

УДК 577.2

## НЕРЕШАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИИ: НЕЛЬЗЯ СОЗДАТЬ ДВА ОДИНАКОВЫХ ОРГАНИЗМА, НЕЛЬЗЯ ПОБЕДИТЬ РАК, НЕЛЬЗЯ КАРТИРОВАТЬ ОРГАНИЗМ НА ГЕНОМ

Обзор

© 2018 Е.Д. Свердлов

ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, Россия;  
электронная почта: edsverd@gmail.com

Поступила в редакцию 12.11.17

В обзоре указано на существование трех категорий нерешаемых биологических проблем: 1) нерешаемые проблемы вследствие стохастических мутаций при репликации ДНК, из-за которых нельзя создать две идентичные особи, в том числе, две одинаковые сложные клетки (Свердлов Е.Д., *Биохимия*, 2009, **74**, 939–944) и нельзя «победить» рак; 2) проблемы, нерешаемые вследствие взаимодействий в сложных системах, приводящих к непредсказуемым «возникающим (*emergent*)» свойствам, из-за которых невозможно установить однозначную взаимосвязь между генетической архитектурой генома и ее фенотипическим проявлением, и нельзя с определенностью предсказать реакцию организма, его частей или патологических процессов на внешнее воздействие; 3) проблемы, нерешаемые вследствие существования принципа неопределенности и эффекта наблюдателя в биологии, из-за которых нельзя получить адекватную информацию о клетках в их тканевом микроокружении путем выделения и анализа отдельных клеток (*single cells*) и нельзя на основании культур стволовых клеток делать выводы о свойствах стволовых клеток в их нишах. Предлагается стратегия подхода к установлению максимально приближенной картины взаимосвязей генотипов с фенотипами путем построения сетей промежуточных фенотипов (эндофенотипов).

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** стохастические мутации, возникающие свойства, гетерогенность, биологический принцип неопределенности, фенотип, генотип, селектируемая функция.

Технологии галопируют впереди концепций. Мы уходим от изучения сложности организмов, от процессов и организации к составным частям.  
(*James Black*, Nobel Prize for Medicine in 1988)

«Одним из самых ярких аспектов физики является простота ее законов. Уравнения Максвелла, уравнение Шрёдингера и гамильтонова механика могут быть выражены в нескольких строках. Идеи, составляющие основу нашего мировоззрения, также очень просты: мир подчиняется законам, и все основные законы соблюдаются повсюду. Все просто, аккуратно и выразительно с точки зрения повседневной математики, либо дифференциальных уравнений с частными производными, либо обыкновенных дифференциальных уравнений. Все просто и аккуратно — за исключением, конечно, мира. Всюду, куда бы вы не взглянули, — конечно, вне стен класса физики — человек видит мир удивительной сложности» [1].

Kadanoff и Goldenfeld [1] дают некоторые рекомендации как исследовать сложный мир. Эти рекомендации так же просты, как физические

законы: «Чтобы извлечь физические знания из сложной системы, нужно сосредоточиться на правильном уровне описания. Например, некоторые вычислительные биологи пытаются имитировать динамику белка, следуя за каждой малой частью молекулы. Результат: большая часть компьютерных циклов проводится, наблюдая за тем, как маленькие группы ОН колеблются вперед и назад. Ничего биологически значимого не происходит в это время... Используйте правильный уровень описания, чтобы уловить явления, представляющие интерес. Не моделируйте бульдозеры кварками... По мере того, как наука переходит на сложность, нужно осознать, что сложность требует установок, совершенно отличающихся от тех, которые до сих пор были распространены в физике. До сих пор физики искали фундаментальные законы, справедливые для всех времен и во всех местах. Но каждая слож-

ная система отличается от другой. *По-видимому, нет общих законов для сложности.* Вместо этого нужно извлекать «уроки», которые, с проницательностью и пониманием, могут быть изучены в одной системе и применены к другой».

С другой стороны, такой выдающийся физик, как Нильс Бор, формулировал непознаваемость жизни, поскольку «мы, без сомнения, убили бы животное, если бы попытались довести исследование его органов до того, чтобы можно было сказать, какую роль играют в его жизненных отправлениях отдельные атомы... Минимальная свобода, которую мы вынуждены предоставлять организму, как раз достаточна, чтобы позволить ему, так сказать, скрыть от нас свои последние тайны. С этой точки зрения самое существование жизни должно в биологии рассматриваться как элементарный акт, подобно тому, как в атомной физике существование кванта действия следует принимать за основной факт, который нельзя вывести из обычной механической физики» [2]. Это принцип неопределенности в биологии, который похож на принцип неопределенности в физике.

Если даже не убивать живое, то, вторгаясь с прибором для исследования внутрь живой системы, мы так искажаем ее свойства, что исследуем не ее, а продукт ее взаимодействия с прибором в месте этого взаимодействия. Поскольку принципиально невозможно исключить взаимодействие электрона с прибором, с помощью которого мы исследуем свойства электрона, мы не можем определить его скорость и координату одновременно. Взаимодействие прибора с объектом, которое искажает свойства этого объекта, называют эффектом наблюдателя.

Но принцип неопределенности и есть один из фундаментальных законов физики. И в биологии, в формулировке Бора, он прост так же как и в физике. Возможно, не будучи в состоянии сформулировать такие позитивные фундаментальные законы, как уравнение Шредингера или законы Ньютона, мы можем все-таки сформулировать запретительные законы для биологии.

Замечательный советский астрофизик Шкловский высказал такую точку зрения: «Наука — это сумма запретов. Нельзя создать вечный двигатель. Нельзя передать сигнал со скоростью, большей, чем скорость света в пустоте, нельзя одновременно измерить координату и скорость электрона» [3]. Это очень изящное определение, хотя, конечно, недостаточное. Тем не менее, оно дает возможный путь определения некоторых основных фундаментальных законов не только для физики. Законов запретительных. Законов «Нельзя».

И тогда можно спросить: существуют ли запреты биологии? Осознание таких запретов позволило бы не выполнять исследований, которые подпадают под действие запрета. Это привело бы к колоссальной экономии ресурсов. На принципиально нерешаемые проблемы не следует тратить время и деньги. Так же как на создание вечного двигателя.

Я пытался ответить на этот вопрос в своем обзоре «Фундаментальные запреты биологии», опубликованном в журнале «Биохимия» в 2009 г. [4], где в качестве основного запрета выдвигал запрет на существование двух одинаковых сложных живых систем, обусловленный стохастическими мутациями, происходящими при каждом клеточном делении.

В этом обзоре я делаю более широкие обобщения и пытаюсь проиллюстрировать их, в частности, запретом на понимание однозначной взаимосвязи между генетической архитектурой генома и ее фенотипическими проявлениями.

Часть высказываемых здесь положений я опубликовал ранее [5, 6].

## КАТЕГОРИИ НЕРЕШАЕМЫХ ПРОБЛЕМ

**I. Нерешаемые проблемы вследствие стохастических мутаций при репликации ДНК:** 1) нельзя создать две идентичные особи, в том числе, две одинаковые сложные клетки [4]; 2) нельзя победить рак.

Мне также очень хотелось бы сформулировать и такой запрет: нельзя победить старость и естественную смерть, но на этой проблеме я не смогу остановиться ввиду ограниченности объема обзора и сложности проблемы и отсылаю читателей к недавним обзорам [7–9], оставляя проблему на их суд.

**II. Нерешаемые проблемы вследствие взаимодействий в сложных системах, приводящих к непредсказуемым «возникающим» (*emergent*) свойствам:** 1) нельзя на основании свойств признака установить его причины (обратная задача); 2) нельзя на основании известных причин, если они взаимодействуют между собой, установить однозначно свойства признака, вследствие возникающих свойств (прямая задача); 3) нельзя с определенностью предсказать реакцию сложной системы на внешнее воздействие.

**III. Нерешаемые проблемы вследствие существования принципа неопределенности и эффекта наблюдателя в биологии:** 1) нельзя получить адекватную информацию о клетках в их тканевом микроокружении путем выделения и анали-

за «*single cells*» — транскриптома, протеома и т.д. В частности, нельзя на основании культур стволовых клеток делать выводы о свойствах стволовых клеток в их нишах; 2) нужно помнить, что зонд, введенный в систему для наблюдения, меняет ее свойства, по крайней мере, в месте положения зонда (эффект наблюдателя).

Эту проблему я упомянул во введении. Ее, по-видимому, первым сформулировал Нильс Бор. Ее я также не смогу обсудить и также отсылаю читателя к обзорам [10, 11].

Эта система запретов, в частности, запрет на идентичность организмов вследствие неизбежных стохастических мутаций, приводящих к чрезвычайной внутри организменной и межорганизменной гетерогенности, призывает к осторожности, точнее ставит пределы надеждам на персонализированную медицину [12].

На проблемах, которые я уже обсуждал в недавних обзорах, я остановлюсь очень кратко, оперируя в основном самыми последними данными и отсылая читателей к ним и к цитированной в них литературе. Основной фокус данного обзора будет сосредоточен на проблемах I и II.

**I. 1) Нерешаемые проблемы вследствие стохастических мутаций при репликации: нельзя создать две идентичные особи, в том числе две одинаковые сложные клетки.** Эти запреты связаны с постоянно происходящими при репликации ДНК разного рода мутациями. Как часто бывает в биологии, точного определения мутации не существует. Мутации представляют собой изменения нуклеотидной последовательности генома организма. Они возникают в результате невозстановленных повреждений ДНК (как правило, вызванных радиационными или химическими мутагенами), от ошибок в процессе репликации или вставки или делеции сегментов ДНК подвижными генетическими элементами. Мутации могут приводить или не приводить к заметным изменениям наблюдаемых характеристик (фенотипа) организма. Слово происходит от лат. *mutare* — *менять, изменяться*.

Первые мутации передаются нам с половыми клетками родителей и затем накапливаются в клетках, начиная с первых делений зиготы и на протяжении всей жизни.

Гены и хромосомы могут мутировать в любой соматической или зародышевой ткани, и эти изменения называются соматическими и герминальными мутациями соответственно. Соматические не передаются потомству, тогда как герминальные мутации могут передаваться.

В зародышевой линии происходят герминальные мутации. Если мутантная половая клетка участвует в оплодотворении, то мутация будет передана следующему поколению. И если мута-

ция зародышевой линии будет присутствовать во всех соматических клетках, постзиготическая, соматическая мутация может быть обнаружена только тогда, когда клетка, которая мутировала, дает начало линии клеток, содержащей значительную часть отобранной популяции клеток [13].

Если соматическая мутация возникает в одной клетке при развитии соматической ткани, эта клетка является прародителем популяции идентичных мутантных клеток, все из которых произошли от клетки, которая мутировала. Популяция клеток, полученных из одной клетки-предшественника, называется клоном. Чем раньше в развитии происходит мутация, тем больше будет доля мутантных клеток в популяции клеток организма.

В последние годы в связи с появлением высокопроизводительных методов секвенирования нового поколения достигнут большой прогресс в установлении скорости этих мутаций.

*Современные оценки скорости мутаций.* В нормальных тканях оценки скорости мутации значительно варьируют: обычно от  $10^{-9}$  до  $10^{-10}$  мутаций на пару оснований на деление клетки [14–16]. Например, в обзоре [15] средняя скорость мутации пары оснований в клеточной линии, ведущей к развитию сетчатки, была определена как  $0,99 \times 10^{-9}$  на деление клеток, в кишечных эпителиальных клетках —  $0,27 \times 10^{-9}$ , в В- и Т-лимфоцитах —  $1,47 \times 10^{-9}$ , а в гене *HPRT* в культурах фибробластов —  $0,34 \times 10^{-9}$ . Было обнаружено, что отношение замен оснований к малым вставкам/делециям и мутациям при рекомбинации составляет  $\sim 0,9 : 0,08 : 0,04$ . Эти величины примерно соответствуют более поздним оценкам [17].

Что касается взрослых стволовых клеток (ВСК) и клеток, закладывающих основы развития эмбриона, небольшое количество которых приводит к появлению всех его тканей, существует мнение, что они должны иметь надежные механизмы для предотвращения или восстановления повреждения ДНК [18–20]. Поддержание геномной целостности является жестко регулируемым решающим фактором, как для предшественников, так и для стволовых клеток в их естественной среде, но не для изолированных стволовых клеток. Например, ниши стволовых клеток играют существенную роль в поддержании ВСК или предотвращении возникновения опухолеобразования путем обеспечения ингибирующих сигналов, как для пролиферации, так и для дифференцировки [21–23]. Во время процессов спецификации клеточных линий в бластоцисте клетки внутренней клеточной массы также находятся под строгим контролем сигнала

лов от других клеток и контактных/позиционных связей клетка-клетка [16, 24].

Скорость мутации зародышевой линии человека в расчете на пару оснований на клеточное деление составляет  $\sim 6 \times 10^{-11}$  на деление клеток, приближаясь к самым низким показателям, наблюдаемым у одноклеточных видов. Это в 10–100 раз ниже, чем в различных соматических тканях человека [13, 25–28]. Обе скорости мутации у мышей значительно выше, чем у людей [13].

Мутации в зародышевых клетках часто приводят к наследственным заболеваниям (см. обзоры [29–33]).

Важно отметить, что единицы измерения скорости мутаций обычно различаются для соматических и герминальных клеток. Для соматических клеток это, как правило, число мутаций на пару оснований на клеточное деление, тогда как для герминальных мутаций чаще используют количество мутаций на пару оснований на целый геном за генерацию. В популяционной биологии и демографии время генерации — это среднее время между двумя последовательными поколениями в популяции. В человеческих популяциях время генерации обычно составляет от 22 до 32 лет. Время генерации может также определяться как время, необходимое для рождения человека, достижения половой зрелости и воспроизведения.

Отвлекаясь от многих нюансов, связанных с различиями во времени генерации герминальных клеток у сперматозоидов и ооцитов (читатель может посмотреть это в базе данных <http://book.bionumbers.org/what-is-the-mutation-rate-during-genome-replication> или в хорошем блоге <http://sandwalk.blogspot.ru/2015/04/human-mutation-rates-whats-right-number.html>), произведу некоторые приблизительные расчеты для гетерогенности соматических клеток, поскольку именно они будут представлять для нас основную базу для рассуждений о различиях между индивидуумами.

Взрослый человеческий организм состоит приблизительно из  $10^{14}$  клеток. Игнорируя, что разные ткани могут достигать полной дифференциации в разное время и клетки могут погибать, оценка числа клеточных делений, в результате которых образуется конечная дифференцированная клетка, дает величину  $N \sim 46$  ( $10^{14} = 2^N$ ,  $N \log 2 = 14$ ). Если мы примем, на основании вышеприведенных данных, скорость мутаций  $10^{-9}$  и длину генома  $3 \times 10^9$ , то конечная соматическая клетка в результате получит  $\sim 120$  мутаций, отличающих ее от исходной. Соседняя клетка получит столько же, но они будут расположены в других местах (стохастика!). Итак, каждые две

клетки взрослого организма будут отличаться друг от друга более чем 200 мутационных замен. Вероятность, что найдется две клетки, у которых положение всех 100 мутаций будут совпадать, очень низка. Таким образом, индивидуум представляет собой мозаику разных клеток. Этот теоретический вывод с приходом эры полногеномных секвенирований получает практические подтверждения [34, 35]. Добавим к этому еще стохастичность эпигенетических изменений [36], и мы придем к выводу, что нет двух одинаковых генетически и эпигенетически индивидуумов. Каждый человек с точки зрения строения генома и эпигенома уникален.

Отсюда следует запрет **I. 1)** нельзя создать двух идентичных индивидуумов и двух идентичных сложных клеток. Идентичные (гомозиготные) близнецы не идентичны [37–39].

**I. 2) Нельзя победить рак. Пока гены продолжают спонтанно мутировать, рак никогда не будет искоренен полностью. Он постоянно будет возникать. Лечение рака проблематично.** Есть две стороны в этой проблеме: неизбежность возникновения рака в популяции и проблемы с его прогностической диагностикой и лечением.

#### ***Неизбежность возникновения рака в популяции.***

В 1996 г. было опубликовано широко известное [40] интервью с выдающимся онкологом Альфредом Кнудсоном (Alfred G. Knudson), где он сказал: «Пока гены продолжают спонтанно мутировать, рак никогда не будет искоренен полностью. Думать иначе нереалистично... Но можно надеяться, что через четверть века мы минимизируем смертность от рака тех, кому сейчас 60 лет».

Теперь аксиоматично, что первопричиной рака являются повреждения генов, которые далее приводят к последующей эволюции сложной системы, представляющей собой раковую опухоль [41] (об этом ниже). Ряд экспериментальных фактов обосновывает этот вывод: сохранение злокачественного фенотипа раковых клеток через множество клеточных делений; мутагенность различных агентов, которые могут вызывать рак; наличие хромосомных аномалий в раковых клетках; случаи, когда рак представляет собой семейное заболевание; и предрасположенность к раку, которая наблюдается в случае наследуемых нарушений в репарации ДНК. В самое последнее время блестящие работы С. Tomasetti и В. Vogelstein показали, что вероятность возникновения рака определенной ткани практически пропорционально зависит от частоты делений стволовых клеток этой ткани, т.е. от частоты возникновения мутаций в ней [42]. Все вместе это указывает на измененный геном как основу рака.

Первые указания на то, что потенциальной причиной туморогенности являются обычные клеточные гены, протоонкогены, дали исследования РНК-содержащих онковирусов. Протоонкогены могут быть преобразованы в «онкогены» посредством *приобретения* генетически доминантной способности ускорять клеточную пролиферацию. Далее выявилось, что возникновению раковых клеток могут также способствовать рецессивные дефекты в генах-супрессорах опухолей, гомозиготные дефициты которых способствуют опухолеобразованию. Сочетания активированных онкогенов и дефектных генов-супрессоров опухолей присутствуют в большинстве, если не во всех раковых опухолях человека, накапливаясь ступенчато, чтобы стимулировать клональное развитие и диверсификацию, приводящую к злокачественности (см. обзоры [43–48]).

**Организм человека играет с огнем эволюции. Эволюционная неизбежность возникновения раковых опухолей [49].** Раковая опухоль является результатом выработанного эволюцией процесса развития организма, требующего обновления тканей в процессе жизнедеятельности многоклеточного организма.

Нормальное функционирование многоклеточных организмов требует постоянного обновления тканей. В эволюции выработался механизм, который заключается в отмирании старых клеток и замене их новыми. Этот процесс требует постоянного деления клеток на протяжении жизни организма. Но каждое деление клетки приводит к появлению мутаций в дочерних клетках [50] и может инициировать внутриорганизменные эволюционные события, приводящие к фатальной злокачественности. Таким образом, рак является платой за многоклеточность [49]. Все виды позвоночных подвержены поражению раковыми опухолями и это, по-видимому, всегда было так, поскольку следы опухолей или метастазирующего рака прослеживаются в ископаемых остатках динозавров. Беспозвоночные также подвержены опухолеподобным образованиям [51–54]. Можно думать, что вероятность заболеть раком увеличивается с количеством деления клеток в организме. В свою очередь из этого следует, что с увеличением продолжительности жизни увеличивается вероятность заболевания раком. Вот как это сформулировал норвежский ученый Breivik [55]: «Рак – это естественное последствие старения, и чем лучше медицинская наука помогает продлению жизни людей, тем выше будет число больных раком в популяции».

Организмы должны были выработать (и выработали) в процессе эволюции механизмы эффективной супрессии рака [56] и поэтому нет

прямой зависимости числа клеток в организме и его подверженности раку (*парадокс Пето*), но это выходит за рамки данного обзора.

**Лечение рака проблематично.** Сейчас, по-видимому, можно считать доказанным увеличение скорости мутаций в раковых клетках по сравнению с нормальными (для последнего обзора см. [50, 57]). Это означает, что и гетерогенность раковой опухоли выше, чем нормальной.

Опухолевая клетка в своем геноме может содержать к моменту выявления опухоли ( $10^9$  клеток, 1 г) 10 000 мутаций. Dr. Glazier (см. цитату в [50]) оценил возможное число различных клеток с таким количеством случайно распределенных мутаций как  $\sim 10^{68000}$ ! Таким образом, нет двух одинаковых клеток в одной опухоли, нет двух одинаковых клеток в разных опухолях. Кроме того, опухоли одного и того же типа отличаются у генетически у разных пациентов [58]. Опухоль гетерогенна генетически и эпигенетически [59]. Все клетки в ней различны по генетической структуре. Среди них есть устойчивые к практически любым воздействиям [60]. При терапии чувствительные клетки погибают, устойчивые остаются и дают начало новой опухоли – устойчивой к использованному терапевтическому воздействию. Т.н. молекулярная таргетная терапия, основанная на использовании в качестве мишени отдельных молекул или групп молекул, измененных в раковых клетках по сравнению с нормальными, неадекватна многослойной сложности рака.

Впечатление такое, что чем глубже мы проникаем в интимные молекулярные детали, чем более фокусируемся на конкретных мишенях, тем более методы лечения становятся неадекватными комплексности проблемы. Исчерпывающее геномное генотипирование, вероятно, поможет только малой доле пациентов [61]. Многие опухоли не имеют никаких хорошо изученных мутаций, на которые можно было бы направлять терапевтическую обработку. Например, только  $\sim 15\text{--}20\%$  всех опухолей легкого имеют мутации, которые могут подходить под таргетные реагенты [61].

Развитие внутриопухолевой неоднородности создает также серьезные ограничения для выявления мутировавших молекул или сигнальных путей на основе молекулярного анализа биопсии опухоли. Молекулярный анализ одного образца биопсии из опухоли не обязан воспроизводиться в других ее частях. Поэтому лечение, основанное на этом анализе, вряд ли будет иметь большую пользу, поскольку в других частях активны другие клетки с другими молекулярными характеристиками, не поддающиеся данному воздействию [12].

Для изложения мне представляется полезным дать краткое описание сложных систем, которые я уже упоминал и к которым относятся любой живой организм и большинство его патологий.

### КРАТКИЙ ЭКСКУРС В НЕРЕШАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ, ВЫЗВАННЫЕ СЛОЖНОСТЬЮ СИСТЕМ

Детальное рассмотрение проблемы сложных систем было дано мною в недавних обзорах [5, 6]. Для объективности, я также рекомендую недавний обзор с описанием сложных систем [62]. Здесь я даю только весьма краткое изложение основных моментов.

Сложная система — это многокомпонентная система, состоящая из *взаимодействующих* субъединиц, в результате взаимодействия которых появляются т.н. *возникающие (emergent)* свойства, присущие целой системе и не *предсказуемые* на основании свойств исходных субъединиц (см. ниже). Возникающие свойства являются важнейшим качеством сложных систем. Они не могут быть приписаны отдельным взаимодействующим компонентам, это свойства целой системы. При этом система может состоять из иерархических уровней. Каждый из них имеет свои возникающие свойства [63–67].

Сложные системы нелинейны и *предельно чувствительны к начальным условиям* [68]. Это означает, что траектория системы [63], определяемая как изменение ее состояния, например, во времени, непредсказуема. Например, непредсказуемо изменение параметров, температуры, давления, формулы крови и т.д., определяющих состояние пациента во времени. Зависимость от начальных условий означает, что две системы, состояния которых очень близки в начальный период, и которые функционируют согласно одинаковым правилам, будут иметь различные траектории в течение времени. Иммунная система, например, состоит из различных элементов (макрофагов, Т- и В-клеток и т.д.), которые взаимодействуют друг с другом путем обмена сигналами (в частности, цитокинами). Даже при воздействии совершенно одинаковых стимулов иммунная система, как и другие сложные системы, в том числе рак, может откликаться совершенно различно.

Сложные системы *нелинейны*, т.е. их отклик на сумму внешних сигналов не равен сумме откликов на все эти сигналы, взятые по отдельности [69]. Небольшие изменения некоторых воздействий необязательно дают небольшие же отклики системы, и наоборот. Нередко большой

неожиданный эффект возникает в ответ на малое воздействие.

В сложных системах *невозможно* точно предсказать влияние факторов окружающей среды. В организме оно (также, как и влияние стохастических факторов) начинается *in utero* и продолжается на протяжении всей жизни индивидуума [39]. Сложные системы, как целое, не поддаются компьютерной симуляции [68, 70].

**Рак — это сложная система с большим количеством взаимодействий с окружающей средой, порождающей возникновение непредсказуемых свойств.** Опухоль сочетает в себе сложное, меняющееся во времени и пространстве многообразие клеток, каждая из которых имеет собственные сигнальные каскады, репликацию, транскрипцию и т.д., и претерпевающих многочисленные изменения на пути превращения в раковые клетки. Ей присуща сложность растущей развивающейся системы со всеми ее признаками и свойствами, позволяющими ей противостоять антираковым агентам и индуцировать ту внутриопухолевую клеточную гетерогенность, которая делает опухоль уникальной для каждого пациента [58]. В этом отношении рак отличается от всех других болезней [71].

Однако сложность опухоли далеко не ограничивается наборами раковых генов и клеток, в той или иной степени влияющих на прогрессию опухоли. В своей последней версии отличительных особенностей (*hallmarks*) Hanahan, Weinberg [72] указывают, что опухоли проявляют еще и другое измерение сложности (*tumors exhibit another dimension of complexity*): опухоли привлекают к своей эволюции широкий репертуар нормальных клеток, которые они приспосабливают для своих нужд, и которые способствуют приобретению отличительных критериев, создавая то, что называют «микроокружением» опухоли, ее экологической ниши, и что играет важнейшую роль как в эволюции самой первичной опухоли, так и в ее метастазировании. Сегодня можно с уверенностью полагать, что, возможно, главная сложность опухоли — огромное количество взаимодействий между собственно раковыми (обычно эпителиальными) клетками и разнообразными стромальными клетками, составляющими микроокружение опухоли (МО, *tumor microenvironment*, ТМЕ) [73].

**Терапевтические подходы могут направляться не на раковые клетки, а на разрушение взаимодействий внутри эволюционирующей опухоли.** В последние годы большой резонанс получил принципиально новый подход. Вместо того чтобы лечить мутации в раковых клетках, новая терапия сфокусирована на разрушении сложных взаимодействий раковых клеток с иммунными ком-

понентами стромы, определяющих успех эволюции ракового организма. Эти взаимодействия позволяют раковым клеткам ингибировать иммунные клетки в своем окружении и, таким образом, избегать уничтожения иммунной системой. Успешное использование ингибиторов этих взаимодействий в клинике за последние 5 лет [74–76] продемонстрировали, что рак может быть распознан иммунной системой, а иммунная система может ингибировать и даже устранять опухоли.

Хотя эти методы лечения неизмеримо увеличили продолжительность жизни многих онкологических больных, большое количество пациентов со злокачественными заболеваниями не реагируют на терапию [77–79]. Кроме того, успехи сопровождаются многочисленными неблагоприятными аутоиммунными эффектами [80, 81]. В целом эффект терапии на конкретного пациента непредсказуем. Будущие исследования, вероятно, откроют новые перспективные иммунологические мишени или старые мишени в сочетании с другими иммунотерапевтическими подходами, химио- и радиотерапией, терапией онколитическими вирусами и малыми молекулами.

Но полученные результаты лишней раз демонстрируют, что сложность остается сложностью с ее непредсказуемостью. Ее отклик на воздействия непредсказуем.

**Нерешаемая проблема типа II. Сложные взаимоотношения генома с организмом порождают нерешаемые проблемы в исследовании взаимосвязей генотипа с фенотипом и расшифровке функциональной архитектуры генома.** Начну с цитирования статьи, опубликованной электронным ресурсом «Evolution News@DiscoveryCSC» ([https://evolutionnews.org/2017/02/encode\\_team\\_con/](https://evolutionnews.org/2017/02/encode_team_con/)) 13 февраля 2017 г.: «Со свежим финансированием команда ENCODE продолжает уничтожать миф о «мусорной» (*junk*) ДНК». В статье говорилось: «Национальные институты здравоохранения (NIH) только что финансировали пять центров для изучения того, что делает «темная материя генома» (часть, не кодирующая белок). Стратегия поиска функции продолжает оставаться плодотворной... Это подход, который утверждает: «Если это есть, оно, вероятно, делает что-то важное». Инвестиции составили 31,5 млн \$ США на 2017 г.».

Консорциум ENCODE Project Consortium [82] опубликовал в 2012 г. огромный список «функциональных элементов» в геноме человека под названием «Энциклопедия ДНК-элементов» («The Encyclopedia of DNA Elements»). Наиболее поразительным было утверждение, что 80% человеческого генома транскрибируется,

т.е. имеет «биохимическую функцию», что находится в остром противоречии с традиционным представлением о нефункциональном «мусоре» (*junk*), составляющем более 90% человеческого генома. Это несоответствие вызвало горячие дебаты, основное внимание в которых было сосредоточено на доле «мусора» в геноме человека. Здесь тесно переплетены три чрезвычайно актуальные проблемы: стратегия финансирования науки, выбор адекватной научной методологии дальнейшего развития биологической науки — «наука, управляемая гипотезами» против «науки, основывающейся на анализе больших массивов данных (Big Data)» и, наконец, «эволюция против интеллектуального дизайна жизни» (Intelligent Design, ID).

ENCODE — типичный пример исследований в стиле «большой науки» (*big science*). Брюс Альбертс (Bruce Alberts), бывший главный редактор журнала «Science», в связи с выпуском 30 статей проекта ENCODE опубликовал статью «Конец «Малой науки»?» («The End of «Small Science»?») [83], где он предупредил: «Каждое из этих мероприятий в области большой науки стимулирует разработку ценных новых методологий, необходимых для проведения такого типа исследований в требуемом масштабе. Но масштаб также создает ситуацию, которая затрудняет прекращение этих проектов, даже когда есть явные признаки уменьшения их продуктивности. В наше время очень ограниченных ресурсов становится все более критичным принимать объективные и жесткие решения о том, какие проекты имеют лучшие шансы на получение результатов, необходимых для глубокого понимания, а не просто описания биологических систем». У Alberts были веские основания сказать «явные признаки уменьшения отдачи». Например, через 10 лет после завершения Проекта генома человека в журнале «Science» появилась статья под названием «Дефляция геномного пузыря» («Deflating the Genomic Bubble»), в которой авторы спрашивают «... где вся эта геномная медицина, которую нам обещали десять лет назад?» [84]. С тех пор мало что изменилось.

В этой части обзора я рассматриваю проблему нерешаемости определения точной карты геномных элементов, определяющих фенотипы организма, в частности, определения функциональности некодирующих и нерегулирующих геномных элементов (мусор), и выдвигаю гипотезу о наиболее перспективных способах идентификации функциональных областей генома.

**Послушайте! Ведь, если звезды зажигают — значит — это кому-нибудь нужно?** Это слова Владимира Маяковского из его стихотворения «Послушайте!». Они отражают особенность че-

ловеческого мышления: все, что существует, целесообразно и строго детерминировано. Он ищет порядок, даже если его не существует [10]. Это т.н. взгляд Панглосса (Pangloss, персонаж в повести «Кандид» Вольтера, который, вероятно, был карикатурой на философа Готфрида Лейбница (Gottfried Leibniz), который теоретизировал на тему о том, что мы живем в лучшем из всех миров). Термин «Парадигма Панглосса» («*Pangloss paradigm*») был введен Стивеном Гулдом (Stephen Gould) и Ричардом Левонтиным (Richard Levontin), чтобы обозначить точку зрения в биологии, в которой говорится, что все свойства живых существ являются адаптациями для определенных целей. Следствием этой особенности человеческого разума является, в частности, поток математических моделей, описывающих сложные явления в упрощенных (в основном линейных) терминах [10]. Они могут работать довольно хорошо, но завлекать исследователей в т.н. «ловушку правдоподобия», не имеющую ничего общего с реальностью. Лучший пример такой ловушки — геоцентрическая модель Птолемея. Говоря о биологии, наиболее опасной ловушкой является «статистическая значимость =  $p \leq N$  ( $N$  может, в зависимости от предмета исследования, варьировать от 0,05 до менее 10–20)». В этом последнем случае причинно-следственная связь заменяется корреляцией. Такой ловушкой, кстати, является также системная биология, обещающая грандиозный успех в «персонализированной медицине» [6].

Сообщество исследователей функциональных элементов генома разделилось на два почти равных непримиримых лагеря, подобно лилипутам Джонатана Свифта в дебатах между «остроконечниками» и «тупоконечниками», относительно правильной практики разбивания яиц. В рамках парадигмы Панглосса многие исследователи считают, что, например, транскрипты очень низкого уровня представляют собой огромный мир функциональных РНК, только потому, что они существуют. Их противники думают, что есть основания подвергать сомнению этот Панглоссовский взгляд. Несомненно, среди таких транскриптов могут быть обнаружены многие функциональные кодирующие и ncRNAs, но еще более вероятно, что подавляющее большинство этих транскриптов — просто *junk*.

Так кто же прав? Для ответа на этот вопрос нам нужно, прежде всего, определить смысл термина «функция», что мы подразумеваем под функцией, и с какого уровня организации живой системы понятие «функции» становится осмысленным.

**Функция или активность? Используйте правильный уровень описания, чтобы поймать яв-**

**ния, представляющие интерес. Не измеряйте бульдозеры кварками.** Этот подзаголовок является парафразом рекомендации американских физиков Kodanoff и Goldenfeld в их замечательной статье «Простые уроки сложности», которую я упоминал выше [1]. Уровень описания «функции», используемый в 2012 г. авторами ENCODE, когда они приписали «биохимические функции» для 80% человеческого генома [82], не был «правильным». «Биохимическая функция» не была определена ENCODE корректно. Определение было дано «функциональному элементу», который представляет собой «дискретный сегмент генома», который кодирует определенный продукт (например, белковая или некодирующая РНК) или отображает воспроизводимую биохимическую структуру (например, участок связывания белка или специфическую структуру хроматина) [82].

Однако цифра 80% была с энтузиазмом принята «детерминистами» (и верующими в Intelligent Design), потому что она, как казалось, свидетельствовала об отсутствии нефункциональных элементов в геноме и, таким образом, поддерживала его разумный дизайн (ID).

Но эту трактовку остро критиковали сторонники эволюционного происхождения организмов и их геномов: если у элемента есть какая-то биохимическая активность, это не обязательно означает, что он имеет какое-либо значение для функционирования клетки и, особенно, всего многоклеточного организма. Согласно [85] и другим авторам, термин «функция» в биологии может иметь два основных смысла: «селектируемый эффект» (*selected effect*) и «причинная роль» (*causal role*) [86–89].

Функция «селектируемого эффекта», также называемая генетической функцией, объясняет происхождение, этиологию и последующую эволюцию признака. Такая функциональность защищена естественным отбором; если эта защита перестает работать, функциональный элемент будет накапливать вредные мутации и со временем потеряет свою функциональную активность [85]. «Различие того, что делает элемент (генетический или иной) (его причинная роль) от того, почему он существует (его селективная функция), лежит в основе биологии» [90].

Чтобы иметь только функцию «причинной роли», например, транскрипцию, необходимо и достаточно, чтобы элемент был транскрибирован. Все функции «селектируемого эффекта» имеют также причинную роль. Напротив, большинство функциональных элементов «причинной роли» не имеют функции «селектируемого эффекта». Поэтому предпочтительно ограничивать термин «функция» функцией «селектируе-



мого эффекта», а функцию «причинной роли» определять как «активность» [87].

Основываясь на степени груза мутаций, переносимого для видов млекопитающих, Нобелевский лауреат Германн Джозеф Мюллер (Hermann Joseph Muller) в 1967 г. оценил верхний предел количества генов в геноме человека как 30 000 — очень близко к данным современного генома человека (цитируется по [91]). Обратите внимание, что это была чисто холистическая оценка.

D. Graur [89] также использовал холистический подход, чтобы показать, что максимальная доля функциональных элементов в геноме человека не превышает 25%, а остальная часть — это мусорная ДНК. Оценки доли генома, которая имеет «селектируемый эффект», основывались на известных скоростях вредных мутаций, коэффициентах рождаемости, необходимых для воспроизводства населения (*replacement fertility rates*) и «мутационного груза» и, как следствие, на уменьшении репродуктивного успеха, вызываемого вредными мутациями. Graur предположил, что только функциональные части генома могут быть повреждены вредными мутациями, тогда как мутации в нефункциональных частях должны быть нейтральными.

Из-за вредных мутаций каждая пара каждого поколения должна производить более двух детей, чтобы поддерживать постоянный размер популяции. Чем больше доля функционально важной части генома, тем больше потомков должно рождаться каждой парой, чтобы поддерживать размер популяции. Graur обнаружил, что, если 80% генома будут функционировать, потребуются неприемлемо высокая рождаемость.

Его выводы подтверждаются недавними данными, что 8,2% (7,1–9,2%) генома человека в настоящее время подвержены отрицательному отбору и, следовательно, вероятно, являются функциональными [92].

Graur размышляет: «Нет необходимости секвенировать все под солнцем. Нам нужно секвенировать только те участки, которые, как мы знаем, функциональны» (ScienceDaily, 14 июля 2017. [www.sciencedaily.com/releases/2017/07/170714140234.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2017/07/170714140234.htm)). Это очень похоже на мысли Альбертса: «... громадные проблемы, которые остаются на пути к глубокому пониманию химии жизни, потребуют выхода за рамки подробных каталогов. Обеспечение успешного будущего для биологических наук потребует ограничения роста крупных центров и «омиковых» проектов, чтобы обеспечить большую финансовую поддержку для решающей работы инновационных малых лабораторий, стремящихся понять удивительную сложность живых систем» [83].

**Определение генетических причин функций из поведения сложной системы является обратной задачей, которую невозможно решить. Вывод функций из состава компонентов является прямой задачей, которую также невозможно решить ввиду возникающих свойств.** Оценки Muller и Graur чрезвычайно ценны, особенно с эволюционной точки зрения, однако они не дают указаний на конкретные элементы генома, которые функциональны и на конкретные функции, которые они выполняют.

Ответ на этот вопрос не может быть дан на основании анализа фенотипов, поскольку это потребовало бы решения так называемой обратной проблемы (*inverse problem*), которую в общем случае решить невозможно [93]. В случае сложных систем, особенно таких сложных, как организм, невозможно решить и прямую задачу — вывод свойств фенотипа из структур генома и других молекулярных компонентов, участвующих в формировании фенотипа. Эта невозможность обусловлена, взаимодействиями этих компонентов, порождающими *непредсказуемые* возникающие свойства.

Простейший парадигматический пример — прямая задача: из свойств молекул водорода и кислорода невозможно предсказать все свойства воды — ее температуру кипения, поверхностное натяжение, свойства как растворителя, удельный вес, способность замерзнуть, давая снежинки разнообразных форм и т.д. Это «фенотип» воды. Он возникает вследствие *взаимодействий* водорода и кислорода. Обратная задача: просто из свойств («фенотипа») воды невозможно вывести, какие компоненты ее составляют и предсказать их свойства.

Для перехода к связям генома и организма я буду цитировать [*курсив в квадратных скобках — мои примечания*] одного из самых уважаемых современных ученых и философов науки S. Brenner, Нобелевского лауреата, внедрившего в науку замечательную модель — нематоду. Первая часть заголовка параграфа также парафраз из его статьи [93]. (Brenner в одной из своих лекций иллюстрировал обратную проблему примерно таким образом: «Можете ли вы представить детали барабана, услышав только его звук?»)

«Последовательность генома человека когда-то была уподоблена отправке человека на Луну. Сравнение оказывается буквально правильным, потому что отправить человека на Луну легко; его возвращение, вот что — сложно и дорого. Сегодня последовательность генома человека, так сказать, застряла на метафорической луне, и наша задача — вернуть ее на Землю и дать ей жизнь, которой она заслуживает. Все понимали, что получить последовательность будет

очень просто, это проблема 3M Science (Money, Machines and Management) — достаточности денег, машин и управления. Интерпретация последовательности для выявления функций, кодируемых ею, и регуляторных элементов и понимания того, как они интегрированы в сложную физиологию человека, всегда считалась сложной задачей, но поскольку легче продолжить коллекционировать данные, этой задачей [интерпретацией, — Е.С.] на самом деле не были серьезно заняты» [93].

«Геном должен лежать в основе любой теории, которую мы строим, но так как преобразование информации в геноме в конечный живой организм включает в себя множество сложных процессов, опосредованных молекулами, запрограммированными в геноме, все это нужно будет изучить довольно подробно, прежде чем мы сможем читать и понимать геномы. Нет простого способа «картировать» организмы на их геномы, если они достигли определенного уровня сложности. Таким образом, хотя последовательность геномов является центральной, она представляет собой уровень абстракции, который является слишком загадочным, чтобы использоваться как таковая для организации данных и построения теоретических моделей. Предложения основывать все на последовательности генома, аннотируя его дополнительными данными [прямая задача, — Е.С.], будут приводить только к увеличению его непонятности» [93].

Таким образом, мы попадаем в «ножницы невозможности». Brenner не был бы Brenner, если бы не предложил варианта решения, основой которого является предложение использовать в качестве центральной «фигуры» в дальнейшем движении к расшифровке функций не геном, а клетку. Свой алгоритм такого решения он назвал «Cellmap». Хотя я также считаю, что именно клетка должна быть в центре дальнейших усилий научного сообщества (см., например, [94]), я не согласен с рядом его положений. Но, не имея места для изложения его концепции, не имею возможности и возражать. Предлагаю читателем самим сделать выводы из очень интересной статьи Brenner [93].

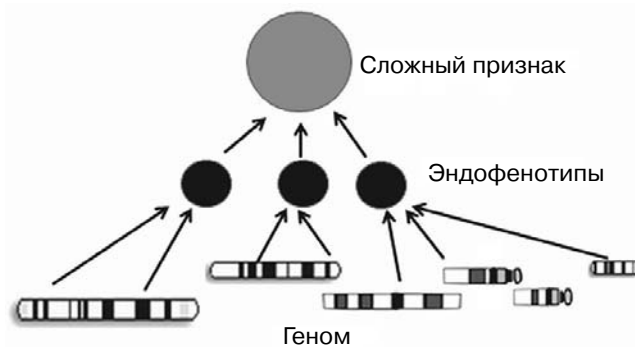
**Точные решения невозможны. Где искать максимальные приближения?** Я не предложу ничего нового, вспомнив триаду «эволюция—развитие—болезни», компоненты которой тесно связаны через общие системы регулирования, как очень перспективную область для поиска приближений. Принцип Добжанского «Ничто в биологии не имеет смысла, кроме как в свете эволюции» уже давно является аксиомой. Мы могли бы вывести взаимосвязи функций «селектируемого эффекта» с генетическими элементами, взяв за

основу широкий сравнительный анализ регуляции развития и болезней, возникающих из-за дерегулирования развития или гомеостаза.

Существует обширный арсенал моделей и методов анализа, которые позволяют надеяться на успех. Чтобы решить эту задачу, следовало бы инициировать и поддерживать программы и консорциумы, отличные от «омиковых» проектов тем, что их основное внимание переключается с разработки высокопроизводительных технологий на поиск ассоциаций фенотипов с функциональными геномными элементами. Ключевая роль в этом поиске может сыграть построение сетей промежуточных фенотипов (эндофенотипов), которые ближе к основным продуктам гена, чем наблюдаемый конечный фенотип (рисунок).

Концепция эндофенотипа предполагает, что, будучи более проксимальным к основным продуктам гена, чем наблюдаемый конечный фенотип, эндофенотип будет иметь менее сложную сеть причинных генетических взаимодействий (генетическую архитектуру), которая может позволить легче идентифицировать специфические генетические факторы, лежащие в основе сложного признака. В частности, многие широко распространенные заболевания, а также физиологические и патофизиологические процессы, такие как спорадический рак, сахарный диабет, ишемическая болезнь сердца или аутоиммунные заболевания, являются сложными фенотипами и имеют эндофенотипы. Например, на восприимчивость к ишемической болезни сердца влияют такие промежуточные фенотипы, как артериальное давление, гиперхолестеринемия, или восприимчивость к проатерогенным агентам [95].

К эндофенотипу предъявляют ряд требований [96]. В частности, эндофенотип должен быть наследуемым, наследуемость эндофенотипа должна согласовываться с наследуемостью



Принцип использования эндофенотипов для установления взаимосвязей генотипа и фенотипа

внешнего фенотипа, он должен поддаваться надежным измерениям и ряд других [95–97].

Поиск и создание сетей взаимодействий, включающих эндофенотипы, будет трудной и очень рутинной работой. Но время скороспелых сенсаций заканчивается, и настает время собирать камни.

### Благодарности

Виноградовой Т.В. за критический анализ и помощь в подготовке обзора.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект 14-50-00131).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goldenfeld, N., and Kadanoff, L.P. (1999) Simple lessons from complexity, *Science*, **284**, 87–89.
- Бор, Н. (1961) Атомная физика и человеческое познание, Изд-во ИЛ, Москва, с. 22–23.
- Шкловский И. (1991) Эшелон, Изд-во Новости, Москва, с. 109.
- Sverdlov, E.D. (2009) Fundamental taboos of biology, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 939–944.
- Sverdlov, E.D. (2016) Multidimensional complexity of cancer. Simple solutions are needed, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 731–738.
- Sverdlov, E. D. (2014) Systems biology and personalized medicine: to be or not to be? *Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova*, **100**, 505–541.
- Granger, A., Mott, R., and Emambokus, N. (2016) Is aging as inevitable as death and taxes? *Cell Metab.*, **23**, 947–948.
- Vijg, J., and Le Bourg, E. (2017) Aging and the inevitable limit to human life span, *Gerontology*, **63**, 432–434.
- Le Bourg, E., and Vijg, J. (2017) The future of human longevity: time for a reality check, *Gerontology*, **63**, 527–528.
- Zbilut, J. P., and Giuliani, A. (2008) Biological uncertainty, *Theory Biosci.*, **127**, 223–227.
- Strippoli, P., Canaider, S., Noferini, F., D’Addabbo, P., Vitale, L., Facchin, F., Lenzi, L., Casadei, R., Carinci, P., Zannotti, M., and Frabetti, F. (2005) Uncertainty principle of genetic information in a living cell, *Theor. Biol. Med. Model.*, **2**, 40.
- Tannock, I.F., and Hickman, J.A. (2016) Limits to personalized cancer medicine, *N. Engl. J. Med.*, **375**, 1289–1294.
- Milholland, B., Dong, X., Zhang, L., Hao, X., Suh, Y., and Vijg, J. (2017) Differences between germline and somatic mutation rates in humans and mice, *Nat. Commun.*, **8**, 15183.
- Prindle, M.J., Fox, E.J., and Loeb, L.A. (2010) The mutator phenotype in cancer: molecular mechanisms and targeting strategies, *Curr. Drug Targets*, **11**, 1296–1303.
- Lynch, M. (2010) Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 961–968.
- Sverdlov, E.D., and Mineev, K. (2013) Mutation rate in stem cells: an underestimated barrier on the way to therapy, *Trends Mol. Med.*, **19**, 273–280.
- Narasimhan, V.M., Rahbari, R., Scally, A., Wuster, A., Mason, D., Xue, Y., Wright, J., Trembath, R.C., Maher, E.R., Heel, D.A.V., Auton, A., Hurler, M.E., Tyler-Smith, C., and Durbin, R. (2017) Estimating the human mutation rate from autozygous segments reveals population differences in human mutational processes, *Nat. Commun.*, **8**, 303.
- Hong, Y., Cervantes, R.B., Tichy, E., Tischfield, J.A., and Stambrook, P.J. (2007) Protecting genomic integrity in somatic cells and embryonic stem cells, *Mutat. Res.*, **614**, 48–55.
- Luo, L.Z., Gopalakrishna-Pillai, S., Nay, S.L., Park, S.W., Bates, S.E., Zeng, X., Iverson, L.E., and O’Connor, T.R. (2012) DNA repair in human pluripotent stem cells is distinct from that in non-pluripotent human cells, *PLoS One*, **7**, e30541.
- Rebuzzini, P., Pignalosa, D., Mazzini, G., Di Liberto, R., Coppola, A., Terranova, N., Magni, P., Redi, C.A., Zuccotti, M., and Garagna, S. (2012) Mouse embryonic stem cells that survive gamma-rays exposure maintain pluripotent differentiation potential and genome stability, *J. Cell. Physiol.*, **227**, 1242–1249.
- Li, L., and Neaves, W.B. (2006) Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters, *Cancer Res.*, **66**, 4553–4557.
- Plaks, V., Kong, N., and Werb, Z. (2015) The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*, **16**, 225–238.
- Ye, J., Wu, D., Wu, P., Chen, Z., and Huang, J. (2014) The cancer stem cell niche: cross talk between cancer stem cells and their microenvironment, *Tumour Biol.*, **35**, 3945–3951.
- Gasperowicz, M., and Natale, D.R. (2011) Establishing three blastocyst lineages – then what? *Biol. Reprod.*, **84**, 621–630.
- Lynch, M., Ackerman, M.S., Gout, J.F., Long, H., Sung, W., Thomas, W.K., and Foster, P.L. (2016) Genetic drift, selection and the evolution of the mutation rate, *Nat. Rev. Genet.*, **17**, 704–714.
- Otte, J., Wruck, W., and Adjaye, J. (2017) New insights into human primordial germ cells and early embryonic development from single-cell analysis, *FEBS Lett.*, **591**, 2226–2240.
- Chen, C., Qi, H., Shen, Y., Pickrell, J., and Przeworski, M. (2017) Contrasting determinants of mutation rates in germline and soma, *Genetics*, **207**, 255–267.
- Scally, A. (2016) The mutation rate in human evolution and demographic inference, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **41**, 36–43.
- Rahbari, R., Wuster, A., Lindsay, S.J., Hardwick, R.J., Alexandrov, L.B., Turki, S.A., Dominiczak, A., Morris, A., Porteous, D., Smith, B., Stratton, M.R., and Hurler, M.E. (2016) Timing, rates and spectra of human germline mutation, *Nat. Genet.*, **48**, 126–133.
- De Ligt, J., Veltman, J.A., and Vissers, L.E. (2013) Point mutations as a source of *de novo* genetic disease, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **23**, 257–263.
- Arnheim, N., and Calabrese, P. (2016) Germline stem cell competition, mutation hot spots, genetic disorders, and older fathers, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **17**, 219–243.
- Campbell, C.D., and Eichler, E.E. (2013) Properties and rates of germline mutations in humans, *Trends Genet.*, **29**, 575–584.
- Segurel, L., Wyman, M.J., and Przeworski, M. (2014) Determinants of mutation rate variation in the human germline, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **15**, 47–70.

34. Freed, D., Stevens, E.L., and Pevsner, J. (2014) Somatic mosaicism in the human genome, *Genes (Basel)*, **5**, 1064–1094.
35. Campbell, I.M., Shaw, C.A., Stankiewicz, P., and Lupski, J.R. (2015) Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics, *Trends Genet.*, **31**, 382–392.
36. Zhang, N., Zhao, S., Zhang, S.H., Chen, J., Lu, D., Shen, M., and Li, C. (2015) Intra-monozygotic twin pair discordance and longitudinal variation of whole-genome scale DNA methylation in adults, *PLoS One*, **10**, e0135022.
37. Baxter, A.G., and Hodgkin, P.D. (2015) No luck replicating the immune response in twins, *Genome Med.*, **7**, 29.
38. Greek, R., and Rice, M.J. (2013) Monozygotic twins: identical in name only, *Anesthesiology*, **118**, 230.
39. Van Dongen, J., Slagboom, P.E., Draisma, H.H., Martin, N.G., and Boomsma, D.I. (2012) The continuing value of twin studies in the omics era, *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 640–653.
40. McIntosh, H. (1996) 25 years ahead: will cancer be a «background-noise kind of disease»? *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**, 1794–1798.
41. DeGregori, J. (2017) Connecting cancer to its causes requires incorporation of effects on tissue microenvironments, *Cancer Res.*, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1207.
42. Tomasetti, C., and Vogelstein, B. (2015) Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions, *Science*, **347**, 78–81.
43. Alekseenko, I.V., Kuzmich, A.I., Pleshkan, V.V., Tyulkina, D.V., Zinovyeva, M.V., Kostina, M.B., and Sverdlov, E.D. (2016) The cause of cancer mutations: Improvable bad life or inevitable stochastic replication errors? *Mol. Biol. (Moscow)*, **50**, 906–921.
44. Tomasetti, C., Li, L., and Vogelstein, B. (2017) Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention, *Science*, **355**, 1330–1334.
45. Waddell, N., Pajic, M., Patch, A.M., Chang, D.K., Kassahn, K.S., Bailey, P., Johns, A.L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., Quinn, M.C., Robertson, A.J., Fadlullah, M.Z., Bruxner, T.J., Christ, A.N., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourse, C., Nourbakhsh, E., Wani, S., Wilson, P.J., Markham, E., Cloonan, N., Anderson, M.J., Fink, J.L., Holmes, O., Kazakoff, S.H., Leonard, C., Newell, F., Poudel, B., Song, S., Taylor, D., Waddell, N., Wood, S., Xu, Q., Wu, J., Pinese, M., Cowley, M.J., Lee, H.C., Jones, M.D., Nagrial, A.M., Humphris, J., Chantrill, L.A., Chin, V., Steinmann, A.M., Mawson, A., Humphrey, E.S., Colvin, E.K., Chou, A., Scarlett, C.J., Pinho, A.V., Giry-Laterriere, M., Rooman, I., Samra, J.S., Kench, J.G., Pettitt, J.A., Merrett, N.D., Toon, C., Epari, K., Nguyen, N.Q., Barbour, A., Zeps, N., Jamieson, N.B., Graham, J.S., Niclou, S.P., Bjerkgvig, R., Grutzmann, R., Aust, D., Hruban, R.H., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C.A., Wolfgang, C.L., Morgan, R.A., Lawlor, R.T., Corbo, V., Bassi, C., Falconi, M., Zamboni, G., Tortora, G., Tempero, M.A.; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative; Gill, A.J., Eshleman, J.R., Pilarsky, C., Scarpa, A., Musgrove, E.A., Pearson, J.V., Biankin, A.V., and Grimmond, S.M. (2015) Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer, *Nature*, **518**, 495–501.
46. Swanton, C. (2015) Cancer evolution constrained by mutation order, *N. Engl. J. Med.*, **372**, 661–663.
47. Schlesner, M., and Eils, R. (2015) Hypermutation takes the driver's seat, *Genome Med.*, **7**, 31.
48. Salk, J.J., Fox, E.J., and Loeb, L.A. (2010) Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences, *Annu. Rev. Pathol.*, **5**, 51–75.
49. Gatenby, R., Gillies, R., and Brown, J. (2010) The evolutionary dynamics of cancer prevention, *Nat. Rev. Cancer*, **10**, 526–527.
50. Sverdlov, E.D. (2011) Genetic surgery – a right strategy to attack cancer, *Curr. Gene Ther.*, **11**, 501–531.
51. McAloose, D., and Newton, A.L. (2009) Wildlife cancer: a conservation perspective, *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 517–526.
52. Greaves, M. (2007) Darwinian medicine: a case for cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 213–221.
53. Greaves, M. (2015) Evolutionary determinants of cancer, *Cancer Discov.*, **5**, 806–820.
54. Aktipis, C.A., Boddy, A.M., Jansen, G., Hibner, U., Hochberg, M.E., Maley, C.C., and Wilkinson, G.S. (2015) Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **370**, 1673.
55. Breivik, J. (2016) Reframing the “Cancer Moonshot”: how experts and non-experts interpret the problem of cancer, *EMBO Rep.*, **17**, 1685–1687.
56. DeGregori, J. (2011) Evolved tumor suppression: why are we so good at not getting cancer? *Cancer Res.*, **71**, 3739–3744.
57. Chalmers, Z.R., Connelly, C.F., Fabrizio, D., Gay, L., Ali, S.M., Ennis, R., Schrock, A., Campbell, B., Shlien, A., Chmielecki, J., Huang, F., He, Y., Sun, J., Tabori, U., Kennedy, M., Lieber, D.S., Roels, S., White, J., Otto, G.A., Ross, J.S., Garraway, L., Miller, V.A., Stephens, P.J., and Frampton, G.M. (2017) Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden, *Genome Med.*, **9**, 34.
58. Wood, L.D., Parsons, D.W., Jones, S., Lin, J., Sjoblom, T., Leary, R.J., Shen, D., Boca, S.M., Barber, T., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Dezso, Z., Ustyanksky, V., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Karchin, R., Wilson, P.A., Kaminker, J.S., Zhang, Z., Croshaw, R., Willis, J., Dawson, D., Shipitsin, M., Willson, J.K., Sukumar, S., Polyak, K., Park, B.H., Pethiyagoda, C.L., Pant, P.V., Ballinger, D.G., Sparks, A.B., Hartigan, J., Smith, D.R., Suh, E., Papadopoulos, N., Buckhaults, P., Markowitz, S.D., Parmigiani, G., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., and Vogelstein, B. (2007) The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers, *Science*, **318**, 1108–1113.
59. Easwaran, H., Tsai, H.C., and Baylin, S.B. (2014) Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance, *Mol. Cell*, **54**, 716–727.
60. Pribluda, A., De la Cruz, C.C., and Jackson, E.L. (2015) Intratumoral heterogeneity: from diversity comes resistance, *Clin. Cancer Res.*, **21**, 2916–2923.
61. Kaiser, J. (2009) Cancer research. Looking for a target on every tumor, *Science*, **326**, 218–220.
62. Mallick, P. (2015) in *Cancer as a Multi-Scale Complex Adaptive System Physical Sciences and Engineering Advances in Life Sciences and Oncology* (Janmey, P., Fletcher, D., Gerecht, S., Levine, R., Mallick, P., McCarty, O., Munn, L., and Reinhart-King, C., eds) Springer International Publishing, pp. 5–29.
63. Rickles, D., Hawe, P., and Shiell, A. (2007) A simple guide to chaos and complexity, *J. Epid. Com. Health*, **61**, 933–937.
64. Suki, B., Bates, J.H., and Frey, U. (2011) Complexity and emergent phenomena, *Compr. Physiol.*, **1**, 995–1029.
65. Noble, D. (2013) A biological relativity view of the relationships between genomes and phenotypes, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **111**, 59–65.
66. Korn, R. (2005) The emergence principle in biological hierarchies, *Biol. Phil.*, **20**, 137–151.
67. Van Regenmortel, M.H. (2004) Reductionism and complexity in molecular biology. Scientists now have the tools to unravel biological and overcome the limitations of reductionism, *EMBO Rep.*, **5**, 1016–1020.
68. Greek, R., and Hansen, L.A. (2013) Questions regarding the predictive value of one evolved complex adaptive system for a second: exemplified by the SOD1 mouse, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **113**, 231–253.
69. Janson, N. (2012) Non-linear dynamics of biological systems, *Contemporary Physics*, **53**, 137–168.

70. Greek, R., and Menache, A. (2013) Systematic reviews of animal models: methodology versus epistemology, *Int. J. Med. Sci.*, **10**, 206–221.
71. Merlo, L.M., Pepper, J.W., Reid, B.J., and Maley, C.C. (2006) Cancer as an evolutionary and ecological process, *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 924–935.
72. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646–674.
73. Bissell, M.J., and Hines, W.C. (2011) Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression, *Nat. Med.*, **17**, 320–329.
74. Bordon, Y. (2015) Immunotherapy: checkpoint parley, *Nat. Rev. Cancer*, **15**, 3.
75. Smyth, M.J., Ngiew, S.F., Ribas, A., and Teng, M.W. (2016) Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **13**, 143–158.
76. Park, J., Kwon, M., and Shin, E.C. (2016) Immune checkpoint inhibitors for cancer treatment, *Arch. Pharm. Res.*, **39**, 1577–1587.
77. Postow, M.A., Callahan, M.K., and Wolchok, J.D. (2015) Immune checkpoint blockade in cancer therapy, *J. Clin. Oncol.*, **33**, 1974–1982.
78. Diesendruck, Y., and Benhar, I. (2017) Novel immune check point inhibiting antibodies in cancer therapy—opportunities and challenges, *Drug Resist. Updat.*, **30**, 39–47.
79. Vreeland, T., Clifton, G., Herbert, G., Hale, D., Jackson, D., Berry, J., and Peoples, G. (2016) Gaining ground on a cure through synergy: combining checkpoint inhibitors with cancer vaccines, *Exp. Rev. Clin. Immunol.*, **12**, 1347–1357.
80. Calabrese, L., and Velcheti, V. (2017) Checkpoint immunotherapy: good for cancer therapy, bad for rheumatic diseases, *Ann. Rheum. Dis.*, **76**, 1–3.
81. Postow, M., and Wolchok, J. (2016) Toxicities associated with checkpoint inhibitor immunotherapy, Wolters Kluwer.
82. Consortium, E. P. (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome, *Nature*, **489**, 57–74.
83. Alberts, B. (2012) The end of «small science»? *Science*, **337**, 1583.
84. Evans, J.P., Meslin, E.M., Marteau, T.M., and Caulfield, T. (2011) Genomics. Deflating the genomic bubble, *Science*, **331**, 861–862.
85. Graur, D. (2016) Rubbish DNA: the functionless fraction of the human genome, arXiv:1601.06047v1 [q-bio.GN].
86. Graur, D., Zheng, Y., and Azevedo, R.B. (2015) An evolutionary classification of genomic function, *Genome Biol. Evol.*, **7**, 642–645.
87. Doolittle, W.F., Brunet, T.D., Linquist, S., and Gregory, T.R. (2014) Distinguishing between «function» and «effect» in genome biology, *Genome Biol. Evol.*, **6**, 1234–1237.
88. Graur, D., Zheng, Y., Price, N., Azevedo, R.B., Zufall, R.A., and Elhaik, E. (2013) On the immortality of television sets: «function» in the human genome according to the evolution-free gospel of ENCODE, *Genome Biol. Evol.*, **5**, 578–590.
89. Graur, D. (2017) An upper limit on the functional fraction of the human genome, *Genome Biol. Evol.*, **9**, 1880–1885.
90. Brunet, T.D., and Doolittle, W.F. (2014) Getting «function» right, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E3365.
91. Nei, M. (2005) Selectionism and neutralism in molecular evolution, *Mol. Biol. Evol.*, **22**, 2318–2342.
92. Rands, C.M., Meader, S., Ponting, C.P., and Lunter, G. (2014) 8,2% of the human genome is constrained: variation in rates of turnover across functional element classes in the human lineage, *PLoS Genet.*, **10**, e1004525.
93. Brenner, S. (2010) Sequences and consequences, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **365**, 207–212.
94. Сverdlov E. (2006) Биологический редукционизм уходит? Что дальше? *Вестн. Рос. Акад. Наук*, **76**, 707–721.
95. Blanco-Gomez, A., Castillo-Lluva, S., Del Mar Saez-Freire, M., Hontecillas-Prieto, L., Mao, J.H., Castellanos-Martin, A., and Perez-Losada, J. (2016) Missing heritability of complex diseases: enlightenment by genetic variants from intermediate phenotypes, *Bioessays*, **38**, 664–673.
96. Gottesman, I., and McGue, M. (2015) Endophenotypes, JohnWiley & Sons, Inc.
97. Te Pas, M.F., Madsen, O., Calus, M.P., and Smits, M.A. (2017) The importance of endophenotypes to evaluate the relationship between genotype and external Phenotype, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, E472.

## UNSOLVABLE PROBLEMS OF BIOLOGY: IT IS IMPOSSIBLE TO CREATE TWO IDENTICAL ORGANISMS, TO DEFEAT CANCER, AND TO MAP ORGANISMS ONTO THEIR GENOMES

E. D. Sverdlov

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia; E-mail: edsverd@gmail.com*

Revision received November 12, 2017

This review points to the existence of three categories of unsolvable biological problems: 1) Unsolvable problems due to stochastic mutations during DNA replication that result in the impossibility of creating two identical organisms or even two identical complex cells (Sverdlov, E. D., *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 939-944) and to the inability to «defeat» cancer; 2) Problems that cannot be resolved due to multiple interactions in complex systems that lead to unpredictable «emergent» properties that make it impossible to establish unambiguous relationships between the genetic architecture of the genome and its phenotypic manifestation, and to predict with certainty the response of the organism, its parts, or pathological processes to the external impact; 3) Problems that cannot be solved because of the uncertainty principle and observer effect in biology, due to which it is impossible to obtain adequate information about the cells in their tissue microenvironment by isolating and analyzing single cells. In particular, it is impossible to draw conclusions on the properties of stem cells in their niches through the properties of stem cell cultures. A strategy is proposed for constructing the pattern most closely approximated to the relationship of genotypes to their phenotypes by designing networks of intermediate phenotypes (endophenotypes).

**Keywords:** stochastic mutations, emerging properties, heterogeneity, biological uncertainty principle, phenotype, genotype, selected function