* (J. Biomed.) 2023. 19(3): 17–22. doi: 10.33647/2074-5982-19-3-17-22
8. Kolpakov V.I. [Influence of some polymorphic genes on meat productivity and meat quality of cattle: a review]. *Zhivotnovodstvo i kormoproizvodstvo* (Animal Husbandry and Fodder Production). 2020. 103(4): 47-64.
9. Kukes V.G., Gazdanova A.A., Furalyov V.A., Marinin V.F., Perkov A.V., Lenkova N.I., Solovieva S.A., Ryazantseva O.V. [Modern conception of myostatin biological role and clinical significance as the main regulator of muscle growth and differentiation]. *Meditsinskij vestnik Severnogo Kavkaza* (Medical News of North Caucasus). 2021. 16(3): 327-332. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2021.16079>
10. Zubenko E.V., Nekrasov D.K. [Forecasting the breeding value of stud bulls based on the lifetime productivity of their daughters using multifactorial selection indices]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* (Productive animal biology). 2024. 4: 49-60.

UDC 636.2.082

Epigenetic factors of phenotype formation of somatic cells and viability potential: theoretical and applied aspects: a review

Koloskova E.M., Cherepanov G.G.

Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition, branch of the Federal Research Center of Animal Husbandry, Ernst Vizh, Borovsk, Kaluga oblast, Russian Federation

ABSTRACT. It is currently known that numerous families of cytokines are produced in cells of different organs and tissues, they regulate intercellular and intersystem interactions, determine stimulation or suppression of cell growth, their differentiation and functional activity. It has been established that the laying of epigenetic effects of cytokines in the embryonic and fetal periods can determine the potential for life expectancy, so the main focus in studies on the problem of increasing the level of "primary" health should be given to the effects of early determination of health indicators, the level of defenses and the potential for viability of the body of productive animals. The main sections of the review: - the influence of epigenetic factors of early development on the formation of the potential for viability of productive animals; general characteristics of the cytokine system; adipokines (adiponectin, leptin, RBP4, TGF β); hepatokines (activin-E, angiopoietin-like protein, fetuins); myokines (myostatin synthesis, myostatin signaling pathway, BMP signaling pathway, myostatin involvement in growth and development regulation; studies on skeletal muscle growth stimulation in productive animals. Russian methodological developments for obtaining a bacterial strain expressing recombinant myostatin with increased immunogenicity are described. The results of a field experiment on young sheep on immunization of animals with modified recombinant myostatin to induce the synthesis of specific autoantibodies indicate the prospects for continuing research to improve the stimulation of muscle mass growth and the quality of meat products obtained.

Keywords: cytokines, antenatal period, viability potential, adipokines, hepatokines, myokines, recombinant myostatin, muscle growth, meat productivity.

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh (Productive Animal Biology). 2025. 2: 5-40.

Поступило в редакцию: 20.05.2025

Получено после доработки: 03.06.2025

Сведения об авторах:

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н., с.н.с., т. 8(910)590-92-83; heleko3@yandex.ru

Черепанов Геннадий Георгиевич, д.б.н., с.н.с., гл. ред., 89611243110@mail.ru