

УДК 575.85(075.8)

ББК 28.02я73

Ч-65

Рецензенты:

кафедра биологии Белорусского государственного медицинского университета (зав. кафедрой — кандидат медицинских наук, доцент *В.Э. Бутвиловский*);

зав. кафедрой биохимии биологического факультета Белорусского государственного университета, кандидат биологических наук, доцент *И. В. Семак*

**Чиркин, А.А.**

Ч-65 Биохимия филогенеза и онтогенеза : учеб. пособие / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко, С.Б. Бокуть. ; под общ. ред. проф. А.А. Чиркина. — Минск : Новое знание ; М. : ИНФРА-М, 2012. — 288 с., [4 л.] ил. : ил. — (Высшее образование).

ISBN 978-985-475-506-9 (Новое знание)

ISBN 978-5-16-006024-8 (ИНФРА-М)

В краткой форме впервые суммированы данные по теории и методам эволюционной биохимии, биохимии и молекулярной биологии филогенеза и онтогенеза, обсуждены биохимические вопросы эмбриогенеза, описаны возрастные особенности обмена веществ и его регуляции, представлены современные взгляды на механизмы старения. Практическое значение имеют приведенные данные о наследуемых патологиях и онтогенетической направленности биохимических исследований крови.

Для студентов, магистрантов и аспирантов биологических и медицинских специальностей. Может использоваться в практической деятельности биологами и биохимиками.

УДК 575.85(075.8)

ББК 28.02я73

ISBN 978-985-475-506-9 (Новое знание)

ISBN 978-5-16-006024-8 (ИНФРА-М)

© Чиркин А.А., Данченко Е.О.,  
Бокуть С.Б., 2012

© ООО «Новое знание», 2012

# **ВВЕДЕНИЕ**

**Фундаментальные представления о единстве органического мира формировались на основе достижений биофизики, биохимии, молекулярной биологии, клеточной теории, законов наследственности. Теория эволюции доказала, что живое на планете представляет собой единое целое в историческом плане. Она объяснила единство мира живых существ общностью их происхождения — живые формы связаны друг с другом генетическим родством, степень которого для представителей разных групп различается. Конкретное выражение это родство нашло в преемственности в ряду поколений живых организмов молекулярных, клеточных и системных механизмов развития и жизнеобеспечения, которые в сочетании с изменчивостью обеспечивали возникновение более высоких уровней биологической организации и адаптации.**

**При изучении основ биологии развития следует учитывать два основных процесса — филогенез и онтогенез. Онтогенез — индивидуальное развитие организма, а филогенез — историческое развитие систематической группы организмов. Понятия онтогенеза и филогенеза неразрывно связаны между собой: с точки зрения эволюционной теории историческое развитие живой природы представляет собой череду онтогенезов.**

**В данном учебном пособии сделана одна из первых попыток описания молекулярно-биохимических закономерностей филогенеза и онтогенеза.**

**Пособие состоит из восьми глав. Глава 1 содержит вводные понятия, необходимые для восприятия материала. В главе 2 рассмотрены биохимические подходы к исследованию эволюции. Здесь особое внимание обращено на исследования отечественных ученых. В главе 3 описаны темы биохимии прокариот и эукариот. В главе 4 представлены данные о филогенетической роли металлсодержащих белков, в частности гемоглобинов. Главы 5 и 6 посвящены изложению общих вопросов онтогенеза, в частности, молекулярно-генетических основ эмбрионального развития. Рассмотрению дифференциальной активности генов как основы дифференцировки посвящена**

глава 7. Обобщение биохимических характеристик организма человека от рождения до смерти выполнено в главе 8.

Учитывая адресность пособия, авторы сознательно использовали прием повторного изложения наиболее важных фактов в разных главах книги.

Очевидно, что в пособии небольшого объема нельзя изложить основы биохимии упомянутых фундаментальных процессов. Поэтому авторы надеются на то, что приведенные материалы дадут его пользователям импульс к поиску новых материалов по данной проблеме, их анализу и применению в практической деятельности. Все замечания и конструктивные предложения авторы примут с благодарностью.

## Глава 1.

# ВВЕДЕНИЕ В БИОХИМИЮ ФИЛОГЕНЕЗА И ОНТОГЕНЕЗА

В биосфере преобладают формы, достигшие в процессе эволюции относительно низких степеней морфофизиологического развития. Масса живого вещества составляет 0,01–0,02 % от массы всего вещества биосферы, однако она играет ведущую роль в биогеохимических процессах благодаря совершающемуся в живых организмах обмену веществ. Живые организмы черпают субстраты и энергию для обмена веществ из окружающей среды и выделяют в нее продукты жизнедеятельности и вещества собственного распада. Ежегодная продукция живого вещества в биосфере составляет 232,5 млрд т сухого органического вещества. За это же время в масштабе планеты в процессе фотосинтеза синтезируется 46 млрд т органических углеродсодержащих веществ. Для этого требуется, чтобы  $170 \cdot 10^9$  т  $\text{CO}_2$  прореагировало с  $68 \cdot 10^9$  т  $\text{H}_2\text{O}$ . Таким образом, в результате фотосинтеза ежегодно образуется  $115 \cdot 10^9$  т сухого органического вещества и  $123 \cdot 10^9$  т  $\text{O}_2$ . В течение года в процессы, сопряженные с фотосинтезом, вовлекаются также  $6 \cdot 10^9$  т азота,  $2 \cdot 10^9$  т фосфора и другие элементы, например калий, кальций, сера, железо. Цифры показывают, что живое вещество является наиболее активным компонентом биосферы [15].

## 1.1. Признаки живой материи и происхождение жизни

Выделяют следующие основные *признаки живой материи* (биосистем) [13]:

- Способность к метаболизму, т. е. обмену веществом и энергией с окружающей средой. Живые системы (*биосистемы*) — это открытые системы.
- Сложность, высокий уровень структурной организации и упорядоченности (*биосистем*) живой материи. Единицей био-

логической активности организма считается *клетка*: молекулы → мембраны, субклеточные органеллы → клетки → ткани → органы → организм.

- **Изменчивость** — способность к самостоятельному реагированию на воздействие окружающей среды изменением своего химического состава и функционирования.

- **Способность к точному воспроизведению** за счет передачи наследственной информации.

## 1.2. Возникновение жизни на Земле

Известны три основных подхода к решению проблемы происхождения жизни на Земле [13]:

1. **Идея панспермии** объединяет две гипотезы происхождения жизни — гипотезу этернизма (стационарного состояния) В. Прейра (1880) и гипотезу панспермии Г. Рихтера (1865). Согласно этой идее, жизнь, представляя собой явление космического масштаба, столь же вечна и повсеместна во Вселенной, как и материя (Г. Гельмгольц, С. Аррениус, В.И. Вернадский, У. Томпсон). Появление ее на Земле объясняется проникновением на планету зародышей, постоянно путешествующих в космическом пространстве.

2. **Идея абиогенеза** (Э. Геккель) связывает проблему происхождения жизни на Земле с решением задачи образования сложных органических макромолекул (белков, нуклеиновых кислот) из простых в отсутствие живых существ. В XX в. была доказана принципиальная возможность абиогенного синтеза довольно сложной биоорганики (С. Миллер, С. Фокс), в эксперименте созданы модели протобионтов (коацерваты А.И. Опарина и Д. Холдейна, микросферы С. Фокса).

Для пребиотической фазы (часто называемой химической стадией эволюции) развития жизни на Земле наиболее привлекательной кажется теория, объясняющая возникновение молекул органических веществ. Атмосфера обладала редуцирующими свойствами, так как содержала метан ( $\text{CH}_4$ ), аммиак ( $\text{NH}_3$ ), воду ( $\text{H}_2\text{O}$ ) и водород ( $\text{H}_2$ ) и подвергалась действию

солнечной радиации и электрических разрядов. В 50-х гг. прошлого века С. Миллер и Г. Ури воспроизвели в лаборатории условия пребиотической атмосферы и получили смесь органических веществ, включая аминокислоты. Синильная кислота и другие молекулы первичного раствора органических соединений могли построить молекулу аденина, а с участием формальдегида могли образоваться молекулы рибозы. Рибоза образовывалась в виде смеси хиральных форм (рацемат). Однако при последующем отборе молекул в состав рибонуклеиновых кислот (РНК) вошел лишь один изомер — D-рибоза, а затем из нее образовалась D-дезоксирибоза. Введение дезоксирибозы в состав дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) существенно повысило сохранность генетической информации.

По мнению ряда ученых оба подхода малопродуктивны. Непонятно, почему полипептиды строятся исключительно из левовращающихся оптических изомеров аминокислот, а молекулы нуклеиновых кислот содержат только правовращающиеся изомеры сахаров (*феномен хиральной чистоты*), тогда как полученные абиогенным путем из метеоритного вещества аминокислоты или полипептиды представлены смесью из примерно равного количества обоих оптических изомеров.

3. Теория *самоорганизующихся систем*, созданная с учетом неравновесной термодинамики И. Пригожина, отличительной особенностью которой является способность корректировать свое поведение (т. е. эволюционировать) на основе предшествующего опыта, в том числе путем создания новой информации, осознания принадлежности живых объектов к названной категории систем. Принципиальной с точки зрения существования и динамики самоорганизующихся систем представляется возможность образования упорядоченных (высокоинформатизированных) макромолекул из неупорядоченной массы вещества-предшественника с использованием механизмов матричного синтеза и естественного отбора. Эволюционное поведение, базирующееся на самовоспроизведении (самокопирование — тиражирование информации) с «информационным шумом» (случайные искажения информации — мутации) и

управляемое естественным отбором (выбор из случайного набора вариантов), обеспечивает появление в системе новой информации и, как следствие, реальность прогрессивного роста степени сложности.

### 1.2.1. Узловые моменты развития жизни

В происхождении и развитии жизни на Земле условно можно выделить семь основных периодов [15]:

1. Предполагается, что при возрасте планеты 4,5–4,6 млрд лет пригодные для жизни водоемы появились 4,0–3,8 млрд лет тому назад. В этот период в абиогенных условиях функционируют отбирающиеся, самосохраняющиеся и изменяющиеся в сторону увеличения сложности организации системы *гиперциклы* (по М. Эйгену). Другими словами, этот период олицетворяет физико-химический по своей сути этап эволюции самореплицирующихся систем как основу предстоящей эволюции биологической. Для таких систем реальны автокатализ (самовоспроизведение), закономерные взаимопереходы высоко- и низкоэнергетических соединений (круговороты энергии и вещества), возможность усложнения структуры на основе вновь создаваемой информации (репродукция на фоне «информационного шума»), конкуренция за субстраты (норма отношений со средой), естественный отбор устойчивых и эффективных систем, объединение и коэволюция их с другими системами (принцип экосистемы) с конечной «целью» — созданием физико-химических условий для возникновения живой материи. На основании этих процессов могли сложиться основные атрибуты жизни — самовоспроизведение, самоорганизация, наследственность, случайная (мутационная) изменчивость, естественный отбор.

2. Появление *прокариот* 3,5–3,1 млрд лет тому назад знаменует оформление жизни как проявление биосферы. В этот период возникают хемо- и фотоавтотрофы, гетеротрофы, детритофаги. Происходит стабилизация интенсивности мутационного процесса на уровне  $10^{-5}$ – $10^{-7}$  мутаций на 1 локус ДНК за поколение. Такой уровень сохраняется и сегодня для всех, от кишечной палочки до человека. Благодаря чрезвычайной точ-

ности при репликации генома человека, включающего  $3 \cdot 10^9$  нуклеотидных пар, возможны примерно 3 информационных искажения (мутации) на реплицирующий геном. В это же время формируются системы репаративного синтеза ДНК и системы формирования нативной структуры белков и выбраковки молекул с неправильной трехмерной структурой с помощью белков теплового шока (шаперонов) и протеолиза убиквитин-меченых аномальных белков.

3. В интервале 1,9–1,7 млрд лет тому назад концентрация кислорода в атмосфере Земли превысила 1 % (*точка Пастера*), что позволило развивать механизмы аэробного окисления субстратов — источников энергии и тем самым поднять биоэнергетику живых организмов на качественно новый уровень. В это время развитие специализированных органелл — митохондрий — для реализации связанных с кислородом механизмов энергообеспечения функций клеток привело также к образованию вредных для мембран и макромолекул свободно-радикальных продуктов. Поэтому эволюция в дальнейшем привела к формированию методов неферментативной и ферментативной антиоксидантной защиты.

4. Интервал 2,0–1,5 млрд лет тому назад — время становления эукариотических организмов. Произошло количественное и качественное увеличение возможности накопления информации в ДНК ядер клеток: если геном прокариот содержит в среднем  $10^5$ – $10^6$  пар нуклеотидов, то у одноклеточных эукариот дрожжей  $10^7$  пар нуклеотидов, а у млекопитающих и птиц —  $10^8$ – $10^9$  пар нуклеотидов.

5. В интервале 600–540 млн лет тому назад появляются многоклеточные организмы. Развиваются механизмы, контролирующие *частичное* использование информации ДНК: а) ДНК в ядрах клеток упаковывается в виде хромосом; б) возникают диплоидные формы жизни; в) в различных клетках одного и того же организма при наличии в них одной и той же ДНК за счет функционирования разных участков ДНК (2–10 % от всей ДНК) обеспечиваются дифференцировка тканей и специализация функций. Это период оптимизации соотношений биоэнергетики организмов и их размеров, формирования



межклеточных и межтканевых способов нервной и гуморальной регуляции.

6. В период 495–445 млн лет тому назад эволюционно формируются группы позвоночных, для которых на первое место выходят проблемы видоспецифичности, что и приводит к появлению системы иммунитета для контроля клеточного и белкового состава организмов.

7. В протерозойскую эру появились первые сухопутные животные — паукообразные. Позже при массовом появлении сухопутных животных (354–290 млн лет тому назад) и млекопитающих (250–200 млн лет тому назад) произошла стабилизация удельного потребления энергии — 800 000 кДж/г живой массы/жизнь. По названному параметру среди млекопитающих человек является исключением — для него эта норма в 4 раза выше.

### 1.2.2. Количественная характеристика биоразнообразия

В настоящее время описано около 300 тыс. видов растений и более 1,5 млн видов животных. Из этого количества 93 % представлено сухопутными, а 7 % — водными видами животных. Суммарная биомасса организмов сухопутных видов образована на 99,2 % зелеными растениями ( $2,4 \cdot 10^{12}$  т) и на 0,8 % — животными и микроорганизмами ( $0,2 \cdot 10^{11}$  т). В океане, напротив, на долю растений приходится 6,3 % ( $0,2 \cdot 10^9$  т), а на долю животных и микроорганизмов — 93,7 % ( $0,3 \cdot 10^{10}$  т) совокупной биомассы. Несмотря на то что океан покрывает немногим более 70 % поверхности планеты, в нем содержится лишь 0,13 % биомассы живых существ, обитающих на Земле. Расчеты показывают, что растения составляют около 21 % всех учтенных видов. Однако на их долю приходится более 99 % биомассы, тогда как вклад животных в биомассу планеты (79 % видов) составляет менее 1 %. Среди животных 96 % видов — это беспозвоночные и только 4 % — позвоночные, среди которых млекопитающие составляют примерно 10 % [15].

Однозначного соответствия между уровнем морфофизиологической организации количества ДНК и представителями

разных классов многоклеточных животных не установлено. Тем не менее для появления процветающего класса насекомых понадобилось, чтобы общая длина молекулы ДНК в геноме превысила  $10^8$  пар нуклеотидов, предшественников хордовых —  $4 \cdot 10^8$ , амфибий —  $8 \cdot 10^8$ , рептилий —  $10^9$ , млекопитающих —  $2 \cdot 10^9$  пар нуклеотидов (рис. 1.1).



Рис. 1.1. Изменение объема уникальных нуклеотидных последовательностей в геномах в ходе прогрессивной эволюции [15]

Знакомство с составом обитателей планеты на любом из этапов развития жизни свидетельствует о его разнообразии, сосуществовании в одни и те же периоды организмов, различающихся как по общему плану строения тела, так и по времени появления в процессе эволюции. Начало современной систематики живых организмов положил труд К. Линнея «Система природы». Он разделил всех животных на шесть классов: звери, птицы, гады, рыбы, насекомые и черви, а все растения — на несколько классов по способу размножения. К середине XIX в. некоторые ученые (например, Э. Геккель) наравне с животными и растениями стали выделять новое царство протистов, в которое вошли бактерии, водоросли, грибы и одноклеточные животные. В 1969 г. Р. Уиттекером была предложена система пяти царств, кажущаяся наиболее обоснованной в настоящее время. Прокариоты объединены в одно царство Monera. При-

митивные эукариоты, не имеющие тканевой дифференциации (простейшие, водоросли, слизевики), — в царство Protista. Царство Plantae составили мхи, папоротники, семенные растения, царство Fungi — все высшие классы грибов, царство Animalia — все многоклеточные животные (рис. 1.2).

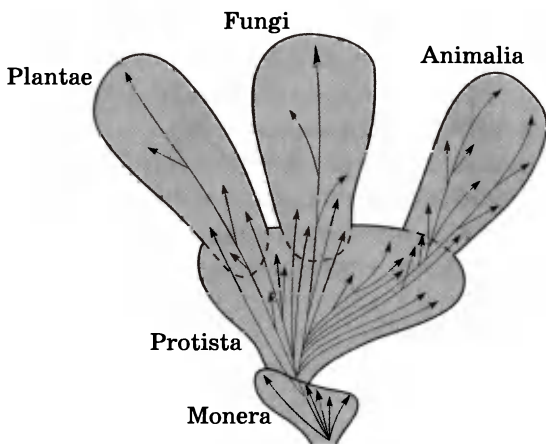


Рис. 1.2. Система пяти царств по Уиттекеру

Согласно В. Н. Ярыгину (2002), в основе эволюции лежит *приспособительное свойство* живых форм. *Адаптация* — это структурная, функциональная или поведенческая особенность живой системы, повышающая ее шансы на успех в соответствующем местообитании. Выделяют четыре типа адаптаций, различающихся по уровню реализации и обеспечиваемому результату. Поведенческие адаптации реализуются на уровне целостного организма и обуславливают выживание в определенной среде и использование ее ресурсов; анатомические адаптации реализуются на уровне структур и обеспечивают заданный образ жизни; физиологические адаптации реализуются на уровне жизненных функций, приводя организм в соответствие с условиями среды обитания; биохимические адаптации реализуются на уровне метаболических функций, гарантируя реальность аналогичных функциональных отправлений в различающихся условиях среды.

## 1.3. Метаболизм и живая материя

*Метаболизм* (греч. *metabole* — изменение, превращение) — это совокупность процессов превращения веществ и энергии в организме, происходящих с участием ферментов. В наиболее широко употребляемом значении термин «метаболизм» равнозначен термину «обмен веществ». В точном смысле «метаболизм» означает промежуточный обмен, т. е. превращение веществ внутри клеток с момента их поступления до образования конечных продуктов. Вещества, участвующие в метаболизме, называются *метаболитами*.

### 1.3.1. Функции метаболизма

Метаболизм выполняет следующие функции [13]:

1. Обеспечение организма энергией, полученной при расщеплении богатых энергией пищевых веществ или преобразовании энергии солнца.

2. Превращение пищевых молекул в *предшественники*, которые используются в клетке для биосинтеза собственных макромолекул.

3. Сборка *макромолекулярных* (биополимеры) и *надмолекулярных структур* живого организма, т. е. пластическое и энергетическое поддержание его структуры. На важность свойства структурированности указывает следующий пример. Тело микоплазмы (микроорганизма, занимающего по размерам промежуточное положение между вирусами и типичными бактериями) превосходит по диаметру атом водорода всего в 1000 раз. Даже в таком малом объеме осуществляется примерно 100 биохимических реакций, необходимых для жизнедеятельности этого организма. Для сравнения: жизнедеятельность клетки человека требует согласованного протекания более 10 000 реакций.

4. Синтез и разрушение биомолекул, выполняющих специфические функции в организме (мембранные липиды, внутриклеточные посредники и пигменты).

Основные типы химических реакций в метаболизме представлены в табл. 1.1. Эти реакции носят ферментативный ха-

рактер, поэтому классификация типов химических реакций совпадает с классификацией ферментов.

Таблица 1.1

### Типы химических реакций в метаболизме

Тип реакции	Описание
Окисление — восстановление	Перенос электронов
Присоединение с использованием энергии гидролиза аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ)	Образование ковалентных связей (например, «углерод — углерод»)
Изомеризация	Изменения расположения атомов, ведущие к образованию изомеров
Перенос групп	Перенос функциональных групп от молекулы к молекуле
Гидролиз связей	Разрыв связей в присутствии воды
Добавление или удаление функциональных групп	Присоединение функциональных групп к двойным связям и удаление функциональных групп с образованием двойных связей

Ферментативная цепь химических реакций называется *метаболическим путем*. Метаболические пути связаны друг с другом общими метаболитами и образуют единую сетку реакций — *карту метаболизма*. В метаболическом пути продукты одной реакции становятся субстратом для следующей реакции. Большую роль в ферментативных реакциях метаболизма играют переносчики (табл. 1.2).

Некоторые метаболические пути являются *линейными*, некоторые *разветвленными*, позволяющими получать несколько конечных продуктов из одного предшественника или превращать несколько исходных веществ в один продукт. Существуют *циклические* метаболические пути, в результате которых одно из веществ, вступающих в метаболический путь, регенерирует в серии последовательных реакций, которые превращают другое вещество, вступающее в метаболический путь, в конечный продукт.

Таблица 1.2

## Активные переносчики в метаболизме

Переносчик в активной форме	Переносимая группа	Витамин-предшественник
АТФ	Фосфорильная группа	—
Никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и никотинамидадениндинуклеотид фосфат (НАДФН)	Электроны	Ниацин
Флавиномононуклеотид (ФМНН <sub>2</sub> ) и флавинадениндинуклеотид (ФАДН <sub>2</sub> )	Электроны	Витамин В <sub>2</sub>
Кофермент А (КоА)	Ацильные остатки	Пантотеновая кислота
Липоевая кислота	Ацильные остатки	—
Тиаминпирофосфат	Альдегидная группа	Тиамин
Биотин	СО <sub>2</sub>	Витамин Н
Тетрагидрофолиевая кислота	Одноуглеродные группы	Фолиевая кислота
S-аденозилметионин	Метильная группа	—
Уридиндифосфат-глюкоза (УДФ-глюкоза)	Глюкоза	—
Цитидиндифосфатдиацилглицерол	Фосфатидная кислота	—
Нуклеозидтрифосфаты	Нуклеотиды	—

Метаболический ответ организма — совокупность его биохимических реакций, скорости и направленности их протекания при воздействии какого-либо фактора.

По форме усвояемого углерода все живые организмы делятся на две основные группы:

1. *Автотрофные* (сами себя питающие) — их клетки усваивают СО<sub>2</sub> воздуха в процессе фотосинтеза и из него строят все свои органические вещества. Сюда относятся фотосинтезирующие бактерии, зеленые растения.

2. *Гетеротрофные* (питающиеся за счет других) — их клетки получают углерод из сложных органических соедине-

ний (клетки высших животных и большинства микроорганизмов), т. е. они питаются продуктами жизнедеятельности других клеток.

Выделяют также миксотрофные организмы (цианобактерии, эвглена).

В биосфере автотрофы и гетеротрофы являются участниками кругооборота углерода и кислорода между животным и растительным мирами: автотрофы используют атмосферный  $\text{CO}_2$  для синтеза органических молекул, и многие из них выделяют кислород из воды в результате этого процесса; гетеротрофы используют побочный продукт фотосинтеза  $\text{O}_2$  для утилизации органических соединений, образуемых автотрофами в качестве источника питания, выделяют в атмосферу  $\text{CO}_2$ , а  $\text{O}_2$  превращают в воду.

Все живые организмы нуждаются в азоте, который используется для синтеза аминокислот, нуклеотидов и других веществ. Для растений источником азота служат аммиак или растворимые нитраты, позвоночные получают азот в форме аминокислот или других органических компонентов. Только некоторые организмы — симбионтные бактерии рода *Rhizobium* азотфиксирующих клубеньков бобовых растений и цианобактерии — способны фиксировать атмосферный азот и образовывать мочевины. Некоторые бактерии (нитрифицирующие бактерии) окисляют аммиак до нитритов и нитратов или превращают нитраты в  $\text{N}_2$ . Таким образом, кругооборот углерода, кислорода и азота, в который вовлечены все живые организмы, зависит от баланса между активностью продуцента (автотрофы) и потребителя (гетеротрофы) в биосфере.

По отношению к кислороду гетеротрофы делятся:

- на *аэробы* — требуют наличия кислорода для окисления веществ;
- *анаэробы* — для окисления питательных веществ кислород не требуется;
- *факультативные анаэробы* — существуют в кислородной и бескислородной среде;
- *облигатные анаэробы* — живут только в бескислородной среде.

Большинство гетеротрофов — факультативные анаэробы, которые при наличии кислорода используют аэробные метаболические пути.

Итак, живые организмы существуют в рамках биогеоценоза, в котором выделяют биотоп и биоценоз.

В состав *биотопа* помимо абиотических неорганических и органических веществ среды входят эдафотоп (участок суши, почвенно-грунтовые условия), климатоп (комплекс климатических факторов (температура, влажность, освещенность и др.) и гидротоп (поверхностные и почвенные воды).

Согласно В.Н. Ярыгину [15], *биоценоз* содержит следующие обязательные компоненты (рис. 1.3):

- автотрофные организмы — продуценты биотических органических веществ;
- гетеротрофные организмы (консументы) — потребители готовых органических веществ первого (растительоядные животные) и следующих (плотоядные животные) порядков;
- детритоядные организмы — редуценты-разрушители, разлагающие органическое вещество.

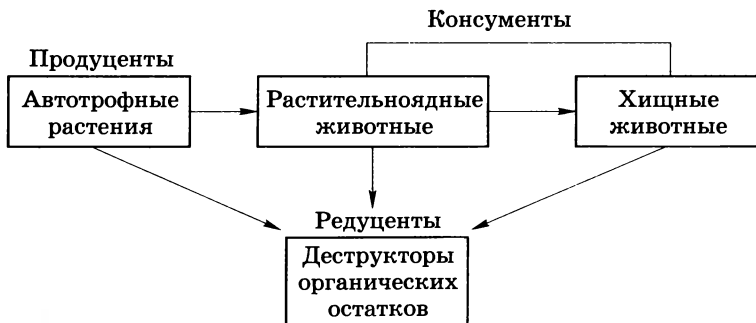


Рис. 1.3. Живые организмы — компоненты биогеоценоза

Как через любую диссипативную (т. е. рассеивающую энергию) систему, через биогеоценоз протекает регулируемый поток энергии. Эта энергия затрачивается на обеспечение постоянного круговорота веществ, поддержание целостности системы и обеспечение ее эволюции. Энергия проходит через



серию трофических уровней, являющихся звеньями цепей питания. Первичным источником энергии служит солнечное излучение, энергия которого составляет  $4,6 \cdot 10^{26}$  Дж/с ( $1,1 \cdot 10^{26}$  кал/с). 1/2 000 000 этого количества энергии достигает поверхности Земли, при этом 1,0–2,0 % ассимилируются растениями, которые 30–70 % поглощенной энергии используют для обеспечения собственной жизнедеятельности и синтеза органических веществ.

Энергия, накопленная в растительной биомассе, составляет чистую первичную продукцию биогеоценоза. Фитобиомасса используется в качестве источника энергии и материала для создания биомассы потребителей первого порядка — растительноядных животных, а также следующих звеньев пищевой цепи. Количество энергии, расходуемой на поддержание собственной жизнедеятельности, в цепи трофических уровней растет, а продуктивность падает. Обычно продуктивность последующего трофического уровня составляет не более 5–20 % от продуктивности предыдущего. Это находит отражение в соотношении на планете биомасс растительного и животного происхождения. Так, суммарная биомасса организмов, обитающих на суше, составляет примерно  $3 \cdot 10^{12}$  т. Лишь 1–3 % от этого количества — зообиомасса. Масса животного вещества, приходящегося на людей, составляет около 0,0002 % от суммарной массы живого вещества планеты. Объем энергии, необходимый для обеспечения жизнедеятельности организма, растет с повышением уровня морфофункциональной организации. Соответственно количество биомассы, создаваемой на более высоких трофических уровнях, снижается. Например, в разных биогеоценозах 95,0–99,5 % зообиомассы приходится на беспозвоночных животных.

### 1.3.2. Регуляция метаболизма

Регуляция метаболизма [13] необходима по следующим причинам:

- регуляция каждого метаболического пути обеспечивает синтез веществ, требуемых для сохранения структуры и функции клеток, в оптимальных количествах;

- регуляция процессов образования энергии в клетке обеспечивает контроль количества поступающих питательных веществ, необходимых для ее выработки;
- в результате увеличения или уменьшения скорости специфических реакций клетка относительно быстро реагирует на изменение условий окружающей среды (температуру, рН, ионный состав, концентрацию питательных веществ).

Существуют следующие механизмы регуляции метаболизма:

1. Изменение активности ферментов — самый распространенный способ регуляции метаболизма. Регуляции подвержены ключевые ферменты, которые определяют скорость всего полиферментного процесса. Как правило, такие ферменты олигомерны и обладают кооперативностью. Иначе говоря, активность такого фермента зависит не только от количества, доступности и химического строения субстрата катализируемой реакции и физико-химических условий протекания ферментативной реакции в клетке (рН, температуры и др.), но и от наличия аллостерических эффекторов (активаторов, ингибиторов). Немалую роль играет структура фермента, которая зависит от ковалентной химической модификации, доступности кофакторов и др. Изменение активности ферментов играет принципиальную роль в регуляции метаболизма конечными продуктами (ретроингибирование) и реже первыми продуктами (форактивация).

2. Изменение количества фермента в клетке осуществляется в ходе его протеолитической деградации, а также индукции или репрессии генов. Ферменты, которые присутствуют в клетке в относительно постоянном количестве, называются *конститутивными*. Ферменты, количество которых резко изменяется в зависимости от метаболической ситуации, называются *адаптивными* или *индуцибельными*. Индуцибельные ферменты и их изоферменты чувствительны к протеолизу. Индукция или репрессия генов регулируется гормонами или другими субстратами.

3. Изменение *проницаемости мембран*, или, точнее, изменение целого комплекса функций мембран (изменение ско-

ростей потоков метаболитов, газов, проникающих в клетку и покидающих ее; компартиментализация метаболических процессов, изменение электрохимического потенциала, передача нервных импульсов, функционирование рецепторов и др.). Эти три основных механизма лежат в основе действия многих сигнальных молекул, включая гормоны.

В организме человека координация метаболизма осуществляется *нервной системой и эндокринным аппаратом*. Нервная система обеспечивает быструю реакцию на изменение окружающей среды путем передачи информации в виде электрических сигналов. Отростки нервных клеток, достигнув соседних клеток или клеток-исполнителей, посредством секреции медиаторов в синапсы обеспечивают специфический ответ этих клеток. В эндокринном аппарате секретируются сигнальные молекулы (гормоны), которые поступают в кровь. Большинство гормонов изменяют метаболизм за счет влияния на активность или количество ферментов.

### 1.3.3. Фазы метаболизма

Метаболизм складывается из двух фаз — катаболизма и анаболизма [13].

*Катаболизм* — это ферментативное расщепление крупных пищевых или депонированных молекул (углеводов, липидов, белков) на более простые (лактат,  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$ ) с выделением энергии и запасанием ее в виде АТФ или восстановительных эквивалентов (НАДН, НАДФН, ФАДН<sub>2</sub>).

Катаболизм включает три стадии:

- *1-я стадия* — превращение полимеров в мономеры (крахмал и гликоген — в глюкозу, белки — в аминокислоты, триацилглицеролы — в жирные кислоты и глицерол, нуклеиновые кислоты — в нуклеотиды и т. д.), протекает в желудочно-кишечном тракте и называется перевариванием;
- *2-я стадия* (специфические пути катаболизма) — мономеры превращаются в общие промежуточные продукты — пируват и ацетил-КоА;

• *3-я стадия* (общий путь катаболизма) — окисление ацетильной группы ацетил-КоА до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , включает цикл трикарбоновых кислот, цепи переноса электронов и окислительное фосфорилирование.

*Анаболизм* — ферментативный синтез крупных полимерных молекул из простых предшественников с затратой АТФ или восстановительных эквивалентов НАДН, НАДФН и ФАДН<sub>2</sub>.

Стадии анаболизма:

- *1-я стадия* — то же, что 3-я стадия катаболизма, т. е. цикл трикарбоновых кислот;
- *2-я стадия* — образование мономеров по реакциям, обратным реакциям катаболизма;
- *3-я стадия* — синтез полимеров из мономеров.

*Амфиболические пути* расположены в точках переключения метаболизма и связывают анаболизм и катаболизм.

Анаболизм и катаболизм не являются простым обращением реакций. Катаболические и анаболические пути должны различаться хотя бы одной из ферментативных реакций, чтобы регулироваться независимо. Например, специфический путь распада глюкозы до лактата (анаэробный гликолиз) включает 11 реакций; обратный процесс — синтез глюкозы из лактата (глюконеогенез) включает восемь обратимых реакций и три дополнительные реакции с новыми наборами ферментов. Именно на этих стадиях за счет направленного изменения активности ферментов регулируются суммарные скорости распада и синтеза глюкозы. Кроме того, реакции катаболизма и анаболизма часто *разделены мембранами* и реализуются в разных компартментах клеток. Например, распад жирных кислот протекает в митохондриях, а синтез — в цитозоле. Локализация специфических метаболических процессов в различных отсеках клеток облегчает независимую регуляцию этих процессов.

*Метаболический статус* (лат. *status* — состояние в какой-либо момент) — взаимоотношение анаболических и катаболических процессов в организме в определенный момент.

## 1.4. Биоэнергетика и живая материя

*Биоэнергетика*, или *биохимическая термодинамика* [13], занимается изучением энергетических превращений, сопровождающих биохимические реакции.

Изменение свободной энергии ( $\Delta G$ ) — это та часть внутренней энергии системы, которая может превращаться в работу. Иначе говоря, это полезная энергия, и выражается она уравнением

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S,$$

где  $\Delta H$  — изменение энтальпии (теплоты);  $T$  — абсолютная температура;  $\Delta S$  — изменение энтропии. Энтропия служит мерой неупорядоченности, хаотичности системы и возрастает при самопроизвольных процессах.

Если значение  $\Delta G$  отрицательное, то реакция протекает самопроизвольно и сопровождается уменьшением свободной энергии. Такие реакции называют экзэргоническими. Если значение  $\Delta G$  положительное, то реакция будет протекать только при поступлении свободной энергии извне. Такая реакция называется эндэргонической. При  $\Delta G$ , равном нулю, система находится в равновесии. Величина  $\Delta G$  при стандартных условиях протекания химической реакции (концентрация веществ-участников 1,0 М, температура 25 °С, рН 7,0) обозначается  $\Delta G^{0'}$  и называется стандартной свободной энергией реакции.

Зная значение  $\Delta G^{0'}$ , можно вычислить константу равновесия реакции  $K'eq$ , которая выражается отношением произведений равновесных концентраций продуктов реакции и исходных веществ (штрих означает, что константа равновесия определяется при рН 7,0). Для реакции  $A + B \leftrightarrow C + D$  константа  $K'eq$  вычисляется из концентраций компонентов реакции, измеренных в условиях равновесия, когда их концентрации перестали изменяться:

$$K'eq = [C][D]/[A][B].$$

Связь между величинами  $\Delta G^{0'}$  и  $K'eq$  описывается уравнением

$$\Delta G^{0'} = -RT \ln K'eq = -2,303RT \log_{10} K'eq,$$

где  $R$  — газовая постоянная ( $8,315 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1} \text{К}^{-1}$ );  $T$  — абсолютная температура в Кельвинах ( $298 \text{ К} = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). При  $25 \text{ }^\circ\text{C}$   $RT = 2,478 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ .

Если  $\Delta G^{0'} = 0$ , то  $K'eq = 1$ . При росте значений  $\Delta G^{0'}$  до  $+5,7$ ;  $+11,4$ ;  $+17,1$  величины  $K'eq$  будут соответственно уменьшаться до  $0,1$ ;  $0,01$ ;  $0,001$ . И наоборот, при уменьшении значений  $\Delta G^{0'}$  до  $-5,7$ ;  $-11,4$ ;  $-17,1$  величины  $K'eq$  будут соответственно расти до  $10$ ,  $100$ ,  $1000$ .

Жизненно важные процессы в организме — реакции синтеза, мышечное сокращение, проведение нервного импульса, транспорт через мембраны — получают энергию путем химического сопряжения с окислительными реакциями, в результате которых происходит высвобождение энергии, т. е. эндэргонические реакции в организме сопряжены с экзэргоническими. Для сопряжения эндэргонических реакций с экзэргоническими необходимы аккумуляторы энергии в организме, в которых запасается примерно 50 % энергии. Ими являются:

1. Внутренняя мембрана митохондрий — это промежуточный аккумулятор энергии при получении АТФ. За счет энергии окисления веществ происходит «выталкивание» протонов из матрикса в межмембранное пространство митохондрий. В результате создается электрохимический потенциал ( $\Delta\psi$ ) на внутренней мембране митохондрий. При разрядке мембраны энергия электрохимического потенциала трансформируется в энергию АТФ:  $E_{\text{окисл}} \rightarrow E_{\Delta\psi} \rightarrow E_{\text{АТФ}}$ . Для реализации этого механизма внутренняя мембрана митохондрий содержит ферментативную цепь переноса электронов на кислород и АТФ-синтазу (протонзависимую синтазу АТФ).

2. АТФ и другие макроэргические соединения. Материальным носителем свободной энергии в органических веществах являются химические связи между атомами. Обычным энергетическим уровнем возникновения или распада химической связи является  $\sim 12,5 \text{ кДж/моль}$ . Однако имеется ряд молекул, при гидролизе связей которых выделяется более  $21 \text{ кДж/моль}$  энергии (табл. 1.3). К ним относятся соединения с макроэргической фосфоангидридной связью (АТФ), ацилфосфаты

(ацетил-фосфат, 1,3-бисфосфоглицерат), енол-фосфаты (фосфоенолпируват) и фосфогуанидины (фосфокреатин, фосфоаргинин).

*Таблица 1.3*  
**Стандартная свободная энергия гидролиза  
некоторых фосфорилированных соединений**

Соединение	$\Delta G^{0'}$ , кДж/моль
Фосфоенолпируват	-61,9
1,3-Бисфосфоглицерат	-49,4
Ацетил-фосфат	-43,1
Фосфокреатин	-43,1
Пирофосфат (PP <sub>n</sub> )	-33,5
АТФ ( $\rightarrow$ АМФ + PP <sub>n</sub> )	-32,2
АТФ ( $\rightarrow$ АДФ + P <sub>n</sub> )	-30,5
Глюкозо-1-фосфат	-20,9
Фруктозо-6-фосфат	-13,8
Глюкозо-6-фосфат	-13,8
Глицерол-3-фосфат	-9,2

Основным макроэргическим соединением в организме человека является АТФ. В нем цепочка из трех фосфатных остатков связана с 5'-ОН-группой аденозина. Фосфатные (фосфорильные) группы обозначаются  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . Два остатка фосфорной кислоты соединены между собой фосфоангидридными связями, а  $\alpha$ -остаток фосфорной кислоты — фосфоэфирной связью. При гидролизе АТФ в стандартных условиях выделяется -30,5 кДж/моль энергии.

При физиологических значениях рН АТФ несет четыре отрицательных заряда. Одной из причин относительной нестабильности фосфоангидридных связей является сильное отталкивание отрицательно заряженных атомов кислорода, которое ослабевает при гидролитическом отщеплении концевой фосфатной группы. Поэтому такие реакции являются высокоэкзергоническими.

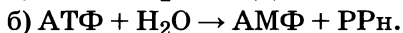
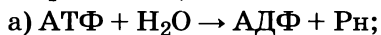
В клетках АТФ находится в комплексе с ионами  $Mg^{2+}$  или  $Mn^{2+}$ , координационно связанными с  $\alpha$ - и  $\beta$ -фосфатом, что увеличивает изменение свободной энергии при гидролизе АТФ до 52,5 кДж/моль.

Центральное место в приведенной шкале (см. табл. 1.3) занимает цикл  $АТФ \rightarrow АДФ + P_n$ . Это позволяет АТФ быть как универсальным аккумулятором, так и универсальным источником энергии для живых организмов.

В клетках теплокровных АТФ как *универсальный аккумулятор* энергии возникает двумя путями:

- аккумулирует энергию более энергоемких соединений, стоящих выше АТФ в термодинамической шкале, без участия  $O_2$  — *субстратное фосфорилирование*:  $S \sim P + АДФ \rightarrow S + АТФ$ ;
- аккумулирует энергию электрохимического потенциала при разрядке внутренней мембраны митохондрии — *окислительное фосфорилирование*.

АТФ является универсальным *источником энергии* для совершения основных видов работы клетки (передача наследственной информации, мышечное сокращение, трансмембранный перенос веществ, биосинтезы):



Образование АТФ является основной целью реакций катаболизма.

Если ферментативная реакция термодинамически невыгодна, то она может осуществиться при сопряжении с реакцией гидролиза АТФ. Гидролиз молекулы АТФ изменяет равновесное отношение субстратов и продуктов в сопряженной реакции в  $10^8$  раз.

Для количественной оценки энергетического состояния клетки используют показатель — *энергетический заряд*. Многие реакции метаболизма контролируются энергетическим обеспечением клеток, которое определяется энергетическим зарядом клетки. Энергетический заряд может колебаться от 0 (все АМФ) до 1 (все АТФ). Согласно Д. Аткинсону, образующие АТФ катаболические пути ингибируются высоким энергетическим зарядом клетки, а утилизирующие АТФ анаболические



пути стимулируются высоким энергетическим зарядом клетки. Оба пути функционируют одинаково при энергетическом заряде, близком к 0,9. Следовательно, энергетический заряд, подобно рН, является буферным регулятором метаболизма (соотношение катаболизма и анаболизма). В большинстве клеток энергетический заряд колеблется в пределах 0,80–0,95.

$$\text{Энергетический заряд} = \frac{[\text{АТФ}] + 1/2 [\text{АДФ}]}{[\text{АТФ}] + [\text{АДФ}] + [\text{АМФ}]}$$

Дополнительным индексом энергетического статуса является *потенциал фосфорилирования*, который зависит от концентрации неорганического фосфата и используется при фосфорилировании-дефосфорилировании ферментов, связанных с резервированием или использованием краткосрочного резерва энергии — гликогена:

$$\text{Потенциал фосфорилирования} = [\text{АТФ}] / [\text{АДФ}][\text{Рн}].$$

К макроэргическим соединениям относят также нуклеотидтрифосфаты, которые обеспечивают энергией ряд биосинтезов: УТФ — углеводы; ЦТФ — липиды; ГТФ — белки. В биоэнергетике мышц важное место занимает креатинфосфат.

**3. НАДФН + Н<sup>+</sup>** — никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный. Это специальный аккумулятор с высокой энергией, который используется в клетке (цитозоль) для биосинтезов, а также обезвреживания ксенобиотиков (гладкий эндоплазматический ретикулум):  $\text{R-CH}_3 + \text{НАДФН}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{R-CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{НАДФ}^+$  (здесь показано создание ОН-группы в молекуле).

Энергия в живой клетке освобождается постепенно, благодаря этому на различных этапах ее выделения она может аккумулироваться в удобной для клетки химической форме в виде АТФ. Различают три фазы освобождения энергии, которые совпадают со стадиями катаболизма:

- *Первая фаза* — подготовительная. На этой стадии происходит распад полимеров до мономеров в пищеварительном тракте или внутри клеток. Освобождается до 1 % энергии субстратов, которая рассеивается в виде тепла.

- *Вторая фаза* — распад полимеров до общих промежуточных продуктов. Для нее характерно частичное (до 20 %) освобождение энергии, заключенной в исходных субстратах. Часть этой энергии аккумулируется в фосфатных связях АТФ, а часть рассеивается в виде тепла.

- *Третья фаза* — распад веществ до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  с участием кислорода. Примерно 80 % всей энергии химических связей веществ освобождается на данной фазе, которая сосредотачивается в фосфатных связях АТФ.

## 1.5. Биологическая информация и живая материя

Молекулярный механизм использования живыми организмами биологической информации основан на функционировании в клетках уникальных химических соединений — биологических полимеров, не встречающихся в природных условиях в неживых объектах. Эти самореплицирующиеся молекулы имели важные характеристики: они были построены из последовательности строительных блоков таким образом, что их репликация была одновременно и удвоением, и передачей информации. Подходящим кандидатом для первой молекулы, приведшей к появлению жизни, была рибонуклеиновая кислота, которая может действительно самореплицироваться без помощи других молекул. Конгломерат между нуклеиновой кислотой и белком может представлять собой мост между неживым и живым миром — структуру, существующую сегодня у вирусов, которые содержат только нуклеиновую кислоту, окруженную белковой оболочкой. Информационно значимыми молекулами являются:

1. Белки, которые, выполняя роль биологических катализаторов (ферментов), обуславливают протекание биохимических реакций в нужном направлении с достаточной скоростью при довольно мягких условиях в смысле температуры и давления. Ферменты отличаются специфичностью. Они катализируют превращения веществ определенного химического строения или даже отдельного вещества. Специфичность фер-

ментов, так же как и белков, не выполняющих каталитической функции, зависит от первичной структуры белка, т. е. постоянства последовательности аминокислот в их молекуле. Белки организма постоянно обновляются. Важнейшей особенностью является то, что каждое очередное поколение белковых молекул сохраняет исходную структуру. Однако представление об изоформах ферментов и других изобелках позволяет констатировать, что более консервативной, т. е. сохраняемой, является третичная структура белка, определяющая его функции.

2. Нуклеиновые кислоты, которые используются в качестве матриц для синтеза белков. Информация, сохраняемая в ДНК, переносится на белок с помощью молекул РНК. Хранение и использование биологической (генетической) информации на основе уникальных информационных макромолекул белков и нуклеиновых кислот является важным для жизни.

Хранение информации в ДНК и реализация ее в процессе жизнедеятельности путем переноса на белки и далее на различные биологические структуры находят свое отражение в наличии *генотипа* и *фенотипа*, что также обязательно для всех живых существ. Воплощение исходной наследственной информации генотипа в информацию рабочих структур организма происходит в процессе *онтогенеза* — *индивидуального развития*, типичного для живых форм. В ходе этого процесса проявляется такое свойство, как способность к росту.

Индивидуальные реакции живых существ на внешние и внутренние стимулы обуславливаются такими общими свойствами жизни, как раздражимость и возбудимость.

Существуют также свойства, распространяющиеся на сферу жизни в целом. Они отражают универсальные принципы ее существования во времени и пространстве. Одно из таких свойств — включенность организмов в процесс эволюции. Благодаря этому жизнь как особое явление материального мира сохраняется на протяжении вот уже более 3 млрд лет. Второе свойство — существование отдельных организмов лишь во взаимодействии с другими в составе особых сообществ — *биоценозов* [15].

## 1.6. Современная (синтетическая) теория эволюции и молекулярная филогения

Все изложенное ранее является всего лишь фрагментами, мазками в бесконечной по сложности и разнообразию и в то же время весьма эргономичной и целесообразной картине проявлений жизни. С определенной долей уверенности можно полагать, что эту картину сформировала эволюция органического мира. Современная теория эволюции описывает развитие органического мира на основе генетики, молекулярной биологии, экологии и дарвинизма. Выделяют девять основных постулатов синтетической теории эволюции [4], [5]:

1. Элементарный эволюционный материал — мутации (носят случайный и ненаправленный характер).

2. Элементарными факторами эволюции являются мутации и рекомбинации (комбинативная изменчивость), изоляция, популяционные волны, миграция, дрейф генов, а также модификации.

3. Наименьшая эволюционирующая единица — популяция.

4. Элементарное эволюционное явление — изменение генофонда популяции на протяжении нескольких поколений в одном направлении.

5. Движущие силы эволюции — борьба за существование и естественный отбор.

6. Эволюция носит дивергентный характер (один таксон может стать предком нескольких дочерних таксонов).

7. Эволюция носит постепенный и длительный характер (видообразование — последовательная смена одной временной популяции чередой последующих временных популяций).

8. Вид существует как целостное и замкнутое образование. Целостность поддерживается миграциями особей, при которых наблюдается обмен аллелями (поток генов).

9. Закономерности макроэволюции (образование крупных таксонов) и микроэволюции (эволюционный процесс, протекающий внутри вида и ведущий к его изменению) идентичны (т. е. действуют одни и те же предпосылки и движущие силы).

В последние десятилетия получены весомые доказательства справедливости теории эволюции в рамках быстроразвивающейся молекулярной эволюции — науки, изучающей в процессе эволюции изменения молекул (продуктов матричных синтезов — ДНК, РНК, белков), закономерности и механизмы этих изменений, а также реконструирующую эволюционную историю генов и организмов.

Среди разделов молекулярной эволюции наиболее важными для данной книги являются:

- *эволюция макромолекул*, которая изучает типы и скорости изменений, происходящих в генетическом материале (нуклеиновые кислоты) и в кодируемых ими белках;
- *молекулярная филогения*, которая изучает эволюционную историю макромолекул и организмов, получаемую на основе биохимии и молекулярной биологии.

Эволюция макромолекул и молекулярная филогения тесно взаимосвязаны. Знание филогении необходимо для определения последовательности изменений в изучаемых молекулах, а знание способов и темпов изменений изучаемой молекулы необходимо для восстановления эволюционной истории группы организмов. Это фундамент филогенеза и онтогенеза [4].

## Глава 2.

# БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ ЭВОЛЮЦИИ

Путь, приведший к современным живым видам, состоит из пяти стадий:

- На первой стадии (начальной) образовывались некоторые ключевые молекулы жизни (нуклеиновые кислоты, белки, углеводы и липиды) с помощью небиологических процессов.

- Вторая стадия была фундаментальным переходом от пребиотической химии к репликационным системам (матричным синтезам) и хиральной чистоте молекул углеводов и аминокислот. С течением времени эти системы становились все более сложными, приводя к формированию живых клеток.

- На третьей стадии появились механизмы преобразования химической и солнечной энергии в формы, которые могут использоваться в биохимических реакциях. С преобразованием энергии связаны процессы биосинтеза компонентов нуклеиновых кислот, белков и других ключевых веществ из более простых молекул.

- Развитие процессов превращения энергии и биосинтетических путей привело к появлению одноклеточных организмов. На четвертой стадии совершенствовались механизмы, которые позволили клеткам регулировать свои биохимические процессы в ответ на различные и часто изменяющиеся условия среды.

- Организмы с такими способностями могли сформировать колонии, включающие группы взаимодействующих клеток, и некоторые в конечном счете превращались в сложные многоклеточные организмы.

## 2.1. Принципы биохимической эволюции

Как эволюционировала живая материя после того, как стали доступны необходимые строительные блоки?

Существует несколько основных принципов, общих для развивающихся систем независимо от того, являются ли они

простым набором молекул или конкурирующими популяциями организмов:

1. Одним из фундаментальных свойств эволюционирующих систем является их способность к *матричным синтезам*, т. е. способность реплицироваться и воспроизводиться. Без способности воспроизводства каждый «вид» молекулы, который мог бы появиться, обречен на «вымирание» из-за распада компонентов (в рамках второго закона термодинамики).

2. Другим фундаментальным принципом эволюции является *изменчивость*. Реплицирующиеся системы должны подвергаться изменениям. Если система всегда будет копироваться очень точно, то реплицируемая молекула всегда останется лишь точной копией материнской молекулы, и развития не произойдет.

3. Важным принципом развития является *конкуренция*. Реплицирующиеся молекулы конкурируют друг с другом за доступные ресурсы, такие как химические предшественники, и конкуренция позволяет эволюции проявляться в виде естественного отбора. Изменчивость вызовет образование различающихся популяций молекул. Некоторые варианты потомков случайно могут оказаться лучше приспособленными для выживания, что обеспечит более оптимальные условия репликации, чем у материнских молекул. Реальные условия протекания репликации будут оказывать избирательное давление, дающее преимущество одному из вариантов реплицирующихся молекул. В результате будет увеличиваться относительная концентрация тех молекул, которые лучше приспособлены к выживанию и самокопированию. Таким образом, возникают новые молекулы, лучше приспособленные к репликации в условиях их существования.

4. Существенным, но недостаточно изученным принципом возникновения жизни явилось создание и поддержание хиральной чистоты: в состав живых организмов, как правило, входят D-сахара и L-аминокислоты.

### 2.1.1. Термины молекулярной эволюции

В области молекулярной эволюции используются следующие термины [5].

*Выравнивание аминокислотных или нуклеотидных последовательностей* — процесс сопоставления сравниваемых последовательностей для такого их взаиморасположения, при котором наблюдается максимальное количество совпадений аминокислотных остатков или нуклеотидов. Может быть парным и множественным.

*Генетические макромолекулы* — биополимеры, имеющие массу более нескольких десятков тысяч дальтон и участвующие в хранении, передаче и воспроизведении генетической информации (ДНК, РНК, белки).

*Гипотеза молекулярных эволюционных часов* (гипотеза Э. Цукеркэндла и Л. Полинга) — гипотеза о постоянстве скорости молекулярной эволюции любого белка в разных филогенетических линиях при его неизменных третичной структуре и функции.

*ГЦ-насыщенность (ГЦ-содержание)* — общее содержание гуанина и цитозина в гене, молекуле ДНК (РНК) или геноме, выражаемое в процентах от общего содержания оснований.

*Дарвинизм* — теория, согласно которой основными факторами эволюции органического мира являются изменчивость, наследственность, борьба за существование и естественный отбор.

*Дендрограмма (филогенетическое дерево)* — это ветвящаяся диаграмма, отражающая родственные связи между таксонами или генетическими макромолекулами и представляющая попытку изобразить в историческом времени их истинные ветвления от предковых форм.

*Дивергенция* — расхождение в ходе эволюции признаков свойств у первоначально филогенетически близких групп организмов, возникающее под действием естественного отбора.

*Дрейф генов (генетико-автоматические процессы)* — случайные колебания частот генов в малых популяциях.

*Единица эволюционного времени* — единица, равная времени (в миллионах лет), необходимому для осуществления дивергенции последовательностей на 1 %.



*Консервативная замена аминокислоты* — мутационная замена, не приводящая к значительным изменениям структуры и функции белка.

*Мутация* — резкое скачкообразное изменение генетического материала, передающееся по наследству. Мутации в половых клетках (генеративные мутации) передаются по наследству при половом размножении; мутации в соматических клетках — при вегетативном размножении.

*Несинонимичная замена* — нуклеотидная замена, проявляющаяся на уровне кодируемого белка.

*Радикальная замена аминокислоты* — мутационная замена, приводящая к значительным изменениям структуры и функции белка.

*Сайт* — участок нуклеиновой кислоты или белка небольшого размера, обычно равный одному нуклеотиду или одному аминокислотному остатку соответственно.

*Синонимичная замена (молчащая, изокодонная замена)* — нуклеотидная замена, не проявляющаяся на уровне кодируемого белка.

*Скорость молекулярной эволюции* — показатель, отражающий темп эволюционных изменений генетических макромолекул и равный эволюционной дистанции, деленной на удвоенное число лет, прошедших после эволюционной дивергенции двух цепей от общей для них предковой цепи.

*Стратегия кодирования белка* — картина использования кодонов в соответствующей ему мРНК или ДНК.

*Транзиция* — нуклеотидная замена, не сопровождающаяся изменением типа основания, т. е. замена пуринового основания пуриновым (А ↔ Г) или пиримидинового пиримидиновым (Ц ↔ Т, У).

*Трансверсия* — нуклеотидная замена, сопровождающаяся изменением типа основания, т. е. замена пуринового основания пиримидиновым (А, Г ↔ Ц, Т, У).

*Таксон* — категория, представляющая итог произведенных систематиком оценок степени эволюционной дивергенции, отражающий уровень различий между классифицируемыми организмами.

*Теория мутационного давления* (теория Н. Суеоки) — теория молекулярной эволюции, признающая существование мутационного давления и провозглашающая направленное мутационное давление основной причиной возникновения генных мутаций.

*Теория нейтральной эволюции* (теория М. Кимуры) — фундаментальная теория молекулярной эволюции, согласно которой большинство изменений на молекулярном уровне в ходе эволюции происходит за счет случайной фиксации нейтральных или почти нейтральных мутаций.

*Эволюционная дистанция* — среднее число аминокислотных или нуклеотидных замен, приходящихся на один сайт двух сравниваемых последовательностей генетических макромолекул двух видов организмов.

## 2.1.2. Методы молекулярной эволюции

Методы молекулярной эволюции делят на две группы [4], [5].

Первая группа включает десять методов эволюции макромолекул:

1. Методы поиска гомологичных последовательностей белков или нуклеиновых кислот в базах данных Blast search, PSI-Blast search и др.

2. Методы выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот и белков для последующего изучения изменений сравниваемых нуклеотидных и аминокислотных последовательностей (программы Clustal W Protein, Multalin DNA и др.).

3. Методы определения картины замещений в выравненных последовательностях для дифференцированного использования разных методов и формул для вычисления эволюционных изменений (композиционная дистанция, индекс несоответствия, метод Монте-Карло и др.).

4. Методы изучения эволюционных изменений аминокислотных последовательностей (количество аминокислотных различий,  $p$ -дистанция и др.).

5. Методы определения характера аминокислотных замен для установления степени их консервативности или радикальности (дистанция Грэнтсема, индекс Танга и др.).

**6.** Методы изучения эволюционных изменений нуклеотидных последовательностей, позволяющие учитывать не только меняющие аминокислоту замещения (несинонимичные), но и молчащие (синонимичные) замены (методы Джукса — Кантора, Кимуры и др.).

**7.** Методы изучения синонимичных и несинонимичных нуклеотидных замен для проведения селекционных тестов (методы Нея — Годжобори, Кумара и др.).

**8.** Селекционные тесты для установления вида отбора в сравниваемых нуклеотидных и аминокислотных последовательностях (дифференция дистанций, ADAPSITE и др.).

**9.** Методы изучения использования кодонов в последовательностях нуклеиновых кислот для детализации эволюционных изменений ДНК и РНК (дистанция Мак-Айнерни, RSCU и др.).

**10.** Вспомогательные методы для получения промежуточных величин, используемых другими методами (расчетное соотношение транзиций и трансверсий, GZ-gamma и др.).

Вторая группа включает методы молекулярной филогении:

**1.** *Дистанционно-матричные методы* для создания филогенетических деревьев — дендрограмм и получения различных коэффициентов их сходства (метод связывания ближайших соседей, метод минимальной эволюции и др.).

**2.** *Дискретные методы* для построения дендрограммы по нуклеотидным или аминокислотным последовательностям (метод максимальной парсимонии и др.).

*Выравнивание аминокислотных или нуклеотидных последовательностей* — это процесс сопоставления сравниваемых последовательностей для такого их взаиморасположения, при котором наблюдается максимальное количество совпадений аминокислотных остатков или нуклеотидов. Этот метод необходим:

- для вычисления эволюционных дистанций между аминокислотными и нуклеотидными последовательностями;
- определения характера и типа аминокислотных замен;
- выявления консервативных участков последовательностей для предсказания вторичной и третичной структур и функции

белков, а также для идентификации новых представителей белковых семейств;

- построения дендрограмм, показывающих филогенетические отношения сравниваемых последовательностей без учета (кладограммы) или с учетом длин ветвей (филограммы).

*Эволюционная дистанция (эволюционное расстояние)* — среднее число аминокислотных или нуклеотидных замен, проходящихся на пару гомологичных сайтов двух сравниваемых последовательностей белков или нуклеиновых кислот. Довольно точным способом определения различий сравниваемых последовательностей является вычисление доли (пропорции) различных аминокислот между двумя последовательностями (part of differences, p-дистанция).

В качестве единицы скорости эволюции белков М. Кимура предложил использовать значение  $10^{-9}$  замен на аминокислотный сайт в год, назвав ее полингом (По). Единицей скорости эволюции нуклеотидных последовательностей является число замен на нуклеотидный сайт в год.

Известны два способа вычисления средней скорости эволюции и оценки ее постоянства.

1. Математический способ предусматривает определение скоростей эволюции по формуле, а затем нахождение средней скорости. Так, зная эволюционные дистанции для алкогольдегидрогеназы класса 3 петуха, рыбы и ланцетника и времена их дивергенции, можно рассчитать скорость эволюции алкогольдегидрогеназы: петуха —  $r = d/2t = 0,1468$  замен на сайт /  $(2 \cdot 0,31 \cdot 10^9 \text{ лет}) = 0,24$  По; рыбы —  $r = 0,1985 / (2 \cdot 0,45 \cdot 10^9) = 0,22$  По; ланцетника —  $r = 0,2936 / (2 \cdot 0,564 \cdot 10^9) = 0,26$  По. Средняя скорость равна сумме скоростей эволюции алкогольдегидрогеназы петуха, рыбы и ланцетника, деленной на 3, т. е. 0,24 По. Полученные скорости колеблются в незначительных пределах, поэтому скорость эволюции алкогольдегидрогеназы класса 3 является приблизительно постоянной.

2. Графический способ предусматривает построение графика зависимости между значениями эволюционных дистанций в заменах на сайт (ось ординат) и временами дивергенции в миллионах лет (ось абсцисс). После нанесения точек линию прово-

дят таким образом, чтобы на ней лежало максимальное число точек, а остальные были равномерно от нее удалены. Если точки незначительно удалены от прямой, говорят о постоянстве скорости эволюции. Для определения средней скорости эволюции необходимо опустить перпендикуляр от 100 млн лет на ось абсцисс к прямой, а затем от полученного пересечения опустить перпендикуляр на ось ординат. Далее по формуле  $r = d/2t$  установленная эволюционная дистанция делится на  $2t$  ( $2 \cdot 100$  млн лет) —  $r = 0,05$  замен на сайт/ $(2 \cdot 0,1 \cdot 10^9$  лет) = 0,25 По.

В молекулярной эволюции для оценки сходства или различий сравниваемых белков с 50-х гг. прошлого века стали применять биохимические методы исследования аминокислотных последовательностей [4], [5]. Обычно исследуют аминокислотный состав, степень различий первичной структуры (эволюционные дистанции), вторичную и третичную структуры, характер наблюдаемых аминокислотных замен и др. Характер замен аминокислот определяют по степени их консервативности и радикальности. *Консервативной заменой аминокислоты называется замена, не приводящая к значительным изменениям структуры и функции белка.* В процессе эволюции консервативные замены аминокислот происходят чаще, чем радикальные, которые преимущественно встречаются в функционально важных участках белковой молекулы (например, сайтах связывания лигандов). Вероятность замены одной аминокислоты другой тем выше, чем ближе их физико-химические свойства (состав, полярность и объем радикалов).

В ходе молекулярной эволюции РНК и ДНК наиболее частым видом молекулярно-генетических событий являются нуклеотидные замены. В ходе независимой эволюции двух последовательностей, дивергировавших от общей предковой формы, в них накапливаются нуклеотидные различия. Чем больше времени прошло с момента дивергенции двух последовательностей от общей предковой формы, тем больше нуклеотидных различий накопится в них. В простейшем случае, когда замены редки (или время эволюции мало), можно предположить, что число замен в паре последовательностей прямо пропорционально времени их эволюции. Дистанция между двумя по-

следовательностями отражает удвоенное время, прошедшее с момента дивергенции (при условии, что скорости накопления замен в двух последовательностях были одинаковы). Белорусский ученый Е.В. Барковский в 2005 г. опубликовал метод вычисления средних эволюционных дистанций, который основан на учете дистанций, полученных при сравнении мРНК данного вида с мРНК таксономически вышестоящих организмов.

В молекулярной эволюции нуклеиновых кислот учитывают:

- *синонимичную (молчащую) замену* — замену нуклеотида, не приводящую к замене аминокислоты;
- *несинонимичную замену* — замену нуклеотида, приводящую к изменению кодируемой аминокислоты.

Таблица генетического кода показывает, что все замены во втором положении нуклеотида в кодоне являются несинонимичными, в то время как часть замен нуклеотидов в первом и третьем положениях синонимичны. Согласно гипотезам о равных частотах нуклеотидов и случайных заменах, эта часть приблизительно составляет 5 % для первого положения и 72 % — для третьего.

По конечному эффекту для организма мутации делятся на нейтральные, благоприятные (адаптивные) и вредные (отрицательные) [4], [5]. Наиболее часто происходят генные мутации, приводящие к замене нуклеотидов. Синонимичные замены в большинстве случаев являются нейтральными, а несинонимичные могут быть нейтральными, благоприятными и вредными. Большинство новых мутаций, появляющихся в популяции, являются вредными, так как чаще всего они уменьшают приспособленность их носителей. Вид отбора, действующий против подобных мутаций и элиминирующий их из популяции, называется *очищающим* (отрицательным). Этот тип отбора встречается наиболее часто, он характерен для нуклеотидных последовательностей, кодирующих структурно-функционально сформированные белки. Но мутантный аллель может иметь такую же приспособленность, как и «наилучший», т. е. мутация окажется селективно нейтральной. В таком случае отбор не будет влиять на ее дальнейшую судьбу.

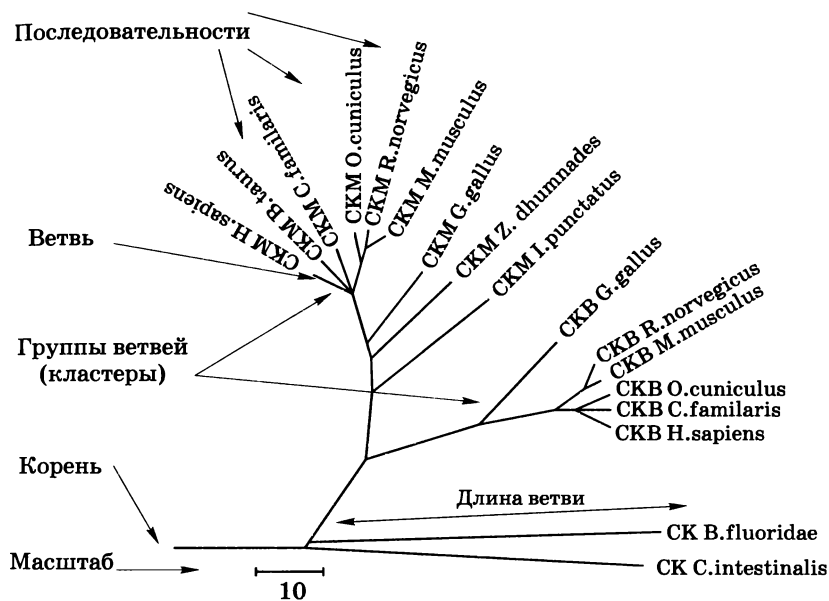
Чрезвычайно редко могут появиться мутации, дающие их носителям некоторые селективные преимущества. Такие мутации могут закрепляться в популяции посредством позитивного (положительного) отбора. Этот вид отбора выявляется довольно редко, однако он имеет важное биологическое и медицинское значение. Его выявление на уровне *всей кодирующей белок области нуклеотидной последовательности* позволяет предположить недавнюю дупликацию гена-предшественника, что приводит к возникновению новых в структурно-функциональном отношении белков. Это основано на гипотезе Гудмэна о том, что дупликация гена является одним из механизмов возникновения функциональной дивергенции.

Вторым механизмом функциональной дивергенции является эффект Дикхайзена — Хартла, при котором доля несинонимичных замещений будет довольно высока, но менее доли синонимичных, что приведет к выявлению *ложноочищающего* отбора. Выявление позитивного отбора на уровне небольшого участка нуклеотидной последовательности свидетельствует о его важной биологической функции.

Об отсутствии отбора свидетельствует равенство произошедших синонимичных и несинонимичных замен на сайт. При этом учитывают *дифференцию дистанций*, под которой понимают разницу значений несинонимичной и синонимичной дистанций. Положительная дифференция позволяет предположить позитивный отбор, отрицательная — очищающий отбор, а дифференция, равная нулю, свидетельствует об отсутствии отбора.

Дендрограмма (филогенетическое дерево) — ветвящаяся диаграмма, отражающая родственные связи между таксонами или генетическими макромолекулами и представляющая собой попытку изобразить в историческом времени их истинные ветвления от предковых форм [4], [5]. По структуре дендрограмма напоминает разветвленное дерево. Под дендрограммой указывают ее масштаб — отрезок, равный определенной эволюционной дистанции. Сейчас дендрограммы строят исключительно при помощи специальных компьютерных программ. Частями дендрограммы являются корень, ветви, группы ветвей (кластеры) и последовательности (рис. 2.1).

а



б

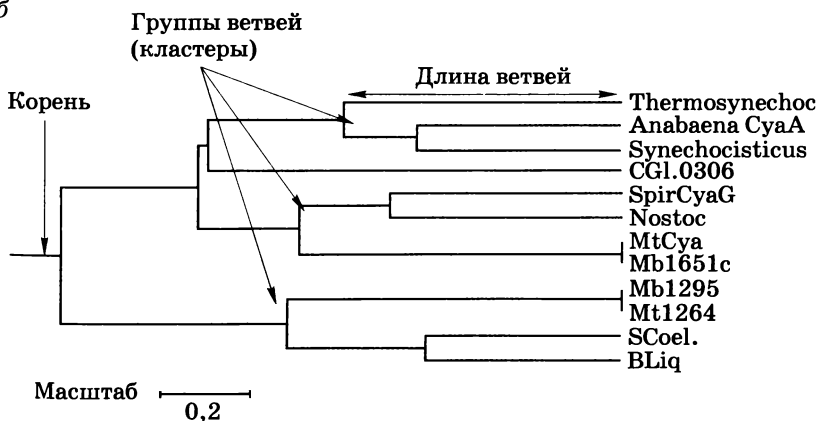


Рис. 2.1. Дендрогаммы:

а — радиальная корневая для аминокислотных последовательностей М- и В-изоферментов креатинкиназ хордовых, построенная по числу аминокислотных различий; б — UPGMA-дендрогамма традиционной формы, построенная по р-дистанциям



Дендрограммы классифицируют по признаку наличия корня (корневые и бескорневые), по форме построения (традиционные, радиальные, круговые), по учету длин ветвей (кладограммы (без учета), филограммы (с учетом)).

Методы построения дендрограмм делятся на две группы.

1. *Дистанционно-матричными методами* создают дендрограммы по принципу объединения наиболее сходных последовательностей или их групп на основании значений эволюционных дистанций (метод связывания ближайших соседей — NJ, метод минимальной эволюции — ME, метод попарного невзвешенного кластерирования с арифметическим усреднением — UPGMA).

2. *Дискретными методами* строят дендрограммы не на основании эволюционных дистанций, а на основании непосредственного сравнения последовательностей нуклеотидов или аминокислот. Наиболее известным методом этой группы является метод максимальной персимонии (экономии) — MP (рис. 2.2).

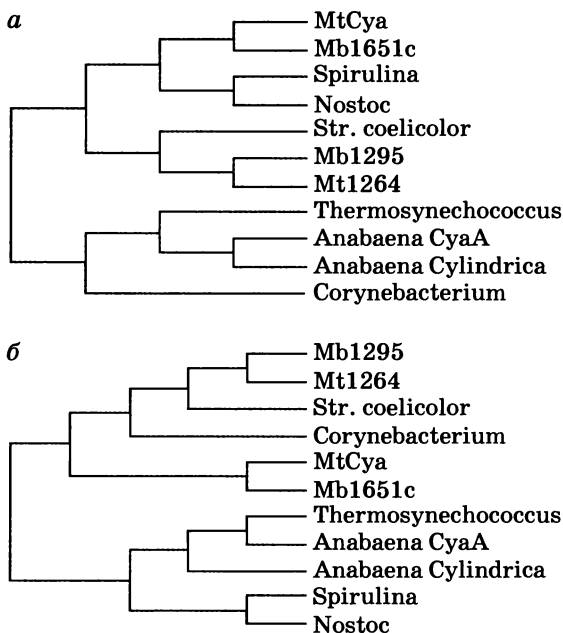


Рис. 2.2. Дендрограмма, построенная MP-методом:

*а* — традиционная форма; *б* — после bootstrap-обработки (статистического подтверждения корректности дендрограммы)

На рис. 2.2, *а* мРНК, кодирующие аденилатциклазы спиролины, ностока и двух ферментов микобактерий, расположены на одной ветви. Однако после обработки этой дендрограммы методом *bootstrap* (рис. 2.2, *б*) мРНК, кодирующие аденилатциклазы актиномицетов, полностью отделяются от аналогичных мРНК цианобактерий. С большой долей вероятности можно полагать, что это связано с разницей в длине мРНК, кодирующих аденилатциклазы актиномицетов (в среднем 1200 нуклеотидов) и цианобактерий (в среднем 2150 нуклеотидов), а также с нарушением выравнивания последовательностей (утратой элементов сходства между ними).

Для того чтобы понять сложности достоверной верификации дендрограмм, отметим типичные этапы метода *bootstrap*.

1. Создание нескольких сотен новых последовательностей из случайным образом перемешанных участков исходных.

2. Построение на основании сравнения новых последовательностей множества дендрограмм.

3. Вычисление индекса *BCL* (*bootstrap confidence level*) для ветвей дендрограммы. Если положение ветви в одной из новых дендрограмм соответствует ее положению в исходной, то  $BCL = 1$ , в противном случае  $BCL = 0$ . Такая процедура выполняется для каждой из дендрограмм.

4. Вычисление среднего значения *BCL* (результат деления суммы значений всех индексов на количество дендрограмм; рис. 2.3).

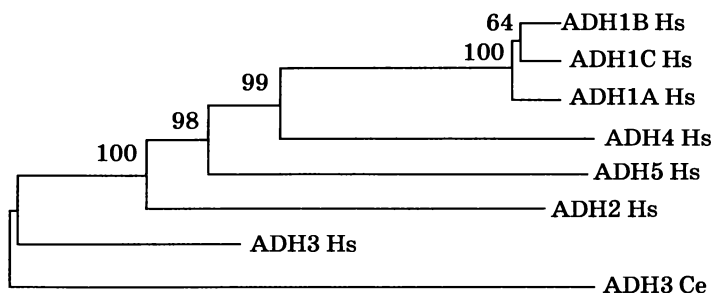


Рис. 2.3. Дендрограмма для мРНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы человека, построенная NJ-методом (в процессе *bootstrap*-обработки)

5. Построение согласованной с тестом bootstrap дендрограммы, в которой средние значения BCL для каждой ветви должны быть больше 0,95 (рис. 2.4).

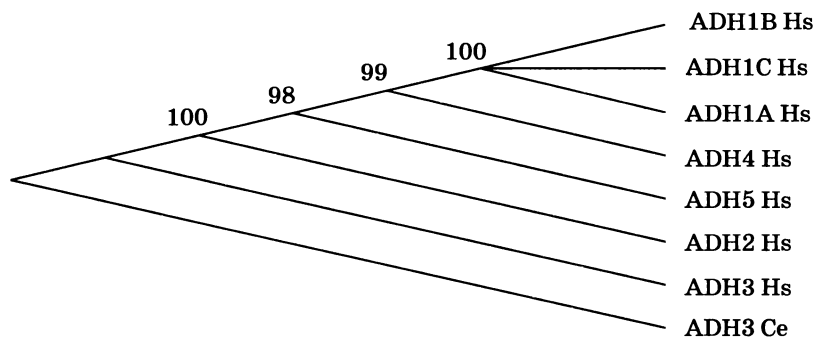


Рис. 2.4. Дендрограмма для мРНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы человека, построенная NJ-методом (после bootstrap-обработки)

Итогом всех упомянутых методов молекулярной эволюции является *определение времен дивергенции различных таксономических групп*. Теоретической основой определения времен дивергенции различных организмов принята гипотеза о *молекулярных часах*, согласно которой число аминокислотных замен в сравниваемых белках организмов двух видов приблизительно пропорционально времени их дивергенции.

Для оценки времен дивергенции обычно используют:

- методы определения времен дивергенции по нескольким белкам или генам;
- дистанции между последовательностями белков, а не между последовательностями генов;
- исследование ядерных, а не митохондриальных или хлоропластных белков;
- сравнение дендрограмм для групп видов;
- использование нескольких достоверных калибровочных точек [4], [5].

Времена дивергенции различных таксономических групп, используемые в молекулярной эволюции, представлены в табл. 2.1.

*Таблица 2.1*  
**Стандартные времена дивергенции**  
**различных таксономических групп**

Дивергировавшие организмы	Время дивергенции, млн лет назад
Человек/шимпанзе	5,5
Человек/горилла	7
Человек/орангутан	8,13
Человек/гиббон	15
Человек/мартышкообразные	23
Мышь/крыса	41
Человек/широконосые обезьяны	48
Человек/тупайи	86
Человек/зайцеобразные	91
Человек/хищные	92, 95
Человек/непарнокопытные	92, 95
Человек/парнокопытные	92
Приматы/грызуны	109–112, 120
Человек/неполнозубые	129
Птицы/крокодилы	276
Человек/лепидозавры	276
Человек/амфибии	360
Человек/лучеперые рыбы	450
Человек/хрящевые рыбы	528
Человек/бесчелюстные	564
Человек/дрозофилы	833
Человек/нематоды	970
Человек/грибы	1392
Человек/растения	1392
Человек/протисты	1717
Человек/эубактерии	3036

С. Кумар и его коллеги в 2004 г. установили, что коэффициент корреляции вычисленных времен дивергенции по 658 генам, относящихся к 207 видам позвоночных животных, и времен дивергенции по палеонтологическим данным, равен 0,99.

### 2.1.3. Теория нейтральной молекулярной эволюции

В 1968 г. М. Кимура сформулировал теорию нейтральной молекулярной эволюции с пятью основными постулатами [4], [5].

1. Скорость эволюции любого белка, выраженная через число аминокислотных замен на сайт в год, приблизительно постоянна и одинакова в разных филогенетических линиях, если только третичная структура этого белка, а следовательно, и функция остаются неизменными. Этот постулат связан с гипотезой о постоянстве скорости молекулярной эволюции, названной молекулярными эволюционными часами (Э. Цукеркэндл, Л. Полинг, 1962–1965). Гипотеза позволяет сделать предположения о сохранности или изменении третичной структуры и функции белка в ходе эволюции и о временах дивергенции различных групп животных.

2. Функционально менее важные молекулы или их части эволюционируют (накапливают мутационные замены) быстрее, чем более важные. Например, скорость эволюции гистона  $H_4$ , необходимого для компактизации (упаковки) ДНК в виде нуклеосом, в 210 раз ниже, чем скорость эволюции пищеварительного фермента — панкреатической рибонуклеазы.

3. Мутационные замены, приводящие к меньшим нарушениям структуры и функции молекул (консервативные замены), в ходе эволюции происходят чаще тех, которые вызывают более существенные нарушения структуры и функции этих молекул.

4. Появлению нового в функциональном отношении белка всегда должна предшествовать дупликация гена. При дупликации в одной из копий гена накапливаются мутации, а в итоге она превратится в новый ген, тогда как другая копия сохраняет старую функцию, необходимую виду для выживания в переходный период.

5. Селективная элиминация вредных мутаций и случайная фиксация селективно нейтральных или очень слабо вредных

мутаций происходят в ходе эволюции гораздо чаще, чем положительный дарвиновский отбор благоприятных мутаций.

Эти же принципы лежат в основе эволюции организмов.

### 2.1.4. Мутационное давление

Согласно теории нейтральной молекулярной эволюции, адаптивные изменения, обусловленные положительным дарвиновским отбором, происходят на молекулярном уровне, но значительно реже, чем фиксация мутаций в результате дрейфа генов. На этом основывается концепция нейтрализма, которая предполагает нейтральность большинства мутаций [4], [5].

Во время создания теории нейтральной эволюции Н. Суеюка разработал вариант теории мутационного давления, согласно которой основной причиной возникновения генных мутаций является направленное мутационное давление. *Мутационное давление* — фактор молекулярной эволюции, дающий материал для естественного отбора и обусловленный повышенной частотой возникновения и фиксации нуклеотидных замещений аденина и тимина на гуанин и цитозин (АТ-давление) относительно частоты возникновения и фиксации замен гуанина и цитозина на аденин и тимин (ГЦ-давление). Считают, что мутационное давление определяет стратегию матричных синтезов (ДНК → ДНК, ДНК → РНК, ДНК → РНК → белок) и степень нейтральности замен нуклеотидов в ДНК или РНК (селективно нейтральными, т. е. синонимичными, являются замены нуклеотидов в третьем положении кодона). Нейтральность замен нуклеотидов в участках мРНК уменьшается по мере формирования функционально активного белка: для участка мРНК, кодирующего препроинсулин, нейтральность замен равна 29,2 %, проинсулин (препроинсулин — сигнальный пептид) — 22,9 %, зрелый инсулин (проинсулин — С-пептид) — 4,2 %. Выдвинуто предположение о существовании прямой связи между темпами эволюционных изменений последовательностей и генетических макромолекул и нейтральности замен нуклеотидов в соответствующих мРНК.

## 2.2. Биохимическая эволюция «в пробирке»

Впервые возможность наблюдения «молекулярной эволюции в пробирке» была продемонстрирована в 1967 г. С. Шпигельманом, который показал, что реплицирующиеся молекулы РНК способны образовывать *in vitro* новые варианты последовательностей. Он использовал в качестве эволюционирующей молекулы геномную РНК, выделенную из бактериофага Q $\beta$ . Геном бактериофага Q $\beta$  представляет собой единичную цепь РНК, состоящую приблизительно из 3300 оснований, и репликация этой РНК обеспечивается белковым комплексом, называемым Q $\beta$ -репликазой. Активная Q $\beta$ -репликаза включает четыре субъединицы. Только одна из них кодируется фаговой РНК. Три другие субъединицы — это белки клетки-хозяина, которые фаг использует для размножения. Два из них — EF-T<sub>u</sub> и EF-T<sub>s</sub> являются факторами элонгации синтеза белка, а третий — это один из компонентов 30S-субъединицы бактериальной рибосомы. Таким образом, фаг Q $\beta$  создает весьма специфичный фермент максимально экономичным для себя способом.

Итак, С. Шпигельман смешал репликазу со стартовой (нативной) популяцией молекул РНК фага Q $\beta$ . В благоприятных условиях, когда в среде было достаточное количество предшественников, отсутствовали ограничения по времени или другие специфические воздействия, состав популяции РНК по результатам репликации не отличался от присущего родительским молекулам. Однако в условиях селективного воздействия на систему репликации состав популяции реплицирующихся молекул изменялся существенно. Например, уменьшение времени, необходимого для завершения репликации, с 20 до 5 мин привело за 75 генераций к доминированию одного укороченного вида РНК, включающего только 550 оснований. С. Шпигельман применил и другие селективные воздействия, например ограничение концентрации предшественников или добавление компонентов, которые ингибируют репликацию. Во всех вновь созданных условиях новые образцы реплицировались более эффективно. Процесс эволюции, показанный в

этих исследованиях, продемонстрировал зависимость репликации фрагментов РНК Q $\beta$  репликазой от условий протекания репликации.

### 2.2.1. Рибозимы

Механизм репликации нуклеиновых кислот определяется их молекулярной структурой. Это наблюдение предполагает, что нуклеиновые кислоты, возможно, и РНК могли быть *самореплицирующимися*. Действительно, результаты ряда исследований показали, что одноцепочечные нуклеиновые кислоты могут служить матрицами для синтеза комплементарных цепей и что этот синтез может происходить спонтанно, т. е. без задействования биологических механизмов репликации.

Такой процесс, превышающий простую репликацию, потребовал формирования новых специфических катализаторов. Т. Чех и С. Альтман независимо друг от друга установили, что определенные молекулы РНК могут быть эффективными катализаторами. Эндорибонуклеазная активность РНК была обнаружена Т. Чехом в 1980 г. у интрона группы I предшественника рибосомной РНК *Tetrahymena*, осуществляющего аутокаталитическую реакцию сплайсинга (аутосплайсинга), в результате которой происходит вырезание из молекулы предшественника рРНК последовательности этого интрона и образование зрелой молекулы рРНК. Такие интроны обнаружены в пре-рРНК у других одноклеточных эукариот, в пре-мРНК митохондрий и хлоропластов многих низших организмов и в митохондриях высших растений. Они присутствуют даже у бактериофага T4. С тех пор аутокаталитические реакции расщепления были выявлены у многих молекул РНК. Эти РНК-катализаторы известны как *рибозимы* (рис. 2.5, см. также цветную вклейку между с. 96–97).

Несмотря на значительные различия в первичной структуре, разные представители семейства РНК группы I складываются в консервативную третичную структуру, способную обеспечить проведение двух реакций расщепления фосфодиэфирных связей, как при сплайсинге молекул пре-мРНК. Однако вместо атаки 5'-сайта сплайсинга внутренним остатком А (аденило-



вой кислоты) нековалентно связанный с пре-рРНК гуанозин, входящий в состав ГТФ, ГДФ или ГМФ, выполняет роль нуклеофила. 3'-ОН-группа этого гуанозинового нуклеотида, выступающего в качестве кофактора, атакует границу первого экзона и интрона и высвобождает экзон с образованием 3'-конца. Затем образовавшаяся 3'-ОН-группа экзона атакует 3'-сайт сплайсинга, соединяя при этом два экзона. Для складывания интрона в соответствующую третичную структуру требуется большое количество ионов  $Mg^{2+}$ , которые обеспечивают удержание в непосредственной близости 5'- и 3'-концов экзонов для последующего их соединения благодаря спариванию оснований во «внутренней направляющей последовательности» интрона. Вдобавок связывающий карман для гуанозинового кофактора формируется вблизи координированного иона  $Mg^{2+}$ , который помогает активировать атаковую гидроксильную группу. Единственным условием для процесса сплайсинга молекул РНК группы I *in vitro* является присутствие ионов  $Mg^{2+}$  и гуанозина. Однако вполне вероятно, что в условиях *in vivo* сплайсинг интронов группы I нуждается во вспомогательном действии специфических белков.

Интроны группы II объединяют второй класс самосплайсирующихся интронов. До сих пор они обнаружены только в митохондриях и хлоропластах растений и у грибов, и хотя большинство из них расположено в генах, кодирующих белки, интроны группы II присутствуют также в генах некоторых тРНК и рРНК. Сплайсинг интронов группы II представляет особенный интерес для биологов-эволюционистов из-за сходства механизмов их сплайсинга и сплайсинга молекул пре-мРНК (рис. 2.5).

Вариант на рис. 2.5, а: интроны группы I катализируют реакцию самосплайсинга, т. е. выщепления себя из РНК-предшественника, которое происходит в две стадии. Сначала гуаниновый нуклеотид в форме ГТФ, ГДФ, ГМФ или даже просто гуанозин (G) связывается в специфическом кармане интрона и так ориентируется в каталитическом центре, что его 3'-ОН-группа получает возможность атаковать фосфодиэфирную связь в 5'-сайте сплайсинга. Затем, как и в случае сплай-

синга молекул пре-мРНК, образующаяся на 3'-конце высвобожденного экзона 1 3'-ОН-группа атакует фосфодиэфирную связь в 3'-сайте сплайсинга РНК-предшественника, соединяя тем самым два экзона.

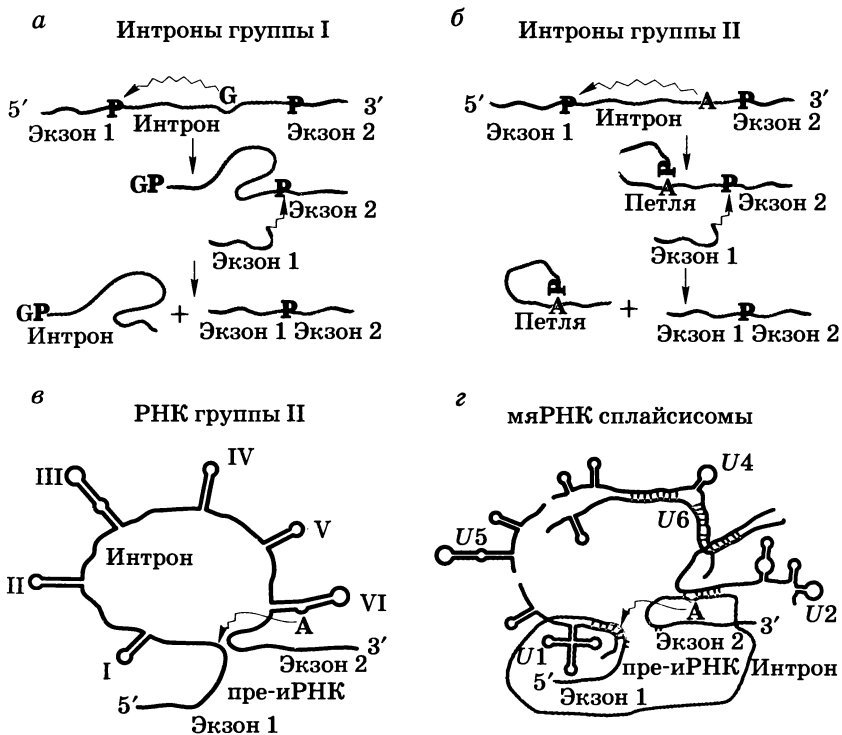


Рис. 2.5. Четыре варианта сплайсинга, осуществляемого РНК-рибозимами

Вариант на рис. 2.5, б: сплайсинг интронов группы II в определенной степени напоминает сплайсинг молекул пре-мРНК. В этом случае ковалентно связанный аденозин (А), фактически представляющий собой точку ветвления и расположенный вблизи 3'-конца интрона, атакует 5'-сайт сплайсинга, в результате чего формируется петля, и два экзона соединяются вместе.

Варианты на рис. 2.5, в, г: интроны группы II складываются в специализированные структуры, которые способны

осуществлять сплайсинг в отсутствие белковых факторов. Существует предположение, что совокупность мяРНК, участвующих во взаимодействии с интронами пре-мРНК и их сплайсинге, эволюционно происходит от интронов группы II. Действительно, домен VI интрона группы II напоминает структуру U2-мяРНК, связанной с последовательностью, включающей остаток А, в точке ветвления. Домен V, подобно дуплексу U6-мяРНК:U2-мяРНК, способствует сближению точки ветвления и 5'-сайта сплайсинга, а домен III, как и U5-мяРНК, участвует в сближении 5'- и 3'-концов экзонов для осуществления их сплайсинга.

Подобно интронам группы I, РНК, принадлежащие к классу молекул, содержащих интроны группы II, формируют вполне определенную третичную структуру. В нефизиологических условиях (умеренно повышенная температура и высокая концентрация ионов  $Mg^{2+}$ ) некоторые интроны группы II способны к самостоятельному выщеплению себя из первичных молекул РНК в отсутствие любых белков. Однако они нуждаются в дополнительных направляющих факторах сплайсинга в условиях *in vivo*. Действительно, несплайсируемые самостоятельно интроны группы II у грибов кодируют белки созревания (матуразы), которые помогают вырезать эти интроны. Реакции трансэтерификации, выполняемые интронами группы II, в точности соответствуют реакциям сплайсинга молекул пре-мРНК в ядре. Наиболее ярким отличием сплайсинга интронов группы II и сплайсинга пре-мРНК является то, что в условиях *in vitro* сплайсинг пре-мРНК в любом случае требует присутствия мяРНК U1, U2, U4, U5 и U6, а также 100 белковых факторов и энергетических затрат.

Интересно, что внутримолекулярная вторичная структура интронов группы II формирует каталитический центр, который имеет большое сходство с межмолекулярным спариванием оснований малых ядерных РНК в сплайсисоме. Это подводит к предположению, что *отдельные элементы, расположенные в интронах группы II, являются прародителями (предшественниками) аппарата сплайсинга ядерных пре-мРНК*. В ходе эволюции каталитически активные элементы интронов

группы II могли быть удалены из состава интронов и разделиться на несколько самостоятельных малых ядерных РНК. Благодаря комплементарному спариванию и опосредованным белками взаимодействиям эти молекулы РНК собрались в сплайсисому с формированием каталитического центра, похожего на каталитический центр интронов группы II. В результате образовалась структура, способная действовать на множество различных молекул пре-мРНК. В сущности, сплайсинг интрона у *Chlamydomonas*, по-видимому, является промежуточным случаем, где каталитический центр образован тремя разными молекулами РНК.

В природе встречается множество других каталитически активных форм РНК, включая структуры типа «головка молотка» и шпилечные структуры некоторых РНК-вирусов (рис. 2.6; стрелки обозначают точки расщепления РНК; нуклеозид N может быть A, U(У), G(Г) или C(Ц), H — A, U(У) или Ц, Y — любой пиримидин; приведены общепринятые обозначения элементов вторичных структур рибозимов). Эти рибозимы катализируют расщепление РНК посредством нуклеофильной атаки, облегчаемой (инициируемой) комплементарным спариванием оснований и третичными взаимодействиями. Маленькие размеры этих РНК (50–100 нуклеотидов) дают возможность кристаллографам определять их трехмерную структуру, что позволяет детализировать события, происходящие во время катализа.

Следует отметить, что рибозимы, имеющие структуру типа «головка молотка», представляют интерес для исследователей, поскольку они не образуют внутримолекулярного спаривания оснований, но могут создаваться за счет межмолекулярного спаривания оснований между каталитическими и субстратными доменами. Это позволяет исследователям конструировать каталитические домены, которые спаривались бы с интересующими субстратными молекулами РНК и направляли их специфическое расщепление, создавая таким образом модель специфической к определенной последовательности рестрикционной эндонуклеазы для РНК.

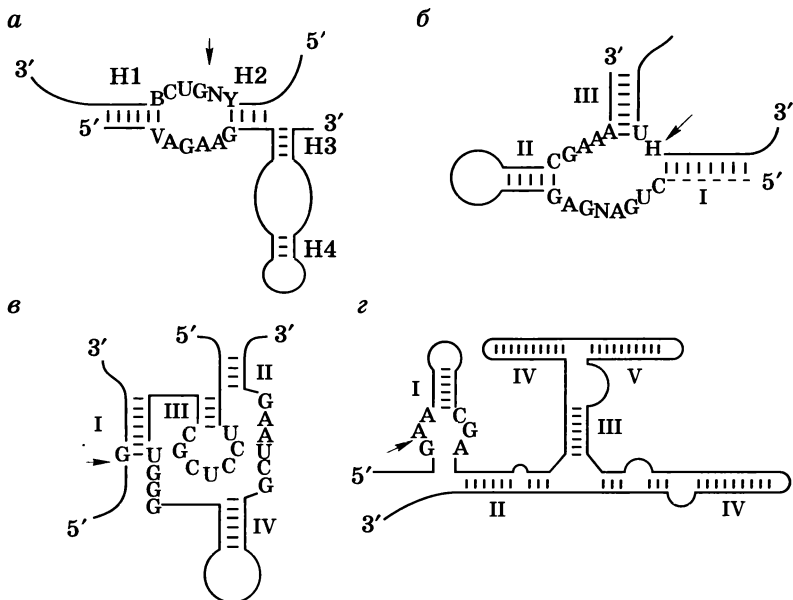


Рис. 2.6. Рибозимы:

*а* — «головка молотка»; *б* — шпилька; *в* — рибозим вируса гепатита; *г* — рибозим *Neurospora VS*

Еще одним примером рибозима служит РНК-компонент РНК-азы Р, которая ответственна за формирование 5'-концов транспортных РНК. 5'-концы транспортных РНК у организмов, охватывающих все пять царств живого, образуются за счет эндонуклеолитического расщепления, катализируемого рибонуклеопротеидным комплексом — РНК-азой Р. Эукариотическая РНК-аза Р состоит из высококонсервативной РНК и девяти белков, которые узнают соответствующую шпильчатую структуру в составе пре-тРНК. Рибонуклеазу Р бактерий можно диссоциировать на два компонента: РНК размером 375 нуклеотидов и полипептид с молекулярной массой 20000 дальтон. В условиях, создаваемых для исследования активности фермента *in vitro*, оба компонента абсолютно необходимы для расщепления тРНК-субстрата. Однако изменение ионного состава смеси, в которой протекает реакция (например, увеличе-

ние концентрации ионов  $Mg^{2+}$ ), делает ненужным присутствие белкового компонента. В этом случае катализировать реакцию расщепления может одна РНК. Кроме того, оказалось, что каталитическая активность РНК ненамного меньше активности неочищенных препаратов рибонуклеазы Р. Эволюционное значение этих наблюдений очевидно. Действительно, белки были привнесены в систему автономно реплицирующихся рибонуклеиновых кислот из-за их способности стабилизировать вторичные или третичные структуры РНК, которые, по-видимому, не были достаточно устойчивыми. Позже вследствие большего разнообразия свойств белков они могли приобрести функцию катализаторов, что в конце концов привело к формированию современного аппарата экспрессии генов.

Особое внимание следует обратить на открытый недавно феномен, получивший название «*редактирование РНК*». Этот термин описывает серии разнотипных и не похожих между собой по механизму действия событий посттранскрипционного процессинга, в ходе которых первичная последовательность молекул РНК изменяется такими путями и способами, которые сильно отличаются от общеизвестных. Они включают как модификацию нуклеотидов, так и их встраивание/делетирование.

Известно несколько случаев, когда кодируемые генами мРНК млекопитающих «используют» процедуру замены оснований. Например, мРНК аполипопротеина В человека исходно кодирует длинную полипептидную цепь, но в определенных случаях, которые используются для регуляции экспрессии гена с образованием конкретного белкового продукта, в составе мРНК один из Ц (цитидин) заменяется на У (уридин), превращая тем самым кодон глутамина ЦАА в терминирующий кодон УАА, что прерывает трансляцию такой мРНК на «середине пути». Такой тип редактирования РНК является результатом дезаминирования цитозина, катализируемого специфической дезаминазой. Описаны по крайней мере два других примера подобного дезаминирования Ц в У в составе мРНК млекопитающих.

Гены митохондрий и хлоропластов некоторых низших эукариот и растений демонстрируют намного более частые, еще

более специфические варианты превращения Ц в У в составе их матричных РНК. Ферментативные основы таких изменений и способы узнавания сайтов, подлежащих изменению, все еще не определены, но уже ясно, что мотив единой консервативной последовательности, узнаваемой дезаминазами, отсутствует. Транспортные РНК таких различных организмов, как сумчатые млекопитающие, простейшее *Acanthamoeba* и паразитическое простейшее *Leishmania*, также демонстрируют варианты превращения Ц в У.

Другие виды редактирования РНК, включающие модификацию нуклеотидов в клетках эукариот, являются результатом проявления активности аденозиндезаминазы, селективно превращающей остатки аденозина в инозин в составе двухцепочечных участков некоторых РНК. В мРНК рецептора глутаминовой кислоты изменение смысла кодона происходит как часть регуляторной стратегии (подобно аполипопротеину В). Неспособность инозина образовывать водородные связи с ранее комплементарным урацилом служит средством разделения цепей в модифицированной таким способом двухцепочечной области молекулы РНК.

Итак, внутри рибозимов есть антисмысловые участки и участки, осуществляющие ферментативную реакцию, т. е. они не просто присоединяются к мРНК, а еще и разрезают ее. Присоединяясь к комплементарной РНК-мишени, рибозим расщепляет эту РНК, результатом чего является прекращение синтеза белка, кодируемого РНК-мишенью. Если такой мишенью для рибозима будет вирусная РНК, то рибозим нарушит ее структуру и соответствующий вирусный белок образовываться не будет. В результате вирус прекратит размножаться в клетке. Такой подход, возможно, применим и к лечению некоторых других патологий человека, например рака или СПИДа.

Открытие рибозимов дало возможность предположить, что *каталитические РНК-молекулы играли фундаментальную роль в эволюции*. Каталитическая способность молекул РНК связана с их способностью организовываться в специфические сложные структуры.

Существование молекул РНК, которые обладают специфическими связывающими и каталитическими свойствами, дела-

ет вероятной идею относительно раннего «мира РНК», населяемого формами жизни, зависящими от молекул РНК, которые играли все главные роли, включая реализацию наследственности, хранение информации и обеспечение специфических реакций биосинтеза и метаболизма энергии.

В последние годы большое внимание уделяется биологической роли микроРНК (малые временные РНК, или *small temporal RNA*) — нуклеиновых кислот совсем крошечного даже по молекулярным масштабам размера — длиной всего 20–25 нуклеотидных остатков (молекулярная масса около 6000–7000). Они не кодируют никаких белков, но способны направленно выключать экспрессию жизненно важных генов в процессах развития и клеточной дифференцировки у высших организмов через взаимодействие с нетранслируемой областью их мРНК [9].

### 2.2.2. Феномен РНК-интерференции

Одним из способов получения новых сортов декоративных растений, например петуний, цветы которых имели бы более яркие бордовые лепестки, является введение в клетки растения гена, отвечающего за синтез красного пигмента. К удивлению селекционеров, многие цветы после введения дополнительной копии гена вместо того, чтобы стать более яркими, вовсе теряли пигмент и оказывались белыми. В других экспериментах у *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) пытались усилить работу определенных генов путем введения в клетки нематоды дополнительных копий этих генов. Вместо усиления экспрессии данных генов наблюдался противоположный эффект. Эти результаты рассматривали как артефакты. Спустя годы удалось установить, что во всех подобных случаях в клетках подопытных организмов появлялось большое количество «малых» РНК, причем они оказывались копиями отдельных участков тех самых генов, которые вводились в клетку и активность которых, вопреки ожиданиям, подавлялась.

Начиная с 1995 г. исследователи предприняли попытки воспроизвести этот эффект экспериментально. Для этого были искусственно синтезированы короткие молекулы РНК, являю-



щиеся почти точной копией какого-либо небольшого участка определенного гена, и вводили эти РНК различным организмам. Первое подтверждение феномена «замолкания» генов было получено у *C. elegans*. Немного позже это свойство малых РНК выявили у мух и наконец в 2001 г. — при введении в клетки мыши и человека. В том же 2001 г. журнал «Science» включил исследования малых РНК в число наиболее важных. Почему же малые РНК, в отличие от информационных, транспортных и рибосомальных РНК, способны выполнять столь необычные функции?

В нормально работающей клетке каждый ген выполняет собственную, строго определенную функцию, например направляет синтез белка с помощью предварительного образования мРНК или регулирует другие клеточные процессы путем взаимодействия с регуляторными белками. При этом происходит обычная экспрессия гена в клетке. Эффект «гашения» экспрессии определенных генов малыми РНК получил название *РНК-интерференции*, а молекулы, вызывающие его, назвали *малыми интерферирующими РНК* (siRNA — small interfering RiboNucleic Acids, общепринятой аббревиатуры на русском языке пока нет). К классу малых РНК относят молекулы, содержащие от 20 до 300 рибонуклеотидов. За эффект РНК-интерференции отвечают самые короткие из них — siRNA, состоящие всего из 21–28 (у млекопитающих из 21–23) нуклеотидов. Структурной особенностью этих молекул является то, что они, в отличие от большинства других клеточных РНК, состоящих всего из одной цепи нуклеотидов, являются *двухцепочечными*. Нуклеотиды двух цепей siRNA спариваются друг с другом по тем же законам комплементарности, по которым формируются двухцепочечные молекулы ДНК в хромосомах. Кроме того, на двух концах каждой siRNA всегда присутствуют одноцепочечные уступы из двух неспаренных нуклеотидов.

Если молекула siRNA появляется в клетке, она сразу же взаимодействует со специфической клеточной системой белков, для которых появление siRNA является сигналом к такому взаимодействию (рис. 2.7, см. также цветную вклейку между с. 96–97).

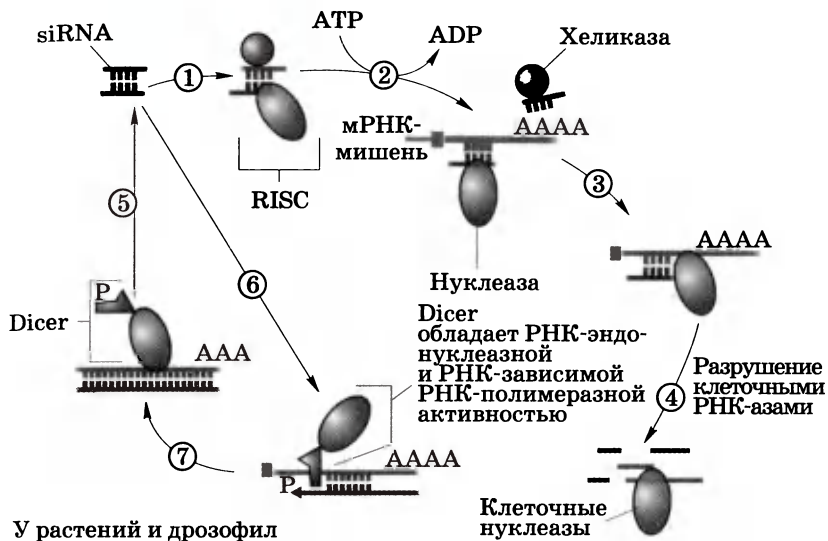


Рис. 2.7. Роль siRNA

На первом этапе с молекулой siRNA связываются ферменты хеликаза и нуклеаза (*этан 1*), формируя комплекс RISC (RNA-induced silencing complex; от англ. *silence* — молчать, замолкать, *silencing* — замолкание). Как в англоязычной, так и в отечественной специальной литературе этим термином называют процесс «выключения» гена. Хеликаза в силу своей специфичности раскручивает цепи siRNA, в результате чего они расходятся (*этан 2*). Одна из этих цепей, с которой связана нуклеаза, получает возможность связаться с комплементарным ей участком одноцепочечной мРНК (*этан 3*), позволяя нуклеазе разрезать ее. Разрезанные же участки мРНК подвергаются действию других клеточных РНК-аз, которые обеспечивают их дальнейшую деградацию (*этан 4*). Итак, основная «специальность» siRNA в клетке — это блокирование тех генов, которые соответствуют одной из цепочек в составе siRNA.

Необходимость РНК-интерференции в клетке заключается прежде всего в том, что с помощью siRNA клетка может защищаться от проникновения вирусов. Геном некоторых из них состоит из ДНК, некоторых — из РНК, причем РНК-вирусов может быть как одно-, так и двухцепочечной. Разрезание чу-

жеродной вирусной мРНК в этом случае происходит также путем активации комплекса ферментов RISC. Однако для большей эффективности у растений и насекомых эволюционно отобран своеобразный путь усиления защитного действия siRNA (этапы 5–7 на рис. 2.7). Присоединяясь к цепи мРНК, участок siRNA может с помощью специфического комплекса ферментов, называемого Dicer, сначала достроить вторую цепочку мРНК, а затем разрезать ее в разных местах, создавая таким образом разнообразные «вторичные» siRNA. Они, в свою очередь, формируют комплексы RISC и обеспечивают полную деградацию чужой, т. е. вирусной, мРНК. Такие «вторичные» молекулы смогут специфично связываться не только с тем участком вирусной мРНК, к которому была направлена «первичная» молекула, но и с другими участками, что резко усиливает эффективность клеточной защиты.

Таким образом, у растений и низших животных организмов siRNA являются важным звеном своеобразного внутриклеточного иммунитета, позволяющего распознавать и быстро уничтожать чужую РНК. Если в клетку проникнет РНК-содержащий вирус, такая система защиты не даст ему размножиться. Если же вирусный геном представлен ДНК, система siRNA будет препятствовать образованию вирусных белков путем распознавания и разрезания необходимой для этого вирусной мРНК, образующейся в ходе транскрипции.

У млекопитающих, в отличие от насекомых и растений, отобрана другая система защиты. При попадании в дифференцированную клетку млекопитающего чужой РНК, длина которой больше 30 нуклеотидов, клетка начинает синтез интерферона. Интерферон, связываясь со специфическими рецепторами на клеточной поверхности, способен активировать в клетке целую группу генов. В результате в клетке синтезируется несколько видов ферментов, которые тормозят синтез белков и расщепляют вирусные РНК. Кроме того, интерферон может действовать и на соседние, еще не зараженные клетки, блокируя тем самым возможное распространение вируса.

Системы защиты различаются тем, что если интерферон при первых признаках вторжения «замораживает» работу клетки, блокируя производство многих, в том числе и обыч-

ных, клеточных белков, то система siRNA отличается чрезвычайной разборчивостью: каждая siRNA распознает и уничтожает только свою, специфическую мРНК. Замена всего лишь одного нуклеотида в последовательности siRNA ведет к резкому снижению эффекта интерференции. Ни один из известных до сих пор блокаторов генов не обладает такой исключительной специфичностью по отношению к своему гену-мишени.

**Фундаментальное значение открытия siRNA:**

1. В ходе проекта «Геном человека» выяснилось, что «смысловые» участки ДНК, содержащие гены, кодирующие информацию о белках, занимают лишь 1 % генома. Около 99 % последовательностей ДНК генома человека относят к некодирующей ДНК (называемой иногда мусорной (junk DNA)), которая не экспрессируется, т. е. не имеет выражения в белке. В основном это многократно повторяющиеся некодирующие последовательности нуклеотидов. Из общего количества материала, содержащегося в хромосомах человека, 34 % приходится на долю элементов, называемых LINEs и SINEs (соответственно, Long и Short Interspersed Nuclear Elements), о функциях которых известно только то, что они могут время от времени копировать себя и перемещаться с одного места хромосомы в другое; те участки ДНК, которые достались геному человека от ретровирусов (8 % генома) и транспозоны (3 %), также способны менять свое место в геноме. Большинство исследователей считают все эти повторяющиеся последовательности некодирующей ДНК остатками древних вирусов, в незапамятные времена встроивших свой генетический материал в геномы живых организмов, в том числе и человека. Элементы LINEs, SINEs, остатки ретровирусной ДНК и транспозоны, за свою способность к перемещениям именуемые подвижными, или мобильными, генетическими элементами, представляют значительную опасность для хромосом человека. Некоторые из них — остатки вирусов, или протоонкогены, — способны при «включении» индуцировать рак; мобильные генетические элементы, размножаясь и перемещаясь, изменяют структуру хромосом, что может привести к мутациям. Например, у *Drosophylla melanogaster* более 80 % спонтанных мутаций возникают именно из-за необычного поведения ее соб-

ственных мобильных элементов. Предполагают, что *siRNA* способны управлять поведением мобильных элементов. На модели *C. elegans* было показано, что отключение генов, кодирующих некоторые из малых РНК, ведет к активизации перемещений мобильных элементов в его хромосомах и, соответственно, к повышению уровня мутаций.

2. Ошибки в развитии органов и тканей у подопытных животных, обнаруживаемые при отключении генов, кодирующих систему *siRNA*, а также высокая активность системы *siRNA* в недифференцированных клетках указывают на то, что механизм РНК-интерференции активно участвует в регуляции программы «созревания» клеток. Таким образом, процесс РНК-интерференции, возможно, играет одну из ключевых ролей в формировании целостного организма.

3. Предполагают наличие важной эволюционной функции *siRNA* — возможности выявления неправильно обработанных копий других типов РНК в клетке.

4. В 2002 г. установлено, что действие *siRNA* может не ограничиваться лишь временным выключением генов на уровне РНК. Имеются указания на то, что в некоторых случаях *siRNA*, видимо, воздействуют на ДНК прямо, изменяя структуру хроматина и способствуя длительному «замолчанию» одних и, возможно, активизации других генов.

### **Практическое значение открытия *siRNA*:**

1. Использование *siRNA* для терапии вирусных заболеваний, включая ВИЧ. Для того чтобы использовать механизм *siRNA*-интерференции в клетках млекопитающих, в клетки нужно ввести уже готовые двухцепочечные молекулы *siRNA*. Оптимальный размер таких синтетических *siRNA* должен составлять 21–28 нуклеотидов. Если увеличить ее длину, клетки ответят выработкой интерферона и снижением синтеза белка. Такие синтетические двухцепочечные РНК могут попасть как в зараженные, так и в здоровые клетки, и снижение синтеза белков в незараженных клетках окажется крайне нежелательным. В то же время, если попытаться применять *siRNA* меньшие, чем 21 нуклеотид, резко снижаются специфичность ее связывания с нужной мРНК и способность к формированию комплексов RISC.

2. Молекулярные биологи полагают, что так же, как и ВИЧ, можно блокировать на молекулярном уровне развитие и других заболеваний, в том числе опухолевых и инфекционных. Уже известны структура генов и, соответственно, структура мРНК многих мутантных молекул, которые участвуют, а иногда, как предполагается, и запускают развитие некоторых видов рака. Блокировав мРНК таких молекул с помощью РНК-интерференции, можно добиться по крайней мере ослабления прогрессирования заболевания.

Однако все указанное относится лишь к области теории. На практике терапия siRNA встречается с затруднениями, обойти которые ученым пока не удастся. Главным препятствием на пути разработки лекарств на основе siRNA являются сложности их доставки в клетки-мишени в пределах целого организма.

Самым важным направлением в использовании siRNA считают бурно развивающуюся отрасль биологической науки — функциональную геномику. После описания геномов многих животных и человека встала очередная глобальная задача: выяснить роль каждого гена. Одним из основных инструментов, применяемых генетиками для ее решения, является «выключение» гена. Действительно, чтобы хотя бы в первом приближении оценить функцию гена, нужно посмотреть, как поведет себя клетка без него, какие биохимические процессы при этом нарушаются. Именно в этом siRNA явились для генетиков неоценимой находкой. Если раньше на поиски удачного способа блокирования гена или приведения его в действие требовалось от нескольких месяцев до года, то с помощью siRNA практически с любым геном любого организма, последовательность нуклеотидов которого известна, эту процедуру можно осуществить в течение 1–2 недель, значительно повысив при этом специфичность блокирования [9], [17].

### 2.2.3. Аминокислоты и пептиды

Аминокислоты и их полимеры также могут играть биосинтетическую и каталитическую роли в процессе эволюции. В раннем мире РНК увеличивающиеся популяции реплицирующихся молекул РНК потребляли строительные блоки РНК,

которые производились в течение длительного времени с помощью предбиотических реакций. Нехватка этих субстратов индуцировала развитие альтернативных механизмов для их синтеза. Возможно большое количество таких путей. Некоторые из биосинтетических путей, сохранившихся у современных организмов, могут пролить свет на биохимическую эволюцию живых организмов. Поразительное наблюдение состоит в том, что простые аминокислоты используются как строительные блоки для азотистых оснований РНК и ДНК.

Аминокислоты белков химически более универсальны, чем азотистые основания нуклеиновых кислот, потому что их боковые цепи (радикалы) обладают более широким спектром химических взаимодействий. Таким образом, аминокислоты или короткие полимеры аминокислот, связанные пептидными связями и названные олигопептидами, возможно, функционировали как компоненты рибозимов, чтобы обеспечить специфическую активность. Более длинные полипептиды способны к спонтанному сворачиванию для формирования трехмерных (третичных) структур, определенных последовательностью аминокислот в полипептидных цепях. Именно через формирование третичных структур реализуется функция белков, а совокупность функционирующих белков определяет фенотип организма. Способность полипептидов спонтанно сворачиваться в сложные структуры, которые вступают в высокоспецифичные химические взаимодействия с другими молекулами, возможно, могли содействовать расширению их роли на начальных этапах эволюции. Появление клеток и многоклеточных организмов сопровождалось усложнением механизмов формирования третичных структур белков с помощью белков теплового шока (шаперонов) и протеасомного аппарата, а также развитием механизмов выбраковки белков с «неправильной» третичной структурой. Итак, именно третичная структура и функция были более консервативными признаками, а первичная структура белка за счет изменений обеспечивала поддержание необходимой функции в изменяющихся условиях существования живых объектов. Сегодня большинство биологических катализаторов (ферментов) являются не нуклеиновыми кислотами, а большими полипептидами, названными белками.

## 2.3. Матричные синтезы и эволюция

Синтез полипептида с использованием мРНК связывает мир РНК и мир белков. Полипептиды могли играть только ограниченную роль в эволюции, поскольку их структуры не подходят для саморепликации, как нуклеиновые кислоты. Однако полипептиды, вероятно, были включены в эволюционные процессы косвенно. Например, рассмотрим возможную последовательность событий: 1) специфический полипептид определял выживание живого объекта и класс РНК-молекул; 2) эти РНК-молекулы приобрели свойства рибозимов; 3) возникшие рибозимы помогли синтезу исходного специфического полипептида.

Такой метод создания полипептидов с определенными последовательностями аминокислот имеет несколько ограничений. Во-первых, вероятно, только относительно короткие специфические полипептиды могли быть синтезированы этим способом. Во-вторых, было бы трудно найти место аминокислоты в полипептиде. В-третьих, для каждого полипептида требовался бы специфический рибозим. Критическая точка в эволюции была достигнута, когда развился аппарат для синтеза полипептида, который позволил через последовательности оснований в молекуле РНК непосредственно определять последовательность аминокислот в полипептиде. Возник код, который установил отношение между определенной последовательностью трех оснований в РНК и аминокислотой, называемый *генетическим кодом*. Система для расшифровывания генетического кода, или трансляция, в современных организмах включает рибосомы, перемещающиеся по мРНК, а также регуляторные факторы и ферменты, которые отвечают за синтез полипептидов с матрицы РНК.

Молекула РНК (мессенджер РНК — мРНК или информационная РНК — иРНК), содержащая в последовательности оснований информацию о специфичности белка, действует как матрица для прямого синтеза полипептида (первичной структуры белка). Каждая аминокислота прикрепляется к адаптерной молекуле и транспортируется к матрице (мРНК). Этими адаптерами являются специализированные молекулы РНК, называемые транспортными РНК, или тРНК. Транспортные



РНК имеют триплет нуклеотидов — антикодон, комплементарный соответствующему кодону мРНК, а на 3'-конце молекулы присоединяется аминокислота в соответствии с генетическим кодом. Такая структура называется «аминоацил-тРНК» (aa-тРНК). После инициации полипептидной цепи молекула aa-тРНК соединяется с матрицей с помощью специфических взаимодействий Уотсона — Крика. Две такие молекулы связываются с рибосомой, и образование пептидной связи катализируется РНК-компонентом рибосомы (рРНК). Таким образом синтезируется дипептидил-тРНК. Первая тРНК (не связанная ни с полипептидной цепью, ни с аминокислотой) удаляется, а дипептидил-тРНК перемещается на один триплет в рибосоме, освобождая следующий кодон мРНК для присоединения соответствующей aa-тРНК. Растущая полипептидная цепь переносится на новую аминокислоту с образованием новой пептидной связи. Затем цикл повторяется. Эта схема позволяет по последовательности мРНК кодировать последовательность полипептида и делает возможным образование длинного полипептида со специфической последовательностью. Важно, что рибосома в значительной степени состоит из РНК и является по сути сложным рибозимом. Не исключено, что это может быть выжившим остатком мира РНК. Завершая этот материал, следует с уверенностью констатировать, что генетический код и матричные синтезы сейчас являются оптимальными инструментами для объяснения эволюции живых организмов.

## 2.4. Структура белков и эволюция

Подобно членам семьи человека, члены молекулярных семей часто имеют общие признаки. Такое семейное сходство наиболее легко определяется сравнением третичной структуры — свойства молекулы, которое наиболее тесно связано с функцией. Сравнение, например, рибонуклеазы коров и человека показало близость их третичных структур (рис. 2.8, см. также цветную вклейку между с. 96–97). Хотя это сходство не является неожиданным, учитывая однотипность биологической функции, иногда это кажется удивительным. Например,

ангиогенин (белок, стимулирующий рост новых кровеносных сосудов) также оказывается структурно похож на рибонуклеазу, что говорит о том, что ангиогенин и рибонуклеаза являются членами одного и того же семейства белков. Ангиогенин и рибонуклеаза должны были иметь общего предка на более ранней стадии эволюции.



*Рис. 2.8.* Структуры рибонуклеазы коровы, человека и ангиогенина [17]

К сожалению, третичные структуры определены только для относительно небольшого количества белков. Напротив, последовательности генов и соответствующие последовательности аминокислот известны для большого количества белков благодаря возможностям клонирования ДНК и методам секвенирования. Эволюционные отношения также проявляются в аминокислотной последовательности. Например, сравнение аминокислотной последовательности рибонуклеазы коровы и ангиогенина показало, что 35 % аминокислот в соответствующих положениях идентичны. Достаточно ли высок этот уровень, чтобы гарантировать эволюционные отношения? Если нет, какой уровень требуется? Чтобы ответить на эти вопросы, рассмотрим методы, которые используются для сравнения последовательностей аминокислот и доказательства эволюционных отношений.

*Методы выравнивания последовательностей* стали мощным инструментом в современной биохимии. Последовательности аминокислот белков баз данных можно сравнить с последовательностями аминокислот недавно расшифрованных белков. Эта информация используется для понимания функции и механизма действия молекул с недавно открытыми последовательностями через построение и сравнение третичных структур сравниваемых белков.

Суть исследований биохимической эволюции состоит в определении изменений белков, других молекул и биохимических путей с течением времени. Главное фундаментальное отношение между двумя объектами — гомология (соответствие), две молекулы являются гомологичными, если они происходят от общего предка. Гомологичные молекулы, или гомологи, делятся на два класса (рис. 2.9): *паралоги* — гомологи, которые присутствуют у одного вида и часто различаются по детальным биохимическим функциям, и *ортологи* — гомологи, которые присутствуют у различных видов и имеют очень похожие или идентичные функции. Понимание гомологии между молекулами может показать эволюционную историю молекул и дать информацию об их функциях: если вновь описанный белок является гомологом уже охарактеризованного протеина, мы можем говорить о биохимической функции нового белка.

Гомология часто проявляется значительным соответствием в нуклеотидной или аминокислотной последовательности и почти всегда проявляется соответствием третичной структуры.

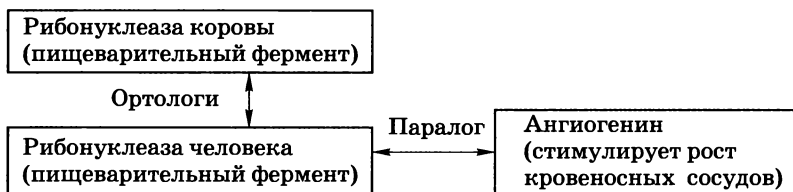


Рис. 2.9. Классы гомологов

Статистическим анализом выравнивания последовательностей можно определить гомологию. Значительное сходство последовательностей между двумя молекулами подразумевает, что они, вероятно, будут происходить из одного эволюционного источника, иметь похожую трехмерную структуру, функцию и механизм действия. Для определения гомологии сравнивают последовательности нуклеотидов в нуклеиновых кислотах и аминокислот в белках. Однако сравнение последовательностей аминокислот в белках является более эффективным, поскольку белки построены из 20 различных строительных блоков-аминокислот, тогда как РНК и ДНК синтезируются только из четырех строительных блоков-нуклеотидов.

Для иллюстрации методов сравнения последовательностей рассмотрим класс белков, называемый *глобинами*. Миоглобин является белком, который связывает кислород в мышце, гемоглобин является белком — переносчиком кислорода в крови. Оба белка имеют гем — железосодержащую тетрапиррольную структуру, которая связывает кислород. Каждая молекула гемоглобина человека состоит из четырех полипептидных цепей, содержащих гем: двух идентичных  $\alpha$ -цепей и двух идентичных  $\beta$ -цепей. Сравним аминокислотную последовательность  $\alpha$ -цепей гемоглобина и миоглобина. Для определения сходства использовались методы *выравнивания последовательностей* (рис. 2.10, последовательности представлены с помощью однобуквенного обозначения аминокислот).

*a*

VLSPADKTNVKAAWGKVGANHAGEYGAERALERMFLSFPTTKTYFPHFDLSHG  
SAQVKGHGKKVADALTNAVAHVDDMPNALSALSSDLHANLKLKRVDPVNFKLLS  
HCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLTKFLASVSTVLTSKYR

*б*

GLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEVLRIRLFKGHHPETLEKFDKFKHLKS  
EDEMKAESDLKKNHATVLTALGGILKKGHNHEAEIKPLAQSHATKHKIPVK  
YLEFISECIQVLQSKHPGDGFADAQGAMNKALELFRKDMASNYKELGFQG

Рис. 2.10. Аминокислотная последовательность:

*a* —  $\alpha$ -цепи гемоглобина; *б* — миоглобина

Простейшим подходом в этих методах является сравнение всех возможных сопоставлений последовательности аминокислот одного белка с другим с записью в каждом случае количества идентичных остатков аминокислот, которые сопоставляются одна с другой. Сравнение может быть выполнено также простым смещением одной последовательности относительно другой в каждом случае на одну аминокислоту и подсчетом количества подобранных идентичных остатков (рис. 2.11, см. также цветную вклейку между с. 96–97). На рисунке сравнение проводится путем скольжения последовательностей двух белков относительно друг друга (каждый раз сдвиг на одну аминокислоту) и подсчета числа идентичных аминокислот между белками. На графике показаны две последовательности с наибольшим числом соответствий, на котором точки соответствий являются функцией выравнивания.

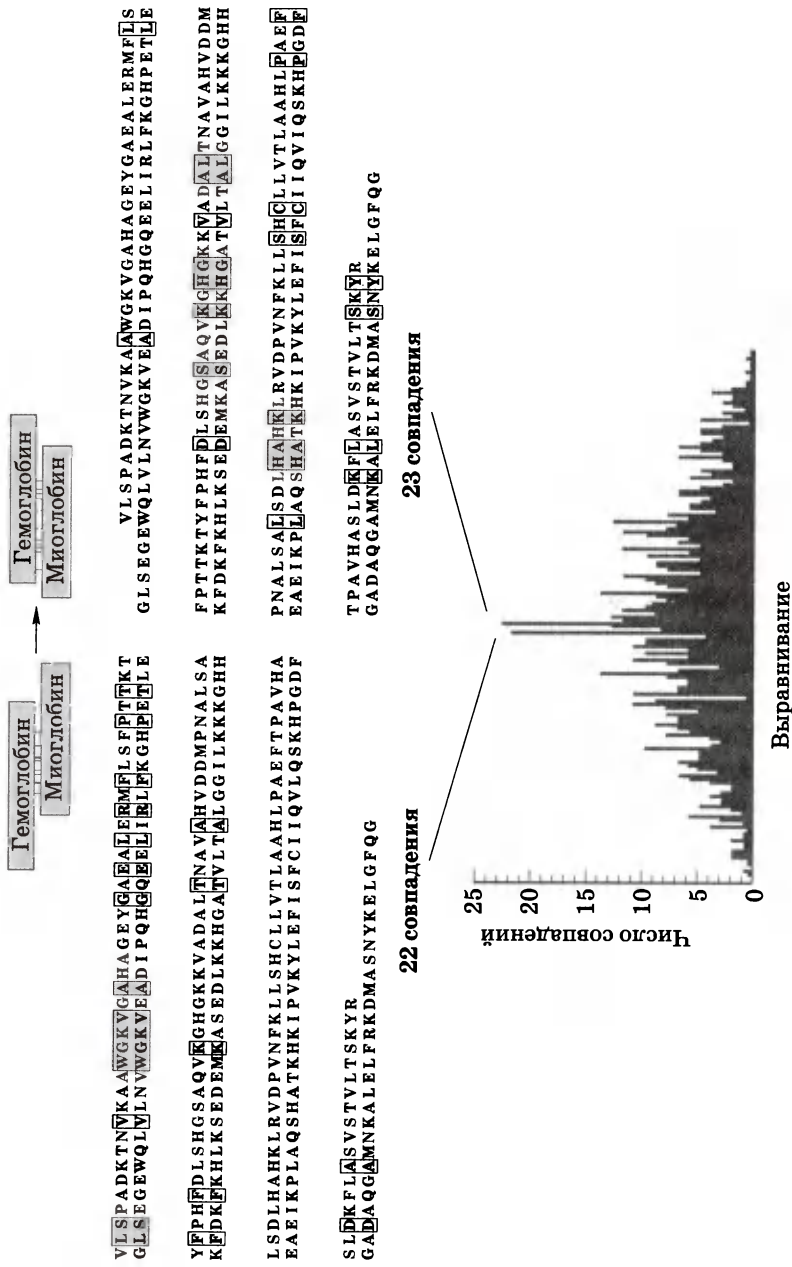


Рис. 2.11. Сравнение аминокислотных последовательностей  $\alpha$ -цепи гемоглобина и миоглобина [17]

Для  $\alpha$ -цепи гемоглобина и миоглобина при наилучшем выравнивании обнаруживаются 23 идентичные последовательности, распространенные по их центральной части. Однако выравнивание, показавшее 22 совпадения, также можно оценить как хорошее. В этом выравнивании идентичные остатки сконцентрированы в направлении N-конца последовательностей.

Последовательности могут быть выровнены так, чтобы захватить большинство идентичных сходств в *обоих* выравниваниях введением пробелов (*Gap, инделы*) в одну из последовательностей (рис. 2.12, см. также цветную вставку между с. 96–97). Такие пробелы должны вставляться часто, чтобы компенсировать вставки или удаления нуклеотидов, которые, возможно, в ходе развития появляются в гене одной молекулы.

```

V L S P A D K T N V K A A W G K V G A H A G E Y G A E A L E R M F L S F P T T K T Y F P H F D
G L S E G E W Q L V L N V W G K V E A D I P Q H G Q E E L I R L F K G H P E T L E K F D K F K H L K S E D

L S H G S A Q V K G H G K K V A D A L T N A V A H V D D M P N A L S A L S D I H A H K L R V D P V N K K L
E M K A S E D L K K H G A T V L T A L G G I L K K K G H N E A E I K P L A Q S H A T K H K I P V K Y L E F

L S H C L L V T L A A H L P A E F T F A V H A S L D K F L A S V S T V L T S K Y R L L G F Q G
I S F C I I Q V L Q S K H P G D F G A D A Q G A M N K A E L L F R K D M A S N Y K E L L G F Q G

```

Рис. 2.12. Выравнивание  $\alpha$ -цепи гемоглобина и миоглобина после вставки пробела в  $\alpha$ -последовательность гемоглобина [17]

Использование пробелов существенно повышает сложность выравнивания последовательностей, и введение пробелов произвольных размеров должно рассматриваться в контексте каждой последовательности. Были разработаны методы для введения пробелов при автоматическом выравнивании последовательностей. В этих методах используются балльные системы для сравнения различных выравниваний с присуждением штрафов за пробелы, чтобы предотвратить включение неприемлемого их количества. Например, при каждой идентичности между выравниваемыми последовательностями дается 10 баллов, а за каждый введенный пробел, независимо от размера, отнимается 25 баллов. Для выравнивания, показанного на рис. 2.12 (38 совпадений и 1 вставка), получаем результат  $[(38 \cdot 10) - (1 \cdot 25)] = 355$ . Итак, здесь 38 совпавших аминокислот со средней длиной

147 остатков, т. е. последовательности идентичны на 25,9 %. Но является ли данный процент идентичности значимым? Специальными компьютерными методами тасования и повторного выравнивания было сделано заключение, что сравниваемые последовательности миоглобина и  $\alpha$ -цепи гемоглобина являются *подлинно подобными*. Самое простое объяснение заключается в том, что обе эти последовательности являются гомологами и сравниваемые молекулы произошли путем дивергенции *от общего предка*. Подобные исследования с анализом последовательностей привели к развитию простых правил. О последовательностях длиной более 100 аминокислот при их схожести более чем на 25 % можно уверенно сказать, что такие белки гомологичны. Если две последовательности идентичны менее чем на 15%, одно парное сравнение является маловероятным, чтобы показать статистически значимую схожесть. Для последовательностей, имеющих идентичность между 15 и 25 %, необходим дальнейший анализ с целью определения статистической значимости сравнений. Однако потеря статистической достоверности степени схожести последовательностей абсолютно не исключает гомологии белков. Последовательности многих белков, которые произошли от общих предков, дивергировали так, что их гомологичность не может определяться только на основе анализа их последовательностей. Гомологию таких белков доказывают исследованием их третичной структуры.

Следует отметить, что не все замены аминокислот в сравниваемых белках являются равноценными: *консервативные замены* — это замены похожих по размеру и химическим свойствам аминокислот (оказывают незначительное действие на структурно-функциональные свойства белков); более значимые различия регистрируются, если происходят замены аминокислот, оказывающих существенное влияние на формирование третичной структуры белков (возникают различия в активных центрах ферментов, центрах связывания лигандов и т. п.). Для оценки степени гомологичности белков далеко отстоящих друг от друга видов используют более сложные статистические методы сравнения замен аминокислотных остатков, например, в зависимости от полярности их радикалов.

Поскольку трехмерная структура более тесно связана с функцией, чем последовательность аминокислот, третичная структура более значима в эволюционном отношении, чем первичная. Этот консерватизм прослеживается в третичной структуре глобинов (рис. 2.13, см. также цветную вклейку между с. 96–97), которые являются очень схожими даже при том, что подобие между миоглобином человека и леггемоглобином люпина является слабо определяемым на уровне последовательности аминокислот.

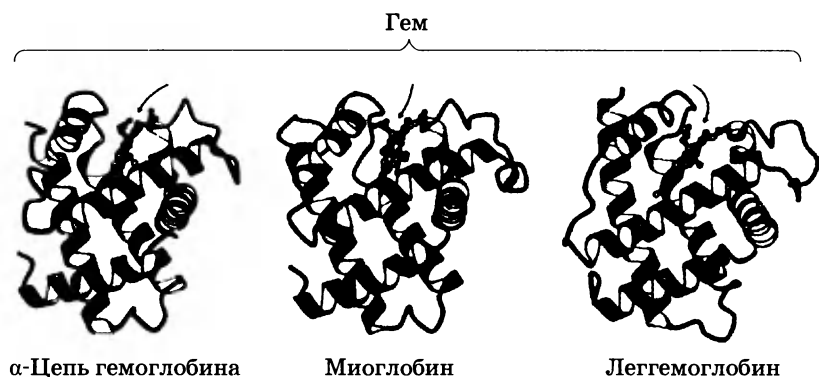


Рис. 2.13. Консерватизм трехмерной структуры [17]

Сходство между  $\alpha$ -цепью гемоглобина человека и леггемоглобином люпина статистически не достоверно (15,5 % идентичности). Структурное сходство третичных структур доказывает, что структура, которая содержит гем и облегчает обратимое связывание кислорода, сохранялась в течение длительного периода эволюции.

В ряде наблюдений показано, что при сравнении третичных структур белков можно обнаружить поразительное сходство, хотя эти белки функционально не связаны. Примерами таких белков являются актин, главный компонент цитоскелета, и белок теплового шока 70 (Hsp-70), который отвечает за фолдинг белка внутри клетки. Эти два белка очень схожи по структуре, несмотря на всего лишь 15,6 % идентичности (рис. 2.14, см. также цветную вклейку между с. 96–97).





Рис. 2.14. Структуры актина и большого фрагмента Hsp-70 [17]

Актин и Hsp-70 являются паралогами. Уровень структурного подобия предполагает, что, несмотря на различную биологическую роль в современных организмах, эти белки произошли от общего предка.

Оценка семейств гомологичных белков, для которых известна по крайней мере одна трехмерная структура, показала, что более консервативны области и остатки, важные для функции белка. Например, каждый тип глобина содержит связанный гем с атомом железа в центре. Остаток гистидина, который непосредственно взаимодействует с этим атомом железа (64-й остаток в миоглобине человека), является консервативным у всех глобинов. После идентификации ключевых остатков или высококонсервативных последовательностей внутри семейства белков можно иногда идентифицировать других членов семейства, даже когда полный уровень сходства ниже статистической достоверности. Таким образом, получение шаблонов последовательностей — консервативных остатков, которые структурно и функционально важны и характерны для определенного семейства белков, может быть использовано для выявления новых членов семейства, которые нельзя обнаружить другими методами.

Более 10 % всех белков содержат наборы двух или более областей, подобных друг другу. Описанные ранее методы изучения последовательности часто обнаруживают внутренние повторяющиеся последовательности, которые охарактеризованы

в других белках. Выделяют дивергентную эволюцию белков, происходящих от общего предка, и конвергентную эволюцию белков, имеющих разных предков. Можно построить эволюционные деревья на основании информации о последовательностях аминокислот гомологичных белков. Такие эволюционные деревья — имитация эволюции. Гомология часто проявляется как схожесть последовательностей, это позволяет предполагать, что эволюционные пути членов семейства белков могут быть изучены в ходе исследования схожести последовательностей. Последовательности, наиболее похожие одна на другую, имеют меньшее эволюционное время для дивергенции, чем последовательности с большим числом различий (рис. 2.15).

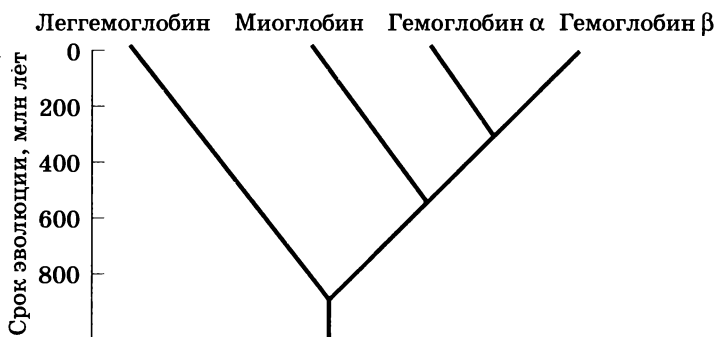


Рис. 2.15. Эволюционное дерево глобинов

На рисунке видно, что дивергенция миоглобина потребовала в два раза больше времени по сравнению с дивергенцией  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей глобина. Как можно оценить приблизительные даты дубликации генов и других эволюционных признаков? Эволюционные деревья могут быть калиброваны путем сравнения времен точек ветвления со временем дивергенции, определенным археологическими методами. Например, дубликация, приводящая к образованию двух цепей гемоглобина, наблюдалась 350 млн лет назад. Эта оценка подтверждается следующим наблюдением: бесчелюстные рыбы, такие как *lamprey*, дивергировали от костных рыб приблизительно 400 млн лет назад и имели гемоглобины, построенные только из одного типа субъединиц. Другой пример: анализ РНК-последовательности по-

зволил сделать предположение, что *Archaea* является отдельной группой организмов, которые дивергировали из бактерий очень рано в эволюционной истории.

Какое практическое значение могут иметь биохимические методы молекулярной эволюции для биологии и медицины? В Беларуси, как и в большинстве стран СНГ, лишь несколько групп ученых работают в рамках компьютерного моделирования. Выражение *in silico* было впервые введено в оборот математиком Педро Мирамонтес относительно недавно — в 1989 г. Оно было применено для обозначения биологических экспериментов, полностью проведенных на компьютере (компетенция международного журнала «*In Silico Biology*»).

Биоинформатика и молекулярное моделирование — одни из наиболее стремительно развивающихся дисциплин компьютерной биологии. В последнее десятилетие завершение геномных проектов, следующих один за другим, фактически избавило исследователей от рутины классического выявления последовательностей аминокислот в белках. Теперь последовательности белков чаще конвертируются с помощью генетического кода из прочтенных геномов множества организмов в аннотированные базы данных, доступные через Интернет. Так, число последовательностей в базе Swiss-Prot составляет около миллиона, а число записей в базе TrEMBL приближается к шести миллионам. Установлено, что многие белки имеют типичные мотивы пространственной организации, т. е. принадлежат к различным семействам, образуя «родственные» группы. Все белки с известной структурой подразделяются примерно на 3 500 структурных семейств, образующих около 1000 типов пространственной укладки (согласно классификации SCOP — Structural Classification of Proteins).

В конце 2011 г. была успешно защищена диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук В.В. Хрусталевым «Биохимические и эволюционные аспекты мутационного давления в геномах прокариот и вирусов». Она посвящена разработке практического использования теории направленного мутационного давления Н. Суеока (1988), а именно теоретическому обоснованию и практической разработ-

ке методов лабораторной диагностики и профилактики ВИЧ-инфекции. По данным ВОЗ, с момента открытия вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) в 1981 г. от ВИЧ-инфекции погибло более 30 млн человек. В течение года от 2 до 3 млн человек заражаются ВИЧ. Из-за высокого уровня изменчивости вирус легко уходит от иммунного ответа, многие штаммы ВИЧ приобретают устойчивость к дорогостоящей пожизненной антиретровирусной терапии. Наиболее успешный вариант вакцины против ВИЧ-1 продемонстрировал всего лишь 30% -ю эффективность при иммунизации группы волонтеров. В связи с этим поиск новых антигенов для включения в состав вакцины против ВИЧ-1 является весьма насболевшей задачей исследования. С позиций вакцинологии и вирусологии актуальным является выделение наименее мутабельного участка поверхностных белков ВИЧ-1 и доказательство наличия у него антигенных свойств, а с позиций биохимии и молекулярной эволюции — создание самого метода выделения наименее мутабельных фрагментов белков на основе теории мутационного давления.

Научная значимость проведенного молодым белорусским ученым исследования обусловлена следующими результатами:

- Доказано, что мутационное ГЦ-давление способствует, а мутационное АТ-давление препятствует:
- увеличению процента аминокислотных остатков, экспонированных водному окружению, а также входящих в состав линейных и конформационных В-клеточных эпитопов;
- снижению частоты сайтов для N-гликозилирования, фосфорилирования, ацетилирования и убиквитинилирования;
- снижению общих частот использования гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков за счет увеличения частоты использования амфифильных.

• Найден критерий силы мутационного давления в геноме микроорганизма. Охарактеризован вклад каждого аминокислотного остатка, кодирующегося ГЦ-богатыми кодонами, в рост общей частоты использования GARP (глицин, аланин, аргинин, пролин) при мутационном ГЦ-давлении, а также вклад каждого аминокислотного остатка, кодирующегося ГЦ-бедными кодонами, в рост общей частоты использования

FYMINK (фенилаланин, тирозин, метионин, изолейцин, аспарагин, лизин) при мутационном АТ-давлении. Сделано заключение, что геном общего эволюционного предшественника современных архей подвергался сильному АТ-давлению, а геном предшественника бактерий — сильному ГЦ-давлению, что, возможно, привело к уменьшению степени сходства между генами и белками этих групп прокариот.

- Создан метод выделения наименее мутабельных участков белков, основанный на теории направленного мутационного давления:

- выделен наименее мутабельный фрагмент белка gp120 ВИЧ-1, консенсусная последовательность которого была использована при синтезе нового пептида NQ21; антигенные свойства пептида NQ21 были подтверждены результатами иммуноферментного анализа и аффинной хроматографии с последующим электрофорезом очищенных антител в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и меркаптоэтанола;

- с помощью метода определения механизма нуклеотидных замен в генах изучены особенности мутагенеза вируса краснухи и мутагенеза в гене *tox*, кодирующем дифтерийный токсин, с последующим выделением наименее мутабельного В-клеточного эпитопа.

На основании проведенных исследований В.В. Хрусталева разработал:

- рекомендацию к применению пептида NQ21 (как конъюгированного с биотином, так и неконъюгированного) в качестве основного антигена при создании иммуноферментных систем для определения титра антител, обладающих цитотоксической активностью в крови ВИЧ-1-инфицированных;

- рекомендацию к использованию уровня мутабельности V3-петли белка gp120 ВИЧ-1 в качестве прогностического критерия скорости развития СПИД;

- рекомендацию к применению синтезированного пептида NQ21 в качестве нового компонента вакцины против ВИЧ-1, позволяющего преодолеть крайне высокую изменчивость вируса.

## 2.5. Молекулярные механизмы возникновения многоклеточности

Первые организмы были исключительно одноклеточными. Они взаимодействовали друг с другом только косвенно, конкурируя за источники существования. У этих организмов развивалась способность формировать колонии, включающие большое количество взаимодействующих клеток. В таких группах окружающая среда клеток определялась наличием соседних клеток, которые могли вступать в непосредственный контакт друг с другом. Эти клетки взаимодействовали с помощью различных сигнальных механизмов и могли отвечать на сигналы изменением активности ферментов или уровня экспрессии генов. Одним из результатов такого взаимодействия могла быть *клеточная дифференцировка*. Дифференцированные клетки являлись генетически идентичными, но имели различные свойства, поскольку степень экспрессии их генов различна. Некоторые из современных организмов сохранили способность обратимого перехода от существования в виде независимых одиночных клеток в многоклеточные колонии дифференцированных клеток. Одним из таких организмов является плесневый грибок *Dictyostelium*. В благоприятных условиях этот организм живет как индивидуальная клетка, а в условиях голодания клетки формируют клеточные агрегаты. Эти агрегаты могут перемещаться в потенциально более благоприятную среду, где затем формируются многоклеточные структуры, называемые *fruiting body*, размер которых значительно превышает поверхность, на которой клетки растут. Ветер может переносить клетки, освобожденные с поверхности *fruiting body*, к месту, где пища более доступна. По прибытии в благоприятное место клетки растут, размножаются и живут как индивидуальные до тех пор, пока не будут исчерпаны запасы пищи.

Переход от одноклеточного к многоклеточному росту явился пусковым моментом формирования клеточных коммуникаций и потребовал совершенствования внутри- и межклеточного сигналинга. В условиях голодания клетки *Dictyostelium* высвобождают сигнальную молекулу — *циклический АМФ*

(цАМФ). Эта молекула сигнализирует соседним клеткам, связываясь с мембранными рецепторами на их поверхности. Связывание молекулы цАМФ с этими рецепторами запускает несколько ответов, включая движение в направлении высокой концентрации цАМФ, а также образование и высвобождение дополнительного количества молекул цАМФ. Клетки агрегируют в соответствии с градиентом цАМФ. Контактывая, они обмениваются дополнительными сигналами и затем дифференцируются в различные типы клеток, каждый из которых экспрессирует гены, соответствующие их окончательной роли в *fruiting body*. Жизненный цикл организмов, таких как *Dictyostelium*, предвещал эволюцию организмов, которые являлись многоклеточными в процессе всей жизни. Интересно отметить, что сигнальная роль цАМФ в процессе голодания сохранилась у многих организмов, включая человека.

Исследование ископаемых показало, что макроскопические многоклеточные организмы появились приблизительно 600 млн лет назад. Большинство высших организмов состоит из множества клеток. Например, организм взрослого человека построен приблизительно из 100 000 000 000 000 клеток. Формирование многоклеточного организма возможно лишь при наличии дифференцировки клеток. Клеточный состав разных тканей и органов не похожий, хотя количество идентичной ДНК в каждой соматической клетке одинаково. Различия между типами клеток являются результатом несходства в экспрессии генов. При изучении нематоды *C. elegans*, организма длиной около 1 мм, содержащего 959 клеток, было установлено, что формирование многоклеточного организма требует не только деления и дифференцировки клеток, но и запрограммированной гибели части из них по механизмам апоптоза в процессе жизни.

Все организмы Земли имеют общее происхождение. Как могли сложные организмы, такие как человек, начать развиваться из простых организмов, которые существовали при зарождении жизни? Эволюция биохимической и физиологической сложности стала возможной вследствие эффектов *дубликации генов*, сопровождаемой *специализацией*. Рассмо-

трим, например, ферменты протеинкиназы, которые переносят фосфатную группу от АТФ к специфическим аминокислотным остаткам в белках. Эти ферменты играют ключевую роль во многих сигнальных путях, в контроле клеточного роста и дифференцировки. Геном человека кодирует приблизительно 500 белков этого класса; даже относительно простой одноклеточный организм типа пивных дрожжей имеет более 100 протеиназ. И все же каждый из этих ферментов является эволюционным потомком одного древнего фермента. Таким образом, можно изучать свойства этой большой группы белков, изучая одного члена семейства. После того как свойства станут понятны, можно оценить необходимые адаптационные изменения, которые позволяют каждому члену семейства выполнять определенную функцию.

Большинство основных процессов в биологии были охарактеризованы вначале у относительно простых организмов, часто через комбинацию генетических, физиологических и биохимических исследований.

К настоящему времени выделены шесть организмов, на которых изучаются и моделируются основные эволюционные и адаптационные механизмы проявлений жизни [22]:

1. *Escherichia coli* — прокариотический организм, бактерия, обитающая в пищеварительном тракте млекопитающих. Это объект, с помощью которого были расшифрованы основы молекулярной биологии клетки, включая механизмы репликации, транскрипции и трансляции.

2. *Saccharomyces cerevisiae* — пивные дрожжи, простейший эукариотический организм (протист). Неожиданной находкой явилась гомология некоторых белков дрожжей с белками человеческих клеток. Геном этих клеток кодирует 6200 белков. Клетки способны существовать в аэробных и анаэробных условиях. Признаки контролирования репликации ДНК и клеточный цикл были сначала расшифрованы в дрожжах.

3. *Arabidopsis thaliana* — представитель рода горчичных растений, который обладает необычно малым геномом (120 млн пар оснований) для цветковых растений, коротким временем генерации, высокой продукцией семян и высотой до 10 см.



4. *Caenorhabditis elegans* — микроскопическая нематода, состоит из 959 клеток, каждая из которых развивается в соответствии с программой клеточного деления. Организм имеет прозрачную оболочку, характеризуется коротким временем генерации, что удобно для генетического анализа. Является классическим объектом для изучения механизмов апоптоза и дифференцировки клеток.

5. *Drosophila melanogaster* — плодовая мушка, классический объект для генетических исследований эукариотических организмов. Многие процессы, описывающие стадии эволюции, экспрессии генов, раннего эмбрионального развития, были объяснены результатами исследования плодовой мушки-дрозофилы.

6. *Mus musculus* — домашняя мышь, является объектом, с помощью которого исследователи могут тестировать функции специфических белков млекопитающих, повреждая гены, которые кодируют эти белки у мышей. На мышах моделируются тысячи генетических дефектов человека, изучаются особенности иммунитета, исследуются молекулярные процессы онтогенеза.

Морфологической единицей жизни является клетка. Эта концепция была сформулирована в 1838 г. М. Шлейдером и Т. Шванном, но в основе ее лежали исследования с использованием светового микроскопа, выполненные Р. Гуком в XVII в. Существует два главных типа клеток: *эукариоты* (греч. *eu* — хороший или правильный + *karyon* — ядро), имеющие ядро, ограниченное мембраной, в котором находится ДНК, и *прокариоты* (греч. *pro* — до), не имеющие ядра. Прокариоты, к которым относятся различные типы бактерий, имеют относительно простые структуры и являются одноклеточными (хотя могут образовывать нити или колонии независимых клеток). Эукариоты могут быть как многоклеточными, так и одноклеточными, имеют более сложное строение, чем прокариоты.

## 3.1. Прокариоты

В 1925 г. Э. Шаттон ввел понятия «прокариоты» и «эукариоты» и предложил выделить прокариоты в самостоятельное царство. В конце 70-х гг. прошлого века сформировалось представление, что царство прокариот следует разделить на настоящие бактерии (эубактерии) и архебактерии. Последние представляют небольшую группу прокариот, клетки которых по своему химическому составу ближе к эукариотам, чем к прокариотам.

### 3.1.1. Форма и функция

Прокариоты являются наиболее многочисленными и распространенными организмами на Земле, поскольку они изменяются и часто значительно адаптируют метаболизм к меняющимся условиям существования. Кроме обитания в привычной температуре и аэробных условиях, определенные типы бактерий могут процветать в условиях, враждебных для эукариот,

таких как определенный химический состав окружающей среды, высокая температура и отсутствие кислорода, или даже требовать их. Более того, высокая скорость репродукции прокариот (оптимально менее 20 мин на деление клетки для многих видов) позволяет им иметь преимущество в благоприятных условиях, а способность многих бактерий образовывать споры позволяет им выживать в неблагоприятных условиях.

### 3.1.2. Строение прокариот

Прокариоты, впервые обнаруженные в 1683 г. А. Левенгуком с использованием микроскопа, имеют размеры от 1 до 10 мкм. Они могут иметь 3 основные формы: сфероидальную (кокки), палочкообразную (бациллы) и спирализованного кольца (спириллы), — но для всех характерны некоторые общие признаки. Они ограничены, как все клетки, клеточной мембраной толщиной около 7 нм (плазматическая мембрана), которая состоит из липидного бислоя, содержащего интегральные белки, контролирующие прохождение молекул внутрь клетки и из нее и катализирующие различные реакции. Клетки большинства прокариот окружены ригидной, толщиной 3–25 нм, полисахаридной клеточной стенкой, главными функциями которой являются защита клетки от механического повреждения и разрыва в среде более осмотически разведенной. Некоторые бактерии упаковывают себя в гелеобразную полисахаридную капсулу, которая защищает от высших организмов. Плазматическая мембрана некоторых прокариот может складываться с образованием многослойных структур, называемых *мезосомами*. Считают, что мезосомы являются местом, где происходит репликация ДНК и другие специализированные реакции.

Прокариотическая цитоплазма (клеточное содержимое) не является гомогенной структурой. Ее одиночная хромосома (молекула ДНК, несколько копий которой может быть в быстро растущей клетке) конденсируется с образованием структуры, которая называется *нуклеоидом*. Цитоплазма содержит несколько видов РНК, различные растворимые ферменты и несколько тысяч рибосом, участвующих в синтезе белков. Многие бактериальные клетки имеют один или больше придатков,

известных как *флагеллы*, используемых для передвижения. Часть бактерий имеют нитевидные выступы, называемые *пилями*, отдельные типы которых функционируют в качестве *проводника для ДНК во время полового процесса конъюгации* (процесс, при котором ДНК переносится из одной клетки в другую) или помогают при взаимодействии бактериальной клетки с клетками организма хозяина.

Бактерия *E. coli* является биологически наиболее хорошо описанным организмом, что является результатом интенсивных биохимических и генетических исследований, проводимых в течение последних 50 лет. Клетки *E. coli* представляют собой палочки длиной 2 мкм диаметром 1 мкм. Ее ДНК имеет молекулярную массу  $2,5 \cdot 10^9$  Да, кодирует ~3000 белков, из которых только ~1000 идентифицированы, хотя не все они одновременно присутствуют в клетках. В общей сложности клетка содержит 3–6 тыс. различных типов молекул, включая белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды, липиды и разные малые молекулы и ионы (табл. 3.1).

Таблица 3.1

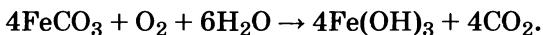
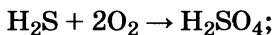
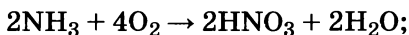
Компоненты клетки кишечной палочки

Компонент	% от массы
Вода	71
Белки	15
ДНК	1
РНК	6
Полисахариды и предшественники	3
Липиды и предшественники	2
Другие малые органические молекулы	1
Неорганические ионы	1

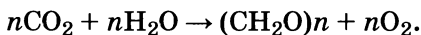
### 3.1.3. Источники метаболической энергии для прокариот

Пищевые потребности прокариот чрезвычайно разнообразны. *Автотрофы* (греч. *autos* — сам + *trophicos* — кормить) синтезируют все клеточные компоненты из простых молекул, таких как  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$  и  $H_2S$ . Они нуждаются в источнике энергии для этого синтеза и выполнения других функций.

*Хемолитотрофы* (греч. *lithos* — камень) получают энергию в результате окисления неорганических соединений, таких как  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  или даже  $\text{Fe}^{2+}$ :



*Фотоавтотрофы* получают питательные вещества через фотосинтез — процесс, при котором солнечная энергия переносит электроны от неорганического донора к  $\text{CO}_2$ , образуя углеводы  $[(\text{CH}_2\text{O})_n$  или  $\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_m$ ]. У большинства организмов, способных к фотосинтезу, донором электронов является  $\text{H}_2\text{O}$ :



Процесс фотосинтеза протекает у цианобактерий (зеленых скользких организмов, которые растут на стенках аквариумов, ранее их называли синезелеными водорослями) и растений. Полагают, что фотосинтез способствовал образованию кислорода в земной атмосфере. Некоторые виды цианобактерий способны превращать азот  $\text{N}_2$  из атмосферы в органические азотсодержащие соединения. Способность фиксировать азот обеспечивает простейшими пищевыми молекулами все организмы. За исключением потребности в небольшом количестве минеральных веществ, эти организмы могут жить, питаясь буквально солнцем и воздухом. При более примитивной форме фотосинтеза донорами электронов являются такие субстанции, как  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ , тиосульфаты или органические компоненты:



Пурпурные и зеленые фотосинтезирующие бактерии живут в свободных от кислорода средах обитания, таких как неглубокие мутные пруды, в которых  $\text{H}_2\text{S}$  образуется при гниении органических веществ.

*Гетеротрофы* (греч. *hetero* — другой) получают энергию через окисление органических веществ и, следовательно, зависят от автотрофов. облигатные аэробы (включают человека) должны получать кислород, анаэробы используют в качестве окислителей сульфаты (сульфатвосстанавливающие бактерии) или нитраты (денитрифицирующие бактерии). Многие

организмы могут частично метаболизировать различные органические соединения при внутримолекулярном окислительно-восстановительном процессе, известном как брожение. Факультативные анаэробы, такие как *E. coli*, могут расти либо в присутствии, либо в отсутствие  $O_2$ . Для облигатных анаэробов, напротив, кислород является ядом. Их метаболизм напоминает метаболизм ранних форм жизни (которые появились 3,5 млрд лет назад, когда в атмосфере Земли отсутствовал кислород).

### 3.1.4. Классификация прокариот

Традиционные методы таксономии (науки о биологической классификации, которая основана в большей степени на анатомическом сравнении современных и ископаемых организмов) неприменимы для прокариот. Это обусловлено относительно простой структурой прокариот, включая древние бактерии (их микроостатки обнаружены при раскопках и дают мало информации о филогенетических отношениях). Сложность этой проблемы подтверждается тем, что существует незначительная корреляция между формой и метаболической функцией. Более того, эукариотическое определение видов как популяции, которая может размножаться, является бессмысленными для «бесполовых» прокариот. Следовательно, схемы обычной классификации прокариот являются скорее произвольными и не содержат эволюционных взаимоотношений, как классификация эукариот.

В наиболее широко используемой классификации прокариоты делятся на две группы: *цианобактерии* и *бактерии*. Бактерии делятся на 19 групп на основе их отличительных характеристик по структуре, метаболическим особенностям и окраске.

Наиболее простая схема классификации, основанная на свойствах клеточной стенки, выделяет три типа прокариот: *микоплазмы*, *грамположительные бактерии* и *грамотрицательные бактерии*. У микоплазм отсутствует ригидная клеточная стенка. Они являются самыми маленькими из всех живых клеток (диаметр 0,12 мкм) и содержат 1/5 часть ДНК *E. coli*. Вероятно, такое количество генетической информации позволяет обеспечить необходимые метаболические процессы,

поддерживающие жизнь клетки. По Граму бактерии окрашивают анилиновыми красителями трифенилметановой группы: генциановый, метиловый фиолетовый или кристаллвиолет. Грамположительные (грам (+)) микроорганизмы дают прочное соединение с этими красителями и йодом. При этом они не обесцвечиваются при воздействии на них спиртом, вследствие чего при дополнительной окраске фуксином грам (+)-микроорганизмы не изменяют первоначально принятый фиолетовый цвет. Грамотрицательные (грам (-)) микроорганизмы образуют с основными красителями и йодом легкоразрушающиеся под воздействием спирта соединения. В результате микробы обесцвечиваются, а затем окрашиваются фуксином в красный цвет. Эта процедура предложена в 1884 г. К. Грамом. Грамположительные бактерии имеют монослойную клеточную стенку, грамотрицательные бактерии, к которым относятся цианобактерии, имеют по меньшей мере два структурно различных слоя.

Развитие методов определения аминокислотных последовательностей белков и нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК обеспечило введение новых признаков генеалогических взаимоотношений между организмами. Кроме того, данные методы позволили выразить эти отношения в количественном выражении и, таким образом, построить филогенетически обоснованную систему классификации прокариот.

Анализируя последовательность рибосомальной РНК, К. Вёзе показал, что группа прокариот, названная *архебактериями*, дистантно родственна с другими прокариотами, *зубактериями*, и обе эти группы родственны с эукариотами. Архебактерии предствлены тремя различными видами необычных организмов: *метаногенами* (облигатные анаэробы, которые продуцируют метан — болотный газ путем восстановления  $\text{CO}_2$  из  $\text{H}_2$ ), *галобактериями* (могут жить только в концентрированных солевых растворах —  $> 2\text{M NaCl}$ ) и *термоацидофилами* (организмы, которые существуют в кислых горячих источниках ( $-90^\circ\text{C}$  и  $\text{pH} < 2$ )). На основе числа фундаментальных признаков, различных у архебактерий, зубактерий и эукариотов, но являющихся общими внутри группы, К. Вёзе предположил,

что эти группы организмов составляют три первичных царства жизни (в большей степени, чем традиционное деление на прокариоты и эукариоты). Более того, наблюдение, что эти три царства являются генеалогически дистантными, предполагает, что все они произошли независимо из простых форм жизни.

## 3.2. Эукариоты

Диаметр эукариотической клетки 10–100 мкм, и их объем в тысячи и даже миллионы раз превосходит объем клеток прокариот. В клетках эукариот находятся органеллы, ограниченные мембранами и выполняющие специфические функции. Фактически структура и функция эукариотической клетки на всех уровнях организации более сложные, чем у клеток прокариот.

Эукариоты и прокариоты развивались в соответствии с фундаментально различными эволюционными стратегиями. Прокариоты использовали преимущества простоты и миниатюрности: быстрая скорость роста позволяла им занимать экологические ниши, в которых происходят радикальные колебания доступности питательных веществ. Напротив, сложность эукариот, которая обуславливает их размер и более медленный, чем у прокариот, рост, дает им преимущества при стабильности окружающей среды с ограниченными источниками питания. Однако неправильно считать прокариоты эволюционно примитивными организмами по отношению к эукариотам. Оба типа организмов хорошо адаптированы к соответствующему образу жизни.

Наиболее ранние микроископаемые эукариоты датированы ~1,4 млрд лет назад, через ~2,1 млрд лет после появления жизни. Это подтверждает классическое мнение о том, что эукариоты возникли из высокоразвитых прокариот, возможно, микоплазм. Тем не менее, различия между эукариотами и современными прокариотами являются такими глубокими, что делают эту гипотезу неправдоподобной. Возможно, ранние эукариоты, которые, согласно доказательствам К. Вёзе, произошли из первобытных форм жизни, не сохранились. Только после превращения их в сложные организмы стали образовываться значительные ископаемые остатки, доступные для исследования.



### 3.2.1. Классификация эукариот

Одной из наиболее важных характеристик эукариот является огромное морфологическое разнообразие на клеточном и организменном уровнях.

Таксономические схемы, основанные на морфологии, аминокислотной последовательности белков и последовательности нуклеотидов в нуклеиновых кислотах, показывают, что эукариоты могут быть классифицированы на три царства: грибы, растения и животные. Однако относительная структурная простота многих одноклеточных эукариот делает их классификацию по этой схеме спорной. Эти организмы относят к 4-му царству — *протисты* (простейшие одноклеточные организмы).

Анатомическое сравнение живых и ископаемых организмов показало, что различные царства многоклеточных организмов независимо произошли из протист. Программы развития, дифференцировки и развития многоклеточных эукариот при их трансформации из оплодотворенной яйцеклетки во взрослый организм демонстрируют элементы эволюции живых организмов. Например, у всех позвоночных на ранних эмбриональных стадиях развития имеются мешки, напоминающие жабры, что позволяет считать их общим предком рыбу. Кроме того, эмбрионы на ранних стадиях развития у разных организмов схожи по размеру и анатомии, несмотря на то что их взрослые формы значительно различаются. Отсюда возник довольно спорный афоризм: онтогенез повторяет филогенез. Выяснение молекулярных механизмов клеточной дифференцировки у эукариот остается одной из актуальных задач современной биохимии.

### 3.2.2. Особенности организации наследственного материала у прокариот и эукариот

Геном современных прокариотических клеток характеризуется относительно небольшими размерами. У кишечной палочки (*E. coli*) он представлен кольцевой молекулой ДНК длиной около 1 мм, которая содержит  $4 \cdot 10^6$  пар нуклеотидов, образующих около 4000 генов. Основная масса ДНК прокариот (около 95 %) активно транскрибируется в каждый данный мо-

мент. Как было сказано ранее, геном прокариотической клетки организован в виде нуклеоида — комплекса ДНК с негистоновыми белками.

У эукариот объем наследственного материала значительно больше. У дрожжей он составляет  $2,3 \cdot 10^7$  пар нуклеотидов, у человека общая длина ДНК в диплоидном хромосомном наборе клеток около 174 см. Его геном содержит  $3 \cdot 10^9$  пар нуклеотидов и включает, по последним данным, 20–25 тыс. генов.

У некоторых амфибий и растений геном характеризуется еще большими размерами, достигающими  $10^{10}$  и  $10^{11}$  пар нуклеотидов. В отличие от прокариот, в эукариотических клетках одновременно активно транскрибируется от 1 до 10 % ДНК. Состав транскрибируемых последовательностей и их количество зависят от типа клетки и стадии онтогенеза. Значительная часть нуклеотидных последовательностей у эукариот не транскрибируется вообще — это *молчащая* («*мусорная*») ДНК.

Большой объем наследственного материала эукариот объясняется существованием в нем, помимо уникальных, также умеренно и часто повторяющихся последовательностей. Так, около 10 % генома мыши составляют тандемно (друг за другом) расположенные короткие нуклеотидные последовательности, повторенные до  $10^6$  раз. Эти часто повторяющиеся последовательности ДНК располагаются в основном в гетерохроматине, окружающем центромерные участки. Они не транскрибируются. Около 20 % генома мыши образовано умеренно частыми повторами, встречающимися  $10^3$ – $10^5$  раз. Такие повторы распределены по всему геному и транскрибируются в РНК. К ним относятся гены, контролирующие синтез гистонов, тРНК, рРНК и некоторые другие. Остальные 70 % генома мыши представлены уникальными нуклеотидными последовательностями. У растений и амфибий на долю умеренно и часто повторяющихся последовательностей приходится до 60 % генома.

Избыточность генома эукариот объясняется также экзон-интронной организацией большинства эукариотических генов, при которой значительная часть транскрибированной РНК удаляется в ходе следующего за синтезом процессинга и не используется для кодирования аминокислотных последовательностей белков.

До сих пор окончательно не выяснены функции молчащей ДНК, которая составляет значительную часть генома, реплицируется, но не транскрибируется. Высказывают предположения об определенном значении такой ДНК в обеспечении структурной организации хроматина. Некоторая часть не-транскрибируемых нуклеотидных последовательностей, очевидно, участвует в регуляции экспрессии генов. К вопросу о молчащей ДНК будут отступления в других главах книги.

Характеризуя наследственный материал прокариотической клетки в целом, необходимо отметить, что он заключен не только в нуклеоиде, но присутствует и в цитоплазме в виде небольших кольцевых фрагментов ДНК — *плазмид*.

*Плазмиды* — это широко распространенные в живых клетках внехромосомные генетические элементы, способные существовать и размножаться в клетке автономно от геномной ДНК. Описаны плазмиды, которые реплицируются не автономно, а только в составе геномной ДНК, в которую они включаются в определенных участках. В этом случае их называют *эписомами*. В прокариотических (бактериальных) клетках обнаружены плазмиды, которые несут наследственный материал, определяющий такие свойства, как способность бактерий к конъюгации, а также устойчивость к некоторым лекарственным веществам.

В эукариотических клетках внехромосомная ДНК представлена генетическим аппаратом органелл — митохондрий и пластид, а также нуклеотидными последовательностями, не являющимися жизненно необходимыми для клетки (вирусоподобными частицами). Наследственный материал органелл находится в их матриксе в виде нескольких копий кольцевых молекул ДНК, не связанных с гистонами. В митохондриях, например, содержится от 2 до 10 копий мтДНК.

Внехромосомная ДНК составляет лишь небольшую часть наследственного материала эукариотической клетки. Например, мтДНК человека содержит 16 569 пар нуклеотидов и на ее долю приходится менее 1 % всей клеточной ДНК.

В отличие от хромосомной ДНК мтДНК характеризуется высокой плотностью генов. В ней нет интронов, а межгенные

промежутки невелики. В кольцевой мтДНК человека содержится 13 генов, кодирующих белки (3 субъединицы цитохром С-оксидазы, 6 компонентов АТФазы и др.), 2 гена, кодирующих рРНК, и 22 гена тРНК (всего 37 генов). Значительная часть белков митохондрий и пластид синтезируется в цитоплазме под контролем геномной ДНК. Если большинство ядерных генов представлены в клетках организма в двойной дозе (аллельные гены), то митохондриальные гены представлены многими тысячами копий на клетку. Для генома митохондрий характерны межиндивидуальные различия, но в клетках одного индивида, как правило, мтДНК идентична.

Совокупность генов, расположенных в цитоплазматических молекулах ДНК, называют *плазмомом*. Он определяет особый тип наследования признаков — цитоплазматическое наследование.

Ранее были приведены предположения о первичном мире РНК в процессе происхождения жизни. В.Н. Ярыгин [15] обоснуждает предположение, что первым шагом в процессе возникновения жизни на Земле явилось образование самовоспроизводящихся молекул нуклеиновых кислот, не несущих первоначально функции кодирования аминокислот в белках. Благодаря способности к самовоспроизведению эти молекулы сохранялись во времени. Таким образом, первоначальный отбор шел на способность к самосохранению через самовоспроизведение. В соответствии с рассмотренным предположением позднее некоторые участки ДНК приобрели функцию кодирования, т. е. стали структурными генами, совокупность которых на определенном этапе эволюции составила первичный генотип. Экспрессия возникших кодирующих последовательностей ДНК привела к формированию первичного фенотипа, который оценивался естественным отбором на способность выживать в конкретной среде.

Важным моментом в рассматриваемой гипотезе является предположение о том, что существенным компонентом первых клеточных геномов была *избыточная ДНК*, способная реплицироваться, но не несущая функциональной нагрузки для формирования фенотипа. Предполагают, что разные направления

эволюции геномов про- и эукариот связаны с различной судьбой этой избыточной ДНК предкового генома, который должен был характеризоваться довольно большим объемом. Вероятно, на ранних стадиях эволюции простейших клеточных форм у них еще не были в совершенстве отработаны главные механизмы потока информации (репликация, транскрипция, трансляция). Избыточность ДНК в этих условиях создавала возможность расширения объема кодирующих нуклеотидных последовательностей за счет некодирующих, обеспечивая возникновение многих вариантов решения проблемы формирования жизнеспособного фенотипа.

### 3.2.3. Эволюция прокариотического генома

По мере совершенствования и повышения надежности главных механизмов потока информации значение избыточной ДНК в повышении выживаемости организмов снижалась. В такой ситуации одним из возможных направлений изменения генома было уменьшение его размеров за счет утраты некодирующих нуклеотидных последовательностей. Именно так можно представить эволюционный путь, пройденный геномом современных прокариот. Одновременно в качестве механизмов, поддерживающих выживаемость этих форм, в историческом развитии закреплялось свойственное им короткое время генерации, т. е. интенсивное размножение и быстрая смена поколений (как уже отмечалось, кишечная палочка делится каждые 20 мин). Перечисленные особенности хорошо сочетаются с гаплоидностью прокариот, что приводит к воспроизведению в фенотипе любой мутации.

Экспрессия 95 % ДНК, относительно малые размеры генома, гаплоидность, проявление в фенотипе практически каждой мутации в сочетании с коротким временем генерации обуславливают высокую приспособленность. Вместе с тем прокариотическому типу организации не свойственны обширные и разнообразные изменения структуры. Вследствие этого описанное направление эволюции, обеспечивая высокую способность к выживанию (прокариоты существуют на Земле около 3,5 млрд лет), является тупиковым.

### 3.2.4. Эволюция эукариотического генома

В отличие от изменений прокариотического генома, преобразования генома в эволюции эукариот [15] связаны с нарастающим увеличением количества ДНК. Это увеличение наблюдается в процессе прогрессивной эволюции эукариот. На фоне такого увеличения большая часть ДНК является «молчащей», т. е. не кодирует аминокислоты в белках или последовательностей нуклеотидов в рРНК и тРНК. Даже в пределах одного гена молчащие (интроны) и кодирующие (экзоны) участки могут перемежаться. В составе ДНК обнаруживаются часто и умеренно часто повторяющиеся последовательности. Вся масса ДНК распределена между определенным числом специализированных структур — хромосом. Хромосомы в отличие от нуклеоида прокариот имеют сложную химическую организацию. Эукариоты в большинстве случаев диплоидны. Время генерации у них значительно больше, чем у прокариот. Отмечаемые особенности, оформившиеся в ходе эволюции генома эукариот, допускают широкие структурные изменения и обеспечивают не только адаптивную (приспособительную), но и прогрессивную эволюцию.

Среди перечисленных моментов эволюции эукариот особое внимание привлекает увеличение размеров генома. Этот процесс может осуществляться различными способами. Наиболее резко размер генома изменяется в результате *полиплоидизации*, которая довольно широко распространена в природе. Она заключается в увеличении количества ДНК и хромосом, кратного гаплоидному. Достижимое в результате состояние полиплоидии приводит к увеличению дозы всех генов и создает избыток «сырого» генетического материала, который впоследствии видоизменяется в результате мутаций и отбора.

По-видимому, в ходе эволюции в результате накопления мутаций и дивергенции нуклеотидных последовательностей полиплоидизация сопровождалась переходом к диплоидному состоянию. Само по себе увеличение дозы генов еще не означает достижения однозначно положительного биологического результата. Об этом свидетельствует развитие в эволюции эукариот механизмов компенсации возрастающей дозы генов в

ходе их экспрессии путем сокращения времени жизни в клетках зрелой РНК. Так, у тетраплоидных карповых рыб в ответ на увеличение дозы генов рРНК в молекулах рРНК соматических клеток возникают скрытые внутренние разрывы, которые приводят к преждевременному их старению и сокращению содержания в цитоплазме.

Если бы увеличение объема генома происходило только в результате полиплоидизации, то в природе должно было бы наблюдаться скачкообразное изменение его размеров. На самом деле этот процесс демонстрирует плавное увеличение содержания ДНК в геноме. Это позволяет допустить возможность других механизмов, изменяющих его объем.

Действительно, некоторое значение для определения размера генома имеют *хромосомные перестройки*, сопровождающиеся изменением содержания ДНК в них (дупликации, делеции и транслокации). Они обуславливают повторение, утрату некоторых последовательностей в составе хромосомы или перенос их в другие хромосомы.

Важным механизмом увеличения объема генома является *амплификация* нуклеотидных последовательностей, которая заключается в образовании их копий, что приводит к возникновению повторяющихся участков ДНК. Особенностью генома эукариот является наличие большого количества таких повторов, свидетельствующее о существенном вкладе механизма амплификации в увеличение размеров наследственного материала.

Амплифицированные последовательности образуют семейства, в которых они собраны вместе (тандемная организация) или же распределяются по разным хромосомам. Конкретные изменения, приводящие к амплификации, бывают различными. Появление тандемов повторяющихся последовательностей объясняется, например, неравным кроссинговером, вследствие которого возникают многократные дупликации отдельных участков ДНК. Возможна амплификация путем вырезания фрагмента с последующей его репликацией вне хромосомы и встраиванием копий в другие хромосомы. Предполагают также амплификацию, осуществляемую путем обратной транскрипции ДНК на РНК с участием фермента об-

ратной транскриптазы и последующим встраиванием копий ДНК в различные локусы хромосом.

Во всех случаях амплификация некоторой последовательности приводит к возникновению в геноме более или менее многочисленных повторов и способствует некрратному увеличению его объема. Наличие таких повторов в сочетании с мутационным процессом является предпосылкой дивергентной эволюции однотипных последовательностей в пределах семейства с соответствующим изменением свойств кодируемых белков или РНК.

*Дивергенция* амплифицированных последовательностей с образованием разных генов или их семейств обусловлена накоплением в них различных изменений в виде замен оснований или других генных мутаций. О гомологии глобиновых генов двух семейств свидетельствует наличие во всех активных глобиновых генах позвоночных двух интронных участков, занимающих в них строго одинаковое положение. Такую же организацию имеют и псевдогены  $\psi\alpha_1$  человека,  $\psi\alpha_2$  кролика. Однако в  $\psi\alpha_3$ -псевдогене мыши в ходе эволюции оба интрона оказались точно вырезанными.

Результатом амплификации небольших последовательностей ДНК в пределах функциональной единицы является удлинение гена, при котором из простых генов могут возникать более сложные. Это может происходить за счет тандемной дупликации. Например, в генах, кодирующих варибельные участки иммуноглобулинов мыши, последовательности из 600 пар нуклеотидов образуются в результате 12 тандемных повторов исходной предковой последовательности из 48 пар нуклеотидов. Другим примером удлинения гена посредством тандемных дупликаций служит ген коллагена  $\alpha_2$ , который у курицы состоит из 34 000 пар нуклеотидов и содержит больше 50 экзонов. Длина таких участков во всех случаях кратна 9 нуклеотидным парам. Эволюция этих экзонов, очевидно, шла от гипотетического исходного строительного блока длиной 54 пары нуклеотидов.

Таким образом, амплификация нуклеотидных последовательностей, происходившая в процессе эволюции генома,



обеспечивала не только его количественное увеличение, появление семейств генов, но и создавала предпосылки для накопления в них изменений, дивергенции генов, увеличения разнообразия контролируемых ими продуктов.

В ходе проекта «Геном человека» (1990–2003) выяснилось, что «смысловые» участки ДНК, содержащие гены, кодирующие информацию о белках, занимают лишь 1 % генома. Около 99 % последовательностей ДНК генома человека относят к некодирующей ДНК (называемой также «мусорной» junk DNA), которая не экспрессируется, т. е. не имеет выражения в белке. В основном это многократно повторяющиеся некодирующие последовательности нуклеотидов.

Различают несколько классов повторяющейся ДНК. Основные два класса — тандемные (состоящие из очень простых относительно небольших последовательностей, уложенных тандемно — «голова к хвосту») и диспергированные (обнаруживающиеся повсеместно, рассеянные по геному) повторы.

Диспергированные повторы занимают не менее 46 % генома человека. К ним относят ДНК-транспозоны, которые интересны тем, что они «путешествуют» по геному, «вырезаясь» из одной области ДНК и «вставляясь» в другую. Большинство исследователей считают все эти повторяющиеся последовательности некодирующей ДНК остатками древних вирусов.

Более трети человеческого генома занимают два класса «мусорной» ДНК — длинные и короткие рассеянные (диспергированные) повторы. Длинные диспергированные повторы (у человека самый распространенный из них — повтор LINE1, занимающий 17 % длины генома) интересны тем, что при их анализе были найдены две открытые рамки считывания. Экспериментально выделили соответствующие белки. Оказалось, что оба белка обладают свойствами, необходимыми для ретропозиции (копирования и расселения повтора по геному). С длинного повтора с помощью этих белков считывается РНК, которая затем обратно транскрибируется. ДНК-копия повтора встраивается в геном в новом месте. Таким образом, «мусорную» ДНК нельзя назвать в полном смысле слова некодирующей — в действительности она кодирует ферменты, необходимые для

ее собственного размножения в геноме. Другие функции этих ферментов пока неясны.

Если сравнить данные, полученные при анализе генома дрожжей и генома человека, то становится очевидно, что доля кодирующих участков в расчете на весь геном в ходе эволюции резко уменьшается: у дрожжей она очень высока, у человека очень мала. Это известно давно, но сейчас эти соотношения приобрели количественную меру и структурное обоснование. Мы приходим к довольно парадоксальному, на первый взгляд, выводу: эволюция эукариот от низших форм к высшим сопряжена с «разбавлением» генома — на единицу длины ДНК приходится все меньше информации о структуре белков и РНК и все больше информации «ни о чем». Это одна из больших загадок биологической эволюции, обнаруженная благодаря проекту «Геном человека».

### 3.3. Перенос генетической информации

Молекулярная эволюция включает в себя механизмы переноса генетической информации в рамках геномов, а также между клетками прокариот и эукариот.

#### 3.3.1. Подвижные генетические элементы

Определенная роль в эволюции геномов как про-, так и эукариотических клеток принадлежит так называемым *подвижным генетическим элементам* — транспозонам. Они представляют собой автономные единицы, несущие в нуклеотидной последовательности информацию о структуре особых белков, которые обеспечивают их способность к перемещению из одного участка генома в другой. Такое перемещение — *транспозиция* — может происходить в строго определенные участки хромосом, узнаваемые этими специфическими белками. Транспозиция предполагает репликацию нуклеотидной последовательности подвижного генетического элемента и встраивание копии в ДНК-мишень с сохранением другой копии в прежнем месте.

Установлена также способность подвижных генетических элементов к точному вырезанию и удалению их из хромосомы. Перемещение таких нуклеотидных последовательностей в пределах генома может влиять на регуляцию экспрессии генов, которые прилежат к месту встраивания этих элементов. В результате таких перемещений могут активироваться ранее не активные гены, и наоборот.

Обнаружение подвижных генетических элементов в геномах как про-, так и эукариот указывает на определенные эволюционные преимущества, связанные с их наличием в наследственном материале. Возможно, рекомбинационные процессы, обеспечиваемые подвижными генетическими элементами, имеют немаловажное значение в структурной эволюции генома.

### 3.3.2. Роль горизонтального переноса генетического материала в эволюции генома

Наряду с транспозонами, не способными, очевидно, существовать вне генома и образовывать свободные молекулы ДНК, описаны элементы, обнаруживаемые как в составе генома, так и вне его [12]. Существование таких подвижных элементов дает возможность обсуждать роль горизонтального переноса генетического материала в эволюции генома.

Реализация наследственной информации, заключенной в генотипе организма, — это сложный процесс, который требует тонкой регуляции для того, чтобы в клетках разной тканевой принадлежности в определенное время в процессе развития организма обеспечить синтез специфических белков в необходимом количестве.

Все клетки многоклеточного организма, возникая из зиготы путем митоза, получают полноценный набор генетической информации. Несмотря на это, они отличаются друг от друга по морфологии, биохимическим и функциональным свойствам. В основе этих различий лежит активное функционирование в разных клетках неодинаковых частей генома. Большая часть генома находится в клетках организма в неактивном, *репрессированном*, состоянии, и только 2–10 % генов *дерепрессиро-*

ваны, т. е. активно транскрибируются. Спектр функционирующих генов зависит от тканевой принадлежности клетки, периода ее жизненного цикла и стадии индивидуального развития организма.

### 3.4. Сравнительная характеристика синтеза белков у прокариот и эукариот

Кратко рассмотрим особенности трансляции у эукариот и прокариот [17]. Общий план биосинтеза белков у эукариот аналогичен таковому у прокариот. Однако у эукариот в нем участвует большее количество факторов регуляции и некоторые этапы являются более сложными.

#### *Основные признаки сходства и различий:*

1. *Рибосомы.* Рибосомы эукариот больше по размеру по сравнению с рибосомами прокариот и имеют молекулярную массу 4200 кДа (рибосома 70S прокариот имеет молекулярную массу 2700 кДа).

2. *Иницирующая aa-tРНК.* У эукариот иницирующей аминокислотой является метионин и иницирующей аминоксил-тРНК выступает метионин-тРНК.

3. *Инициация.* Иницирующим кодоном мРНК у эукариот всегда выступает АУГ. Эукариоты в отличие от прокариот не используют специфический обогащенный пуринами участок мРНК на 5'-конце мРНК дистальнее иницирующего кодона АУГ. Однако именно с этого иницирующего кодона мРНК начинается процесс трансляции. Малая субъединица рибосомы (40S) связывается с кэпом на 5'-конце молекулы мРНК, и поиск иницирующего кодона АУГ идет при передвижении по мРНК к 3'-концу молекулы. Этот процесс сканирования у эукариот обеспечивается энергией каталитического гидролиза АТФ (хеликаза). В большинстве случаев эукариотические мРНК имеют только одно место старта простой полипептидной цепи одного белка. У прокариот имеется несколько последовательностей Shine — Dalgarno в мРНК и, следовательно, несколько мест начала синтеза полипептидных цепей. У эукариот используется большее количество белковых факторов

инициации (eIF), чем у прокариот. Например, eIF-4E является белком, который связывает напрямую 7-метилгуанозин (кэп), а eIF-4A является хеликазой. Различия механизмов инициации между прокариотами и эукариотами касаются и процессинга мРНК. У прокариот 5'-конец мРНК, синтезируемой при транскрипции, способен немедленно связываться с рибосомой для начала трансляции. У эукариот предшественник мРНК должен подвергнуться созреванию (сплайсинг, образование кэп, полиА), транспортироваться в цитозоль и лишь затем связываться с рибосомами для трансляции (рис. 3.1).

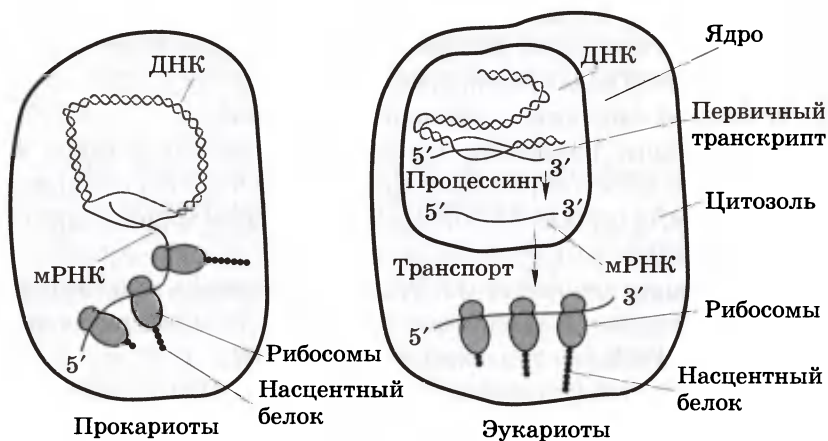


Рис. 3.1. Процессы транскрипции и трансляции строго взаимосвязаны у прокариот и разделены у эукариот

**4. Элонгация и терминация.** Факторы элонгации у эукариот EF1 $\alpha$  и EF1 $\beta$  аналогичны EF-Tu и EF-Ts у прокариот. ГТФ-EF1 $\alpha$  обеспечивает поступление aa-тРНК в А-участок рибосомы, а EF1 $\beta$  катализирует гидролиз ГТФ до ГДФ. Эукариотический фактор eEF2 опосредует ГТФ-зависимую транслокацию по механизмам, аналогичным действию EF-G у прокариот. Терминация у эукариот определяет фактор eRF1, а у прокариот — 2 фактора. И наконец, фактор eIF3, как и у прокариот IF3, препятствует реассоциации субъединиц рибосомы при отсутствии инициаторного комплекса, соответствующего иницирующему кодону мРНК.

Использование биологическими системами металлосвязанных порфиринов для переноса электронов является довольно ранним эволюционным процессом. Это находит свое подтверждение в широкой распространенности цитохромов, осуществляющих транспорт электронов по электрохимическому градиенту в дыхательной цепи, что обеспечивает восстановление  $O_2$  до  $H_2O$  и приводит к генерированию энергии в форме АТФ. Многие гемопротеиды играют роль катализаторов различных реакций окисления, которые служат для защиты клеток от действия пероксидов, другие принимают участие в процессах деградации биомолекул даже таких «плохих» субстратов, как лигнин. В процессе фотосинтеза порфириновое кольцо хлорофилла, содержащее ионы магния, собирает кванты солнечной энергии и передает их в активный фотосинтетический центр. Протопорфирин IX с ионом железа, координационно связанным в центре своей планарной структуры, формирует активный центр различных гемопротеидов — от цитохромов и гемоглобинов до лигниназ, которые выполняют функции переносчиков электронов, кислорода или катализаторов соответственно.

### 4.1. Филогенез, структура и функции металлопротеидов

Ионы многих металлов, входящие в состав ферментов и надферментных комплексов, участвуют в процессах обмена веществ, дыхания, роста, передачи нервных импульсов, мышечных сокращений и преобразования внутриклеточных сигналов. Функциональная роль металлов прослеживается, например, в стабилизации специфической структуры цинковых пальцев, непосредственном участии в связывании и переносе малых молекул, а также в реализации процессов транспорта электронов. Химические функции металлов проявляются в одно-

двух- и мультиэлектронных окислительно-восстановительных процессах, переносе функциональных групп, реакциях элиминации, гидролитическом катализе (табл. 4.1).

Таблица 4.1

### Металлопротеиды и их функции

Функция	Металлопротеид
Транспорт кислорода	Гемоглобин, миоглобин, гемоцианин, гемэритрин, хлоркруорин, гемованадин
Участие в структурной стабилизации	Цинковые пальцы в протеинах
Коммуникация и перенос сигнала	Кальмодулин, кальциклин
Транспорт электронов	Ферредоксин, Fe-S-протеиды с высоким электрическим потенциалом, цитохромы
Участие в механизмах транспорта ионов металлов	Натриевые и калиевые каналы, трансферрин, ферритин
Мультиэлектронные оксидоредуктазы	Нитрогеназы, NO-синтазы
Лиазы	Дезаминазы, декарбоксилазы
Лигазы	Синтазы, карбоксилазы
Изомеразы	Рацемазы
Гидролазы	Пептидазы, липазы
Трансферазы	Киназы, метилтрансферазы

Обнаруживаемые в составе белков, кофакторов и простетических групп белков атомы металлов представлены 14 довольно распространенными в земной коре элементами. Наибольшее распространение в живых клетках имеют щелочные (натрий, калий) и щелочноземельные (кальций, магний) металлы. Основной отличительной особенностью данных металлов является их восстановительная инертность. Первостепенная роль щелочных и щелочноземельных металлов в клетке определяется их участием в процессах инициации и амплификации сигналов, функционировании многочисленных насосов, регулирующих ионный состав клеток.

Переходные элементы 4-го и 5-го периодов периодической системы, включающие, например, железо, медь, молибден, кадмий и ванадий, исключая скандий и титан, проявляют вос-

становливающую активность, способность связывать лиганды и обмениваться ими. Металлокластерные белки, содержащие в своем составе ионы железа, в том числе Fe-S-кластеры, являются одними из наиболее древних представителей негемовых железопротеидов, а сами кластеры, по мнению многих исследователей, представляют собой эволюционно наиболее ранние кофакторы, появившиеся в живых системах. Данное обстоятельство хорошо согласуется с предполагаемыми геохимическими условиями, существовавшими на древнейшей Земле, а именно высоким содержанием в земной коре оксидов железа и серы.

Результаты лабораторных экспериментов подтверждают, что некоторые примитивные Fe-S-кластеры спонтанно образуются в растворах, содержащих ионы железа и серы. В силу высокой реакционной способности атомов железа ионы этого металла в свободном виде присутствуют в воде в довольно низкой концентрации, поэтому способность древних организмов избирательно поглощать и включать ионы данного металла в белковые катализаторы может объясняться чрезвычайной важностью таких железосодержащих белков для биологических систем уже на ранних стадиях эволюции.

Другим представителем древних белков является цитохром *c*. Этот переносчик электронов возник более 1,5 млрд лет назад, до того, как произошла дивергенция на царства растений и животных. Его функция сохранялась неизменной в течение всего этого периода, о чем свидетельствует тот факт, что цитохром *c* любого вида эукариот реагирует *in vitro* с цитохромоксидазой любого другого исследованного к настоящему времени вида. Как указывалось ранее, протопорфирин IX с ионом железа в центре формирует активный сайт цитохромов, которые выполняют функции переносчиков электронов. При этом ион железа изменяет свое состояние окисленности. Гемопротеиды, способные обратимо связывать кислород, не меняя ферро(Fe<sup>2+</sup>)-состояния железа и обеспечивать транспорт кислорода, получили название гемоглобинов.

Гемоглобины и белки, родственные им по функции, чрезвычайно широко распространены в биосфере, поскольку они были обнаружены в организмах всех таксономических групп:



у прокариот, в грибах, у растений и животных. До недавнего времени считали, что нынешние глобиновые гены позвоночных произошли от общего предкового гена и этот процесс начался около 450 млн лет назад. Поскольку гемоглобины были обнаружены у различных беспозвоночных от нематод до кольчатых червей и членистоногих, а также у бесчелюстных позвоночных — эволюционно весьма удаленных друг от друга организмов, время появления общего предшественника семейства глобиновых генов должно быть отодвинуто до периода не менее 670 млн лет назад. В действительности появление предкового гена гемопротеидов вообще и гемоглобинов в частности следует отнести к периоду не позднее 1,8 млрд лет назад, что согласуется с начальным периодом накопления  $O_2$  в атмосфере, уровень которого к этому моменту достигал 1 %. Появление и функционирование связанных с кислородом механизмов энергообеспечения потребностей клеток приводило к образованию побочных продуктов, представленных токсичными для мембранных структур и макромолекул активных форм кислорода. Поэтому эволюция в дальнейшем должна была развиваться в том числе по пути «разработки методов» как неферментативной, так и ферментативной антиоксидантной защиты.

Полагают, что первые кислородпереносящие белки эволюционно произошли от ферментов, которые предохраняли примитивные клетки от токсического действия накапливающегося кислорода, что находит подтверждение в существовании особых гемоглобинов растений, так называемых симбиотических *леггемоглобинов*, впервые открытых в 1939 г. у сои. Данный тип гемопротеидов, присутствующих в симбионтных бактериях рода *Rhizobium* азотфиксирующих клубеньков бобовых растений, позволяет предохранять бактериальные клетки от молекулярного кислорода, действующего как разобщитель процесса азотфиксации. Другим примером могут служить гемоглобиноподобные металлопротеиды прокариотических и эукариотических микроорганизмов, которые способствуют утилизации токсичного  $NO\cdot$ . Описанные ранее белки структурно родственны гемоглобинам и миоглобинам, что подтверждается в первую очередь характерным глобиновым способом укладки

полипептидных цепей и способом присоединения к ним гема за счет остатков проксимальных гистидинов. Указанные типы гемоглобинов получили название однодоменных бактериальных гемоглобинов и флавогемоглобинов, в которых гемсодержащий глобиновый домен объединен с ферредоксинредуктазоподобным ФАД- и НАД-модулем. Физиологические функции данных металлопротеидов до сих пор служат предметом споров, однако полагают, что они участвуют в доставке кислорода к оксидазам, участвующим в реагировании на оксидативный или нитрозативный клеточный стресс.

Так, например, флавогемоглобин *E. coli* экспрессируется в анаэробных условиях, и данный процесс сопряжен с восстановлением  $\text{NO}^{\cdot}$  в менее токсичный  $\text{N}_2\text{O}$ . Эксперименты, проведенные в условиях *in vitro* и *in vivo* в присутствии свободного кислорода и НАДН, действительно подтвердили способность флавогемоглобина *E. coli* окислять  $\text{NO}^{\cdot}$  до нитратов. Кроме того, было показано, что в модельных экспериментах флавогемоглобин *E. coli* может участвовать в восстановлении митохондриального цитохрома *c* как в аэробных условиях, так и в присутствии  $\text{CO}$ .

Родственный флавогемоглобин был обнаружен также у дрожжей *Candida*. Флавогемоглобин этих эукариот, как полагают, обладает функцией связывания и хранения молекулярного кислорода. Таким образом, данный белок может отвечать за чувствительность клеток к молекулярному кислороду, продукцию супероксидного анион-радикала и участвовать в ответе на оксидативный стресс.

Дополнительным аргументом в пользу эволюционного родства кислородпереносящих белков и гемсодержащих ферментов, подобных фенолоксидазе, может служить обнаружение криптоцианина — гексамерного белка, содержащегося в гемолимфе краба *Cancer magister*. Показано, что ген криптоцианина принадлежит к тому же семейству генов, которые ответственны за экспрессию гемоцианина и фенолоксидазы. В отличие от кислородпереносящего гемоцианина криптоцианин не содержит в своем составе ионов меди и не участвует в транспорте кислорода, а также не обладает ферментативной

активностью фенолоксидазы. Другой белок указанного семейства — кислородпереносящий гемоцианин, близкий по структуре к фенолоксидазе, но содержащий ионы меди, обладает фенолоксидазной активностью.

Электронные микрофотографии фенолоксидазы и гемоцианина приведены на рис. 4.1. Здесь видно, что фенолоксидаза является гексамером, построенным из шести идентичных субъединиц с молекулярной массой 71 кДа, и архитектура данного фермента весьма сходна со структурой гемоцианина.

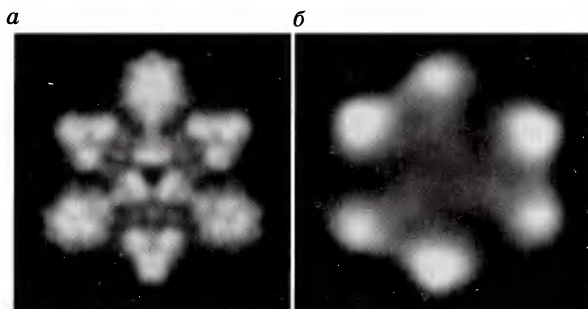


Рис. 4.1. Электронные микрофотографии:  
а — гемоцианина; б — фенолоксидазы *Astacus leptodactylus*

Методами анионообменной и гидрофобной хроматографии установлено, что молекула гемоцианина несет на поверхности отрицательный заряд, что обеспечивает присутствие данного белка в гемолимфе в высокой концентрации и препятствует его взаимодействию с другими белками. Фенолоксидазы высвобождаются из гемоцитов во время иммунной реакции и участвуют в склеротизации белков новой кутикулы после линьки у насекомых. Сказанное наводит на мысль, что гемоцианины, вероятно, произошли от ферментов, подобных фенолоксидазам, которые обеспечивали защиту клеток от токсического действия молекулярного кислорода. В свою очередь, толчком к появлению гемоцианинов предположительно послужило развитие системы окислительного фосфорилирования, что привело в действие стратегию разработки механизмов транспорта кислорода, и эту функцию взяли на себя гемоцианины.

Впоследствии у насекомых в результате утраты активного сайта, построенного из остатков гистидинов и ионов меди, гемоцианины лишились кислородтранспортной функции и эволюционировали в белки *гексамерины*, которые начали выполнять функцию источников энергии и аминокислот на заключительной стадии развития насекомых с полным превращением — стадии куколки.

Интересным примером, который может указывать на дальнейшее родство ряда ферментов и кислородпереносящих гемопротеидов, может служить глутаматрацемаза бактерии *Pedococcus pentosaceus*. Данный фермент состоит из 265 аминокислотных остатков. В аминокислотной последовательности глутаматрацемазы, включающей аминокислоты 92–183, положения 27 из них являются общими с положениями данных аминокислот в бычьем миоглобине. Высокая схожесть третичной структуры выявляется в регионах, соответствующих спиральям E и F, формирующим полость, напоминающую по структуре гемовый карман, которой способен связывать гем. Более того, установлена способность данного фермента связывать гем в соотношении 1:1, однако подобное взаимодействие приводит к утрате ферментативной активности глутаматрацемазы.

Возможные общие пути возникновения новых функций у белков показаны на рис. 4.2.

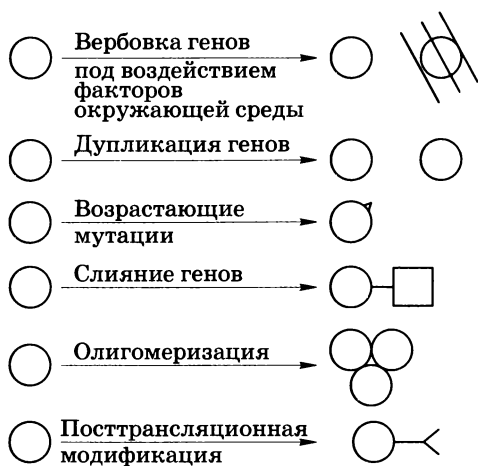


Рис. 4.2. Механизмы возникновения новых функций у белков

Концептуально простейшими путями, которые могут привести к возникновению новых белков, являются пути *ab initio*. Однако в действительности эволюция не создает новые белки с самого начала, а использует множество альтернативных и вместе с тем взаимосвязанных путей, при этом новые функции появляются у белков не только за счет дубликации генов и последующего мутагенеза. Известно, например, что множество генов функционируют в зависимости от соответствующего биологического контекста: различий в экспрессии, клеточной локализации и концентрации субстратов, что может привести к модулированию новых функций. Другими путями являются олигомеризация протомеров, дрейф генов, альтернативный сплайсинг и посттрансляционная модификация.

Новые функции у белков чаще всего возникают путем комбинации нескольких механизмов [18], [25]–[29].

## 4.2. Многообразие кислородпереносящих белков

Существует три основных класса металлсодержащих белков, выполняющих функцию транспорта кислорода в живых организмах. Наиболее обширно представлены два из них, в состав протетической группы которых входят ионы железа или меди. Межгрупповые различия кислородпереносящих белков проявляются в первую очередь в локализации данных транспортных молекул. Филогенетическое распространение кислородпереносящих металлопротеидов и тканевых протогемовых белков приведено в табл. 4.2. Так, гемоглобины у организмов, принадлежащих к разным таксономическим группам, могут содержаться как в плазме, так и в форменных элементах крови (чаще всего в эритроцитах). Хлоркруорины всегда растворены в плазме, а гемэритрины локализованы в клетках, которые, в отличие от классических эритроцитов, носят название розовых кровяных телец. Гемоцианины и эритрокруорины присутствуют в растворенном состоянии в плазме крови. В гемэритринах кислород присоединяется за счет взаимодействия с ковалентно связанным с белком атомом железа. В хлоркруоринах и гемоглобинах молекулярный

кислород связывается с ионом железа, расположенным в центре протетической группы — протопорфирина IX, присоединенной к глобиновой части белка.

Таблица 4.2

**Филогенетическое распространение кислородпереносящих металлопротеидов и тканевых протогемовых белков**

Таксон	Тканевые протогемы	Гемоглобин красных кровяных клеток	Внеклеточные гемоглобины	Внеклеточный хлорокруорин	Гемоцианин моллюсков	Гемоцианин членистоногих	Гемэритрин
<i>Protista</i>	×						
<i>Platyhelminthes</i>	×						
<i>Nematoda</i>	×		×				
<i>Phoronida</i>		×					
<i>Nemertea</i>	×	×	×				
<i>Priapulida</i>							×
<i>Brachiopoda</i>							×
<i>Sipunculida</i>							×
<i>Annelida</i>	×	×	×	×			×
<i>Vestimentifera</i>			×				
<i>Pogonophora</i>			×				
<i>Echiura</i>	×	×					
<i>Mollusca</i>	×	×	×		×		
<i>Arthropoda</i>			×			×	
<i>Echinodermata</i>		×					
<i>Chordata</i>	×	×					

Медьсодержащие белки, к которым относятся гемоцианины *Mollusca* и *Arthropoda*, включают активный сайт, представленный шестью консервативными остатками гистидина, связанными с двумя атомами меди, к которым обратимо присоединяется одна молекула кислорода. Процесс оксигенации гемоцианинов, гемэритринов и гемоглобинов в отличие от мо-

номерного миоглобина зависит от действия аллостерических регуляторов.

К третьему классу металлсодержащих белков, выполняющих функцию транспорта кислорода, относятся гемованадины — уникальный класс белков, которые локализованы в вакуолях специализированных клеток, называемых ванадоцитами (рис. 4.3) и составляющих до 60 % гемолимфы асцидий (*Ascidiae*) — группы морских организмов, относящихся к позвоночным и являющихся фильтраторами по способу питания.

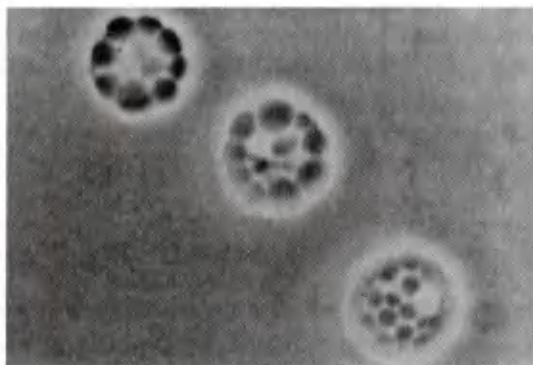


Рис. 4.3. Ванадоциты *A. ceratodes* с вакуолями, содержащими гемованадин

В вакуолях ванадоцитов высокая концентрация сульфат-ионов, формирующей сильноокислую среду, необходимую для проявления гемованадином кислородпереносящей активности. В частности, было показано, что живые клетки гемолимфы асцидий способны выполнять функцию хранения и транспорта кислорода.

В случае лизиса вакуолей зеленый пигмент клеток превращается в красно-коричневый. В лизате ионы ванадия  $V^{3+}$  оказываются ассоциированными с различными белками и/или низкомолекулярными азотсодержащими соединениями неизвестной природы. Таким образом, разрушение клеток приводит к созданию нефизиологических условий для хромогена, и гемованадин гемолизата оболочников утрачивает способ-

ность к обратимой оксигенации и, следовательно, выполнению функции транспорта кислорода.

Несмотря на довольно противоречивые данные относительно выполняемых гемованадином функций переносчика кислорода, интересным представляется уникальный механизм поглощения оболочниками ионов ванадия, что косвенно свидетельствует об их участии в окислительно-восстановительных реакциях у асцидий (рис. 4.4).

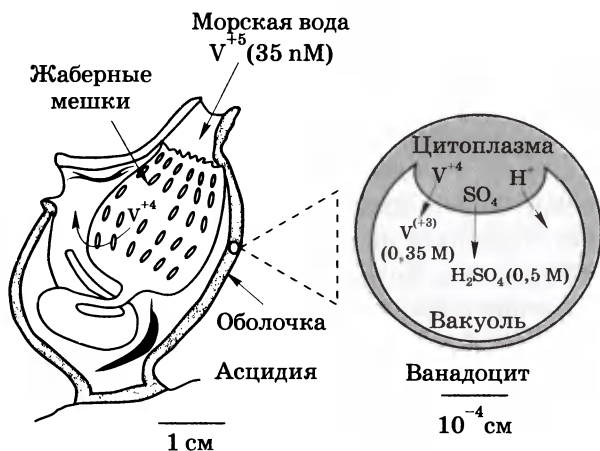


Рис. 4.4. Пути накопления ионов ванадия у оболочников

В морской воде содержание ионов ванадия ( $V^{+5}$ ) невелико — 35 нМ, причем этот элемент присутствует в основном в виде ионов  $HVO_4^{2-}$  и  $H_2VO_4^-$ . После прохождения воды через жаберные мешки асцидии ионы ванадия накапливаются в цитоплазме клеток, где восстанавливаются до  $VO^{2+}$ . Затем после транспорта  $VO^{2+}$  в вакуоли ванадоцитов данный ион в высокопротонированной среде (рН 1,9) вакуолей восстанавливается до  $V^{+3}$  и образует цвиттерион с сульфат-ионами.

Медьсодержащие белки, осуществляющие транспорт кислорода, представлены гемоцианинами моллюсков (*Mollusca*) и членистоногих (*Arthropoda*). Гемоцианины моллюсков состоят из крупных мультидоменных субъединиц с молекулярной массой 350–450 кДа, которые объединяются в десятисубъеди-



нические молекулярные ансамбли, имеющие у хитонов и головоногих цилиндрическую форму. У двустворчатых моллюсков (*Bivalvia*) молекулярные ансамбли гемоцианина, за исключением гемоглобина двустворчатого моллюска *Barbatia reeveana* и брюхоногих моллюсков (*Gastropoda*), также имеют цилиндрическую форму, но состоят из 20 субъединиц и достигают размеров 10 000 кДа. Гемоцианины членистоногих состоят из 6 субъединиц, каждая из которых содержит один сайт для связывания молекулярного кислорода. Данные гексамеры соединяются в два-, четыре-, шесть- или восьмигексамерные ансамбли в зависимости от вида членистоногих.

Итак, гемоцианины — это кислородпереносящие белки, активные центры которых состоят из двух близко расположенных ионов  $\text{Cu}^+$ . Гемоцианины в дезоксисостоянии бесцветны, а оксигенированные формы этих белков окрашены в голубой цвет. Белковая часть гемоцианинов в процентном отношении обычно намного больше, чем белковая часть гемоглобинов млекопитающих. Так, субъединица II гемоцианина краба-мечехвоста *Limulus polyphemus* состоит из 628 аминокислотных остатков, и 6 таких субъединиц объединяются в гексамер. Схематическое изображение активного центра гемоцианина приведено на рис. 4.5 (см. также цветную вклейку между с. 96–97).

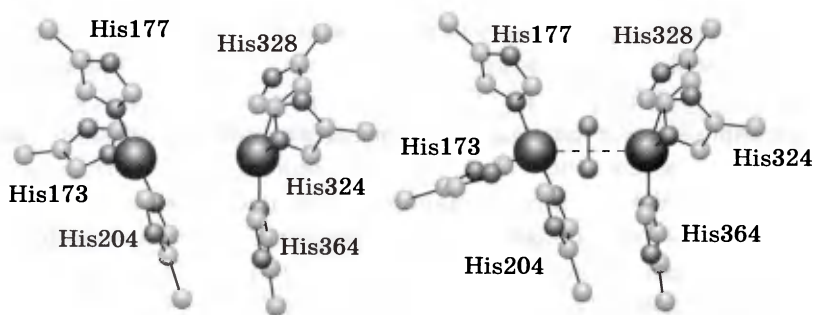


Рис. 4.5. Схематическое изображение активного центра гемоцианина в дезокси- (слева) и окси- (справа) состояниях: 4 крупных шара в центре молекул — атомы меди, а гентелеобразная структура в области пунктира — молекула кислорода

Каждый ион  $\text{Cu}^+$  в активном центре гемоцианина координирован тремя имидазолами гистидинов, а молекула кислорода оказывается «зажатой» между этими ионами. Пептидная цепь образует петли, то приближаясь к активному центру, то удаляясь от него; самая большая петля (разделяющая His204 и His324) состоит из 119 аминокислотных остатков. При оксигенировании у атомов меди степень окисления не меняется.

Гемоглобины, входящие в состав красных кровяных клеток, представлены в виде олигомеров, состоящих из нескольких полипептидных цепей или субъединиц с приблизительной молекулярной массой 17 кДа.

Каждая субъединица олигомерной молекулы гемоглобина содержит присоединенную простетическую группу — гем, предназначенную для связывания одной молекулы кислорода. Гемоглобины красных кровяных клеток беспозвоночных животных представлены мономерами, однако мономеры могут образовывать димеры, тетрамеры и даже октамеры. Гемоглобин *Barbatia reeveana* — двустворчатого моллюска, обитающего в водах моря Кортеса, содержится в красных кровяных клетках в виде типичных тетрамерных молекул, кроме того, в состав этих клеток дополнительно входят крупные уникальные полимерные молекулы гемоглобина размером 430 кДа, состоящие из 12 мономерных единиц.

Внеклеточные гемоглобины представляют собой хромопротеиды с разнообразными четвертичной структурой и размерами входящих в их состав субъединиц. Так, например, внеклеточные гемоглобины и хлоркруорины кольчатых червей представлены молекулярными ансамблями, построенными приблизительно из 200 субъединиц с молекулярной массой около 17 кДа. Кроме того, в состав этих ансамблей входят не содержащие гема линкерные цепи, и весь ансамбль представляет собой в итоге двухслойную гексагональную молекулу с молекулярной массой 3500 кДа. На рис. 4.6 приведены структуры эритрокруорина дождевого червя (*Lumbricus terrestris*) (код pdb.2gtl) и гигантской молекулы внеклеточного гемоглобина погонофоры (*Oligobranchia mashikoi*) (код pdb.2zs0).

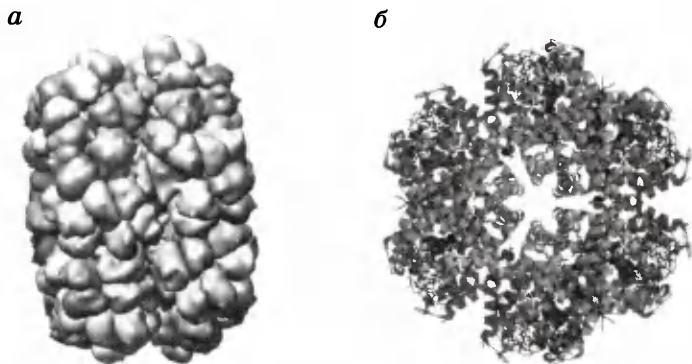


Рис. 4.6. Структуры эритрокуроина:

*а* — дождевого червя; *б* — гигантской молекулы внеклеточного гемоглобина погонофоры

Гемоглобины членистоногих состоят из одной, двух или девяти субъединиц, образующих четвертичную структуру, зависящую от вида организма. Гемоглобины моллюсков являются более крупными белками, каждая цепь размером 17 кДа представляет собой функциональную единицу. Объединение 10–12 субъединиц у улиток и 18–20 субъединиц у двустворчатых моллюсков *Carditidae* и *Astartidae* приводит к образованию длинных молекулярных ансамблей. У улиток субъединицы с молекулярной массой 170 кДа образуют кольцеобразные клеточные ансамбли с массой 1700 кДа. В целом гемоглобины моллюсков могут достигать огромных размеров с молекулярной массой до 12 000 кДа.

Другим внутриклеточным кислородпереносящим белком является гемэритрин, содержащийся в *розовых кровяных клетках*, который представлен однодоменными субъединицами с молекулярной массой 13,5 кДа, объединяющимися в димеры, тримеры, тетрамеры и октамеры. Примером тетрамера гемэритрина может служить кислородпереносящий белок *Themiste dyscritum* (код pdb. 1hmd) (рис. 4.7). Агрегаты гемэритрина с молекулярной массой 690 кДа обнаружены у кольчатого червя *Magelona papillicornis*.

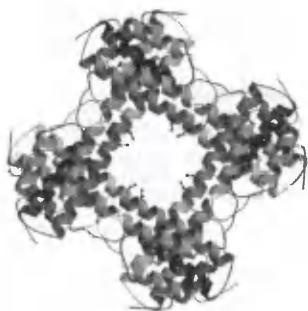


Рис. 4.7. Структура тетрамера гемэритрина *Themiste dyscritum*

Активный центр гемэритрина, связанный с белковой частью молекулы, представлен двумя ионами  $\text{Fe}^{2+}$ , соединенными между собой мостиковой гидроксильной группой. В дезоксисостоянии один из атомов железа гемэритрина имеет координационное число 5, а другой — 6 (рис. 4.8). В оксигенированной форме оба иона имеют координационное число 6. Ионы координированы атомами азота имидазолов гистидинов и карбоксильными группами глутаминовой и аспарагиновой кислот.

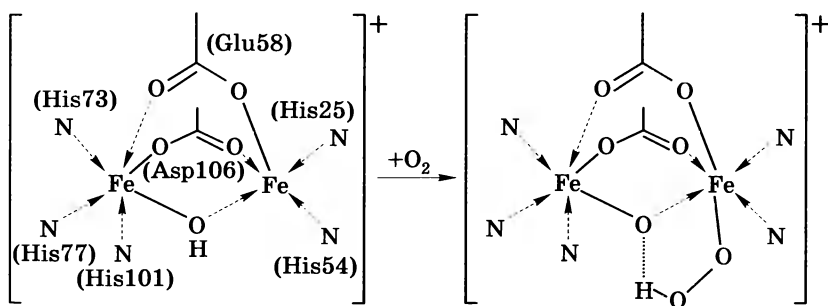


Рис. 4.8. Схема оксигенирования гемэритрина

При оксигенации гемэритрина происходит переход обоих ионов железа из ферро- $(\text{Fe}^{2+})$ -состояния в ферри- $(\text{Fe}^{3+})$ -форму.

По данным, полученным с помощью инфракрасной спектроскопии, установлено, что при оксигенации атом водорода

переходит от мостиковой ОН-группы к концевому атому молекулы кислорода. Три имидазольные группы, принадлежащие гистидиновым остаткам His25, His73 и His101, образуют водородные связи  $N-H \cdots O$  с молекулами воды. Такие водородные связи повышают способность имидазольных лигандов к комплексообразованию. Гемэритрин связывает кислород прочнее, чем гемоглобин или миоглобин. Поэтому он встречается у животных, способных длительное время находиться в анаэробных условиях (рис. 4.9, см. также цветную вклейку между с. 96–97). А — клеточный гемоглобин красных кровяных клеток; Б — внеклеточные кислородпереносящие белки хлорокруорин и гемоглобин кольчатых червей (*Annelida*), внеклеточный гемоглобин двустворчатых моллюсков (*Bivalvia*) и внеклеточный гемоглобин членистоногих (*Arthropoda*), В — клеточный гемэритрин розовых кровяных клеток, Г — гемоцианин моллюсков (*Molluscan*), Д — гемоцианин членистоногих (*Arthropoda*).

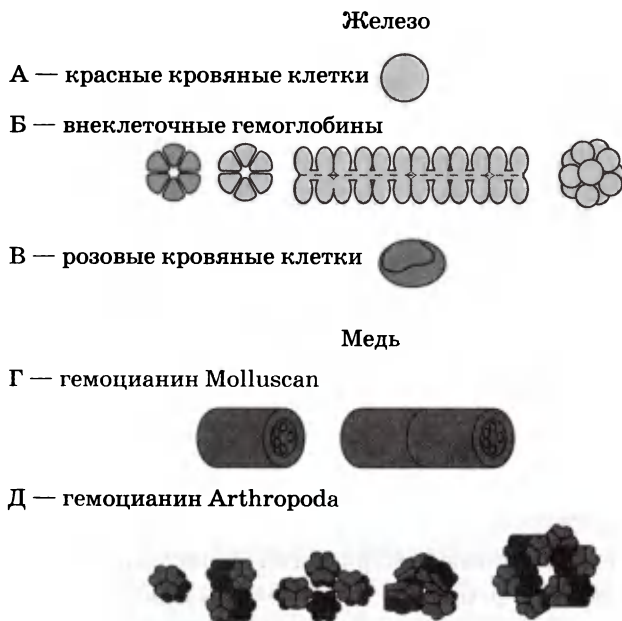


Рис. 4.9. Схематическое изображение кислородпереносящих белков

### 4.3. Филогенез гемсодержащих белков

Примерно 3,5 млрд лет назад на Земле возникла первая примитивная жизнь. До настоящего времени нет единой точки зрения относительно того, какие организмы были первыми — автотрофы или гетеротрофы. Однако в докембрийских отложениях обнаружены следы жизнедеятельности синезеленых водорослей — так называемые *строматолиты*, построенные из концентрических слоев извести, возраст которых насчитывает до 3 млрд лет. С появлением этих водорослей связывают начальные этапы накопления в атмосфере Земли свободного кислорода. Около 2 млрд лет назад благодаря деятельности примитивных автотрофов (фототрофов), подобных современным цианобактериям, в атмосфере начала расти концентрация молекулярного  $O_2$ , и к 1,9–1,7 млрд лет назад его содержание достигло 1 %, что способствовало развитию и совершенствованию функций первобытных железосодержащих белков. Основная функция первичных гемопротеидов, возникших в условиях восстановительной атмосферы Земли, заключалась, как полагают, в связывании свободного молекулярного кислорода. Являясь побочным продуктом фототрофного способа питания, молекулярный кислород оказался токсичным для первых примитивных клеток. Это послужило причиной развития специализированных внутриклеточных систем, которые обеспечивали защиту этих клеток от повреждающего действия активных форм кислорода и способствовали развитию систем использования  $O_2$  в качестве удобного терминального акцептора электронов при окислении пищевых молекул. На рис. 4.10 приведено эволюционное дерево гемоглобинов, построенное на основе экзон-интронной организации их генов.

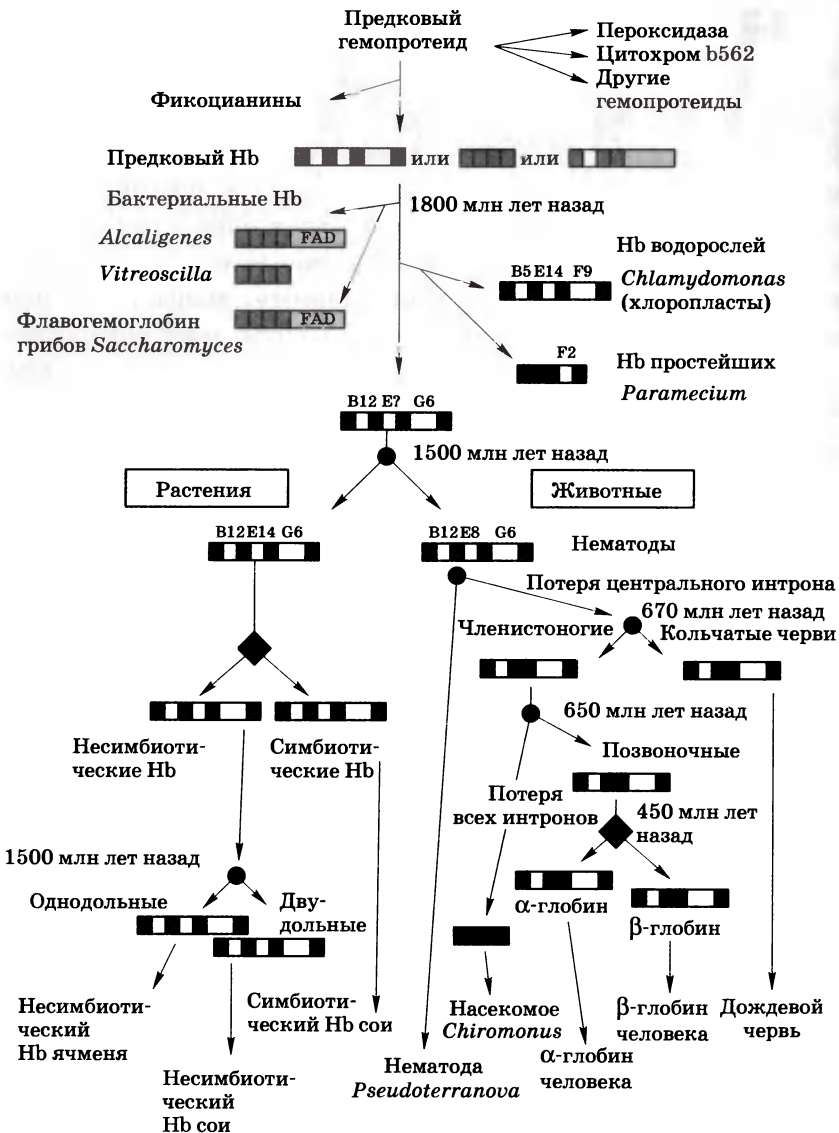


Рис. 4.10. Эволюционное дерево гемоглобинов, построенное на основании экзон-интронной структуры их генов

Можно видеть, что цитохромы, фикоцианины, пероксидазы и гемоглобины предположительно произошли от общего предкового гена. Определенным доказательством родства, например, фикоцианина цианобактерии *Mastigocladus laminosus* и гемоглобинов является сходство третичной структуры фикоцианина, установленной методом рентгеновской кристаллографии, с характерной так называемой глобиновой трехмерной укладкой цепей кислородпереносящих гемопротеидов. Данный факт примечателен тем, что фикоцианин, не являясь гемопротеидом, вместо гема содержит линейный тетрапиррольный пигмент. В то же время такие гемсодержащие белки, как цитохром *b562* и лигнинпероксидаза, обладают отличной от присущей глобину топологией  $\alpha$ -спиралей.

Сейчас под эволюционным происхождением гемоглобинов понимают не возникновение данных хромопротеидов *ab initio*, а в первую очередь увеличение их разнообразия путем дубликации генов с последующим мутагенезом. Таким образом, изучение структуры гемоглобинов и других кислородпереносящих белков позволяет проследить филогенетические отношения между видами, принадлежащими к различным таксономическим группам, возникшим в процессе эволюции (см. рис. 4.10).

В период ранних исследований гемсодержащих белков растений предполагали независимое образование гемоглобинов растений и животных, поскольку на тот момент были известны лишь леггемоглобины бобовых растений. Тогда в качестве возможных причин появления гемоглобинов у представителей царства растений и животных рассматривали их независимое конвергентное происхождение или горизонтальный перенос генов гемоглобина от других организмов.

Однако сравнительный анализ характера прерывистости генов растительного гемоглобина и гемоглобина круглых червей указывает на их наибольшую близость к предковому гену, от которого путем дивергенции произошли симбиотические и несимбиотические гемоглобины растений, а также гемоглобины животных. Так, например, большинство растений содержат в составе генов гемоглобина три интрона, что указывает на сходство структуры этих генов с предковой структурой, от которой растения и животные разошлись путем дивергенции



более 1500 млн лет назад. В ходе эволюции гемоглобинов животных произошла утрата центрального интрона глобиновых генов, однако по-прежнему кодирующая область гена гемоглобина современного круглого червя *Pseudoterranova* прерывается тремя интронами. Несмотря на потерю глобиновыми генами животных центрального интрона, пространственная структура продуктов их экспрессии по-прежнему сохраняет следы его утраты. Хотя гены современных растительных гемоглобинов включают три интрона, а глобиновые гены животных — два, их третичная структура отличается высокой консервативностью, в том числе взаимного расположения  $\alpha$ -спирализованных участков, и эта структура сохраняется у таких дальнеродственных белков, как миоглобин кашалота и леггемоглобин люпина. При этом аминокислотный анализ данных белков показал общность лишь 17 % их аминокислотных последовательностей.

Эволюционный процесс утраты интронов происходил и в дальнейшем, что подтверждается существованием насекомого *Chiromonus*, в гене гемоглобина которого интроны отсутствуют вообще. Во всех остальных отношениях гемоглобины насекомых по своим характеристикам во многом сходны с гемоглобинами позвоночных животных. Для животных важнейшими эволюционными этапами были появление миоглобинов, расхождение  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей гемоглобинов и возникновение эмбриональных и фетальных гемоглобинов у птиц и млекопитающих.

Ранняя эволюция генов гемоглобина является довольно спорной в отношении главным образом их экзон-интронной организации. Так, высказывается предположение, что ген гемоглобина простейших отделился от общей ветви генов гемоглобина эукариот до разделения живых организмов на царства животных и растений. Об этом говорит тот факт, что некоторые простейшие рода *Paramecium* содержат целое семейство гемоглобиновых генов, в структуре которых отмечено наличие только одного интрона. Однако этот процесс происходил позднее, чем образование бактериальных гемоглобинов и флавогемоглобинов грибов. Как следует из рис. 4.10, гены, кодирующие гемоглобины бактерий, дрожжей и хлоропластов водорослей, имеют несколько иную организацию. Так, гены гемоглобинов дрожжей *Saccharomyces* и бактерий *Alcaligenes* не содержат

в кодирующих последовательностях интронов, в то время как гены гемоглобинов хлоропластов водорослей *Chlamydomonas* отличаются наличием трех интронов, расположение которых не совпадает с положением интронов в генах большинства эукариот. Подобное сравнение может служить свидетельством в пользу прокариотического происхождения хлоропластов *Chlamydomonas*. В то же время причины разного положения интронов в генах, кодирующих различные гемоглобины, до конца не выяснены. Однако считается, что первый и третий интроны, присутствующие в генах растительных и животных организмов (см. рис. 4.10), являются такими же древними, как и их общий предковый ген. Несмотря на то что структура предкового гена всех гемоглобинов до сих пор остается предметом споров, полагают, что он мог содержать три интрона и впервые появиться у древних архебактерий, поскольку гены этих микроорганизмов довольно часто содержат интроны, что абсолютно нетипично для большинства прокариот [19], [20], [25]–[29].

#### 4.4. Филогенез гемоглобина позвоночных

Гемоглобины человека кодируются генами, расположенными в разных локусах двух негомологичных хромосом. Кластер  $\beta$ -глобиновых генов расположен в коротком плече 11-й хромосомы (11p15.5), а кластер  $\alpha$ -глобиновых генов — в терминальном участке короткого плеча 16-й хромосомы (16p) (рис. 4.11, см. также цветную вклейку между с. 96–97).

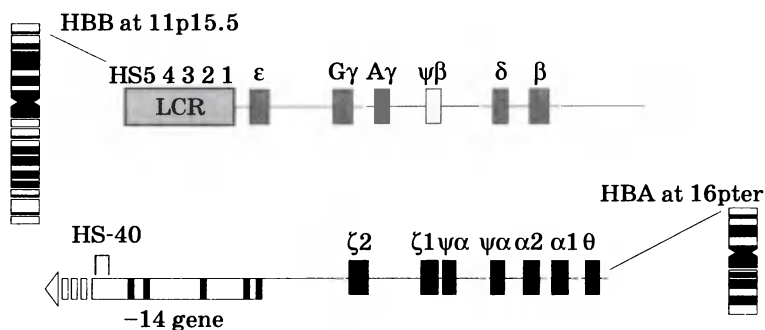


Рис. 4.11. Кластеры  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов

Последовательность расположения генов в кластерах отражает этапы синтеза соответствующих цепей эмбрионального и фетального гемоглобинов и гемоглобина взрослого человека в процессе онтогенеза. Переход в процессе эволюции от мономерных кислородсвязывающих гемопротеидов, таких как миоглобин, к тетрамерному гемоглобину привел к резкому увеличению эффективности транспорта кислорода, которая определяется в первую очередь кооперативным характером связывания  $O_2$  с  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами олигомеров данного переносчика кислорода. Именно это обстоятельство объясняет причины дивергенции родоначального гена гемоглобина на  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновые гены, что оказалось важнейшим шагом на пути увеличения способности гемоглобина позвоночных переносить кислород от легких к периферическим тканям, а углекислоту и протоны — от периферических тканей к легким. Интересным является то, что в отличие от позвоночных животных у беспозвоночных процесс транспорта кислорода во многих случаях связан с обратимой диссоциацией их гемоглобинов на составляющие субъединицы.

Гены, кодирующие  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи гемоглобина у позвоночных, возникли путем последовательной дупликации и последующей дивергенции у ранних позвоночных, что нашло подтверждение при изучении гемоглобинов эволюционно древней рыбы *Danio rerio* и амфибии *Xenopus laevis*. Результаты этих исследований указывают на то, что кластер  $\alpha$ -глобиновых генов отделился от  $\beta$ -глобинового кластера еще до дивергенции животных на птиц и млекопитающих, после чего эти кластеры оказались в разных хромосомах данных таксонов. Дальнейшая эволюция кластеров глобинов происходила независимо друг от друга. Так, например, у человека  $\varepsilon$ -глобиновые гены экспрессируются у эмбрионов, а  $\beta$ -глобиновые гены — у взрослых. Определение нуклеотидной последовательности  $\beta$ -глобинового гена птиц указывает на его значительное сходство с  $\beta$ -генами человека. Однако эмбриональный вариант  $\beta$ -глобинового гена курицы, обозначаемый как  $\rho$ -глобиновый ген, менее сходен с  $\varepsilon$ -глобиновым геном человека, чем их  $\beta$ -глобиновые гены, что подтверждает дупликацию этих генов уже после разделения таксонов.

Олигомерная гетерогенность гемоглобина обнаружена у многих видов живых организмов из разных таксономических групп. Однако наибольший интерес, по-видимому, представляют гемоглобины позвоночных (*Vertebrata*), поскольку человек принадлежит к данному обширному подтипу и здесь представляется возможным проанализировать эволюционные изменения гемоглобинов, приведшие в конечном счете к нынешнему олигомерному разнообразию тетрамеров этого гемопротеида, проявляющемуся в онтогенезе. На рис. 4.12 представлено филогенетическое дерево цепей гемоглобинов позвоночных с указанием примерной хронологической последовательности возникновения новых вариантов.

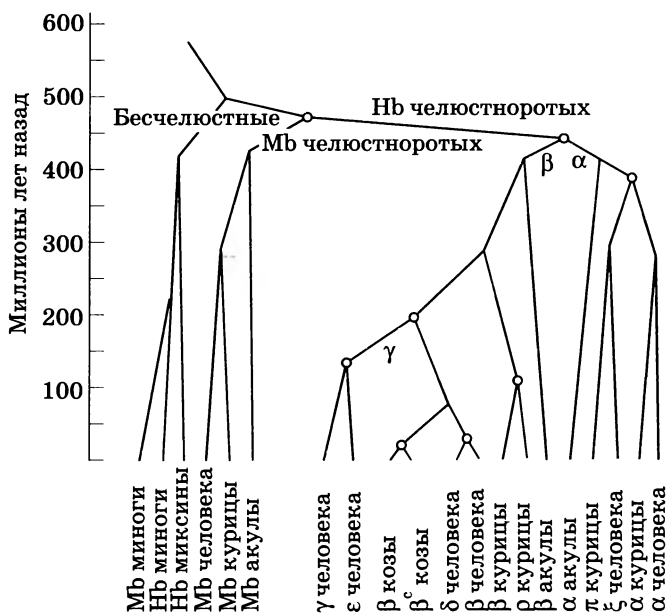


Рис. 4.12. Эволюционное дерево гемоглобинов позвоночных;  
○ — расхождение генов путем дупликации

Как следует из рис. 4.12, 500 млн лет назад произошло разветвление эволюционных путей гемовых кислородпереносящих белков челюстноротых (*Gnathostomata*) и бесче-

люстных (*Agnatha*). Миоглобины и гемоглобины разделились несколько позднее — 475 млн лет назад, что по времени совпадает с начальной эволюцией позвоночных. Характерно, что только у миног имеется свой собственный миоглобин, который ответвился от гемоглобина около 200 млн лет назад. Расхождение генов, кодирующих  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновые цепи, произошло 400–450 млн лет назад еще у надкласса рыб (*Pisces*) и, таким образом, предшествовало периоду выхода позвоночных (*Vertebrata*) на сушу. Все современные позвоночные, начиная с рыб, имеют как гены, кодирующие первичную последовательность миоглобина, так и гены  $\alpha$ - и  $\beta$ -подобных цепей гемоглобина. Предполагается, что появление тетрамерной структуры гемоглобина, характерного для всех позвоночных, оказалось важнейшим эволюционным приобретением, позволившим приспособиться к новым условиям существования. Действительно, кооперативное взаимодействие субъединиц гемоглобина в составе тетрамеров оказалось необходимым и важным механизмом, обеспечившим значительное увеличение эффективности транспорта кислорода с участием данного гемопротеида. При потере кооперативности взаимодействия субъединиц гемоглобин легко переходит в метформу, что ведет к утрате функциональной способности переносить кислород к тканям.

Возникновение амниот (*Amniota*) — высших позвоночных, объединяющих рептилий, птиц и млекопитающих, стало толчком к появлению эмбриональных форм гемоглобина. У млекопитающих ген, кодирующий  $\alpha$ -цепи гемоглобина, дублировался и дал начало эмбриональному варианту  $\alpha$ -типа, обозначаемому как  $\zeta$ -цепь, у птиц аналогом  $\zeta$ -цепи является  $\pi$ -субъединица. Примерно 200 млн лет назад возникает фетальный гемоглобин — HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ), который у многих видов животных отличается бóльшим сродством к кислороду, чем гемоглобин взрослых особей, что явилось эволюционным приспособлением, связанным с появлением плацентарных млекопитающих (*Placentalia*). Около 150 млн лет назад в результате дубликации и мутирования предка  $\gamma$ -глобинового гена появляется  $\varepsilon$ -глобиновый ген, являющийся эмбриональным вариан-

том цепи  $\beta$ -типа. Несколько позже возникает эмбриональный гемоглобин птиц, который содержит  $\rho$ -цепи. Примечательно, что на этапе появления приматов возникает  $\delta$ -цепь, которая включается в состав гемоглобина  $HbA_2$ , почти не отличающегося по кислородпереносящим свойствам от обычного гемоглобина  $HbA_1$ .

Отмечено, что ген  $\zeta$  отделился от  $\alpha$ -гена, а  $\gamma$ - и  $\varepsilon$ -гены входят в филогенетическое дерево  $\beta$ -глобинов, причем если  $\gamma$ - и  $\delta$ -гены отделились путем дубликации предкового гена  $\beta$ -цепи, то дубликация и последующая мутация исходного гена, кодирующего  $\gamma$ -цепь, привела к возникновению гена  $\varepsilon$ -цепи и генов современных  $\gamma$ -цепей. При этом  $\varepsilon$ -цепи образуют с  $\zeta$ -цепями эмбриональные тетрамеры  $\zeta_2\varepsilon_2$ , что наводит на мысль о «специальном» образовании  $\varepsilon$ -субъединиц для взаимодействия с относительно молодой  $\zeta$ -цепью, принадлежащей к глобинам  $\alpha$ -типа.

Разнообразие гемоглобинов позвоночных формировалось как путем дивергенции, так и путем дубликации генов с независимой последующей эволюцией. *Дубликация генов* лежала в основе расхождения миоглобинов и гемоглобинов челюстноротых (*Gnathostomata*),  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей гемоглобина, эмбриональных и взрослых цепей  $\alpha$ -типа,  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей,  $\gamma$ - и  $\varepsilon$ -цепей и, наконец,  $\beta$ - и  $\delta$ -цепей приматов (*Primates*). Путем *дивергенции* разошлись гемоглобины позвоночных (*Vertebrata*) и беспозвоночных (*Invertebrata*), челюстноротых (*Gnathostomata*) и бесчелюстных (*Agnatha*), а также аналогичные гемоглобины более мелких таксономических групп.

Кластер  $\beta$ -глобиновых генов плацентарных млекопитающих образовался в ходе последовательной дубликации предкового гена. Предполагают, что  $\varepsilon$ - и  $\gamma$ -гены и ныне не экспрессирующийся  $\psi\beta$ -ген образовались путем дубликации одного анцестрального гена, а  $\delta$ - и  $\beta$ -гены — путем дубликации другого гена, вероятно, до дивергенции плацентарных, сумчатых и яйцекладущих млекопитающих. Ген  $\gamma$ -цепей у большинства млекопитающих экспрессируется в эмбриональный период. Исключением являются приматы и человек, у которых этот ген экспрессируется в фетальный период. Максимальная экс-

прессия  $\beta$ -глобинового гена у высших приматов отмечена в постнатальный период, а у других млекопитающих синтез происходит также и в фетальный период. У коз, например, отсутствуют гены  $\gamma$ -глобина и кластер  $\beta$ -глобиновых генов представлен тремя генами  $\beta$ -типа ( $\beta^A$ ,  $\beta^F$ ,  $\beta^C$ ), шестью генами  $\epsilon$ -типа ( $\epsilon^I$ – $\epsilon^{VI}$ ) и тремя псевдогенами ( $\psi\beta^X$ ,  $\psi\beta^Y$ ,  $\psi\beta^Z$ ). В ходе онтогенеза у этих млекопитающих последовательная экспрессия кластера  $\beta$ -глобиновых генов приводит к активации гена  $\beta^F$  в фетальный период,  $\beta^A$  — в постнатальный период и  $\beta^C$  — в период эритропоэтического стресса.

У взрослого человека экспрессия  $\delta$ -глобиновых генов происходит на низком уровне, однако у некоторых млекопитающих отмечается высокий уровень его экспрессии. В то же время синтез  $\epsilon$ -глобиновых цепей у человека происходит только в эмбриональном периоде в клетках эритроидного ряда, находящихся в желточном мешке. Отличительной особенностью экспрессии гена  $\beta$ -глобиновых цепей является его конститутивный характер. Это вызвано тем, что данный ген находится на значительном расстоянии от локуса, контролирующего активность всего кластера (LCR). Сейчас считается, что временное ограничение экспрессии  $\epsilon$ -глобинового гена связано с его близким расположением по отношению к LCR.

Эволюция  $\alpha$ -глобиновых генов до конца не изучена, поскольку в отличие от сведений о структуре  $\alpha$ -глобинового кластера генов человека отсутствует сравнительная база данных о структуре генов, кодирующих  $\alpha$ -цепи у представителей других видов млекопитающих. Так, было установлено, что синтез  $\zeta$ -цепей происходит на высоком уровне в примитивных клетках эритроидного ряда. Одновременно в эмбриональном периоде происходит синтез  $\alpha$ -цепей, однако на более низком уровне, чем в постнатальном периоде. Стоит отметить, что хотя экспрессия  $\theta$ -гена (см. рис. 4.11) и происходит, однако до сих пор не обнаружены тетрамеры гемоглобина, включающие  $\theta$ -субъединицы. На рис. 4.13 (см. также цветную вклейку между с. 96–97) показано предполагаемое филогенетическое дерево кислородпереносящих глобиновых белков человека.

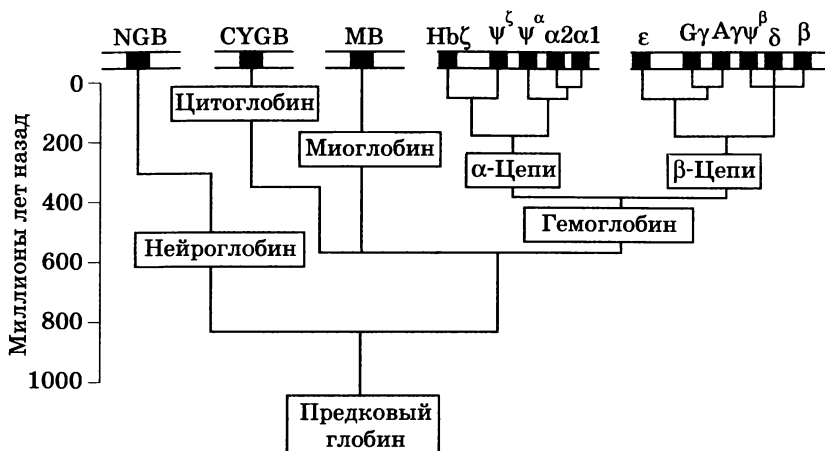


Рис. 4.13. Филогенетическое дерево глобиновых белков человека

Подводя итог обсуждения данных о филогенезе миоглобина и гемоглобинов, можно сказать, что все исследованные нормальные (не мутантные) гемоглобины человека имеют идентичную трехмерную структуру, существенную для выполнения функции транспорта кислорода. Все глобиновые цепи различных гемоглобинов имеют общее эволюционное происхождение и возникли в результате последовательных дупликаций генов. Чем больше сходство между двумя цепями, тем позднее в ходе эволюции произошла дупликация. Очевидно, цепи  $A\gamma$  и  $C\gamma$ , которые различаются одной аминокислотой, дивергировали позже всех других, а дупликация генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей произошла в весьма отдаленном прошлом. В то же время последовательная дупликация генов привела к появлению таких глобиновых белков, как нейроглобин, цитоглобин и миоглобин [19], [20], [25]–[29].



## Глава 5.

# ОНТОГЕНЕЗ — ПРОЦЕСС РЕАЛИЗАЦИИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРОГРАММЫ РАЗВИТИЯ ОРГАНИЗМА. СВЯЗЬ МЕЖДУ ОНТОГЕНЕЗОМ И ФИЛОГЕНЕЗОМ

В иерархической системе организации живого *онтогенетический уровень* тесно связан с другими уровнями. Элементарной единицей жизни является *особь* в процессе ее индивидуального развития.

## 5.1. Онтогенетический уровень организации живого

Реально существующие в природе организмы на протяжении жизни непосредственно взаимодействуют с окружающей средой — неживой природой, особями своего и других видов. В этом проявляется взаимосвязь онтогенетического, популяционно-видового, биогеоценотического и биосферного уровней, в которые так или иначе включены отдельные организмы. В процессе взаимодействия особей с окружающей средой осуществляется отбор организмов, наиболее приспособленных в силу их наследуемых свойств. Основной задачей, решаемой на онтогенетическом уровне, является формирование организма, способного произвести потомство, передав ему наследственную программу, на основе которой у нового поколения формируются характерные черты данного вида. При половом размножении эта задача решается не единичной особью, а в рамках популяции организмов данного вида, в которой находятся особи обоих полов.

Для решения основной задачи онтогенеза — производства потомства и обеспечения непрерывности существования вида — необходимо обеспечить формирование зрелого в репродуктивном отношении организма и его жизнеспособность на всех стадиях онтогенеза. Это достигается благодаря функцио-

нированию элементарных единиц суборганизменных уровней организации — молекулярно-генетического, субклеточного, клеточного, тканевого и органного.

### 5.1.1. Определение онтогенеза

*Онтогенез* (от греч. *ón* (*óntos*) — сущее + *генез*) — индивидуальное развитие организма, совокупность последовательных морфологических, физиологических и биохимических преобразований, претерпеваемых организмом от момента его зарождения до конца жизни. Термин «онтогенез» введен Э. Геккелем (1866) при формулировании им *биогенетического закона*.

Онтогенез включает *рост*, т. е. увеличение массы тела, его размеров, и *дифференцировку*. У животных и растений, размножающихся половым путем, зарождение нового организма осуществляется в процессе оплодотворения, а онтогенез *начинается* с оплодотворенной яйцеклетки, или *зиготы*. У организмов, которым свойственно бесполое размножение, онтогенез начинается с образования нового организма путем деления материнского тела или специализированной клетки, почкования, а также из корневища, клубня, луковицы и т. п. В ходе онтогенеза каждый организм закономерно проходит последовательные фазы, стадии или периоды развития, из которых основными у организмов, размножающихся половым путем, являются *зародышевый* (эмбриональный, или пренатальный), *послезародышевый* (постэмбриональный, или постнатальный) и *период развития взрослого организма*.

В основе онтогенеза лежит сложный процесс реализации на разных стадиях развития организма наследственной информации, заложенной в каждой из его клеток. Ген — единица наследственности, представляющая собой часть молекулы ДНК, кодирующей последовательность аминокислот одной полипептидной цепи. Экспрессией гена называют синтез белка или РНК по программе гена. Большинство генов относят к стандартным кодирующим белок генам. В результате дупликации гена в процессе эволюции возможно образование множественных его копий для более быстрого синтеза белка. Известны псевдогены, не способные к экспрессии или кодирующие

синтез нефункциональных белков. Транспозоны (прыгающие гены) способны изменять свое месторасположение в хромосоме. Говоря о генах, следует заметить, что в составе ДНК существуют также повторяющиеся тысячи раз и состоящие из нескольких сотен оснований *Alu*-последовательности. Их роль не установлена. Имеется еще один вид повторяющихся последовательностей ДНК — сателлитная ДНК (короткие тандемно повторяющиеся последовательности оснований). Эти последовательности образуют более легкую фракцию, сопровождающую основную фракцию ДНК при градиентном ультрацентрифугировании (отсюда и название — сателлитная ДНК).

Ядерная ДНК локализована в ядре эукариотической клетки. Аналогом ядерной ДНК у бактерий служит *генофор*, или *нуклеоид*, который представляет собой кольцевидно замкнутую ДНК, не отделенную от цитоплазмы мембраной. Нередко генофор называют *бактериальной хромосомой*. Молекулы ядерных ДНК содержат основной объем информации обо всех наследственных признаках организма. Их функция — хранение этой информации, обеспечение ее экспрессии и рекомбинации, а также воспроизводство при делении клетки и передача последующим поколениям организма.

ДНК митохондрий, подобно ДНК хлоропластов, обеспечивают автономный синтез белка, который протекает в митохондриях. Несмотря на известную автономность, функционирование ДНК хлоропластов и ДНК митохондрий четко координировано с деятельностью ядерной ДНК.

ДНК ядер, митохондрий (хлоропластов) в совокупности образуют единый наследственный аппарат эукариотической клетки.

*ДНК плазмид* — это обычно кольцевидно замкнутые молекулы ДНК небольшого размера, находящиеся в цитоплазме. Несмотря на небольшой объем содержащейся в них наследственной информации, ДНК плазмид играют важную роль в явлениях наследственности и изменчивости организмов, прежде всего бактерий и грибов. Плазмидные ДНК — это относительно автономные структуры: они способны реплицироваться независимо от ядерной ДНК, а также переходить из одной

клетки в другую в процессе их контактов. Эту способность используют инженеры-генетики для переноса наследственной информации из одних организмов в другие.

Вирусные ДНК несут относительно небольшой объем наследственной информации (от 10 до 150 генов), обеспечивающей циркуляцию этих паразитов в природе, в частности инфицирование клетки-хозяина. Подобно плазмидным ДНК, вирусные ДНК обладают способностью «путешествовать» между клетками и встраиваться (интегрироваться) в их ДНК. Поэтому ДНК-содержащие вирусы находят применение в качестве векторов в генно-инженерных разработках.

Наследственная информация онтогенеза возникает в оплодотворенной яйцеклетке при половом размножении. Обусловленная *наследственностью* программа онтогенеза осуществляется под влиянием многих факторов (условия внешней среды, межклеточные и межтканевые взаимодействия, гуморально-гормональные и нервные регуляции и т. д.) и выражается во взаимосвязанных процессах размножения клеток, их роста и дифференцировки. Закономерности онтогенеза, причинные механизмы и факторы клеточной, тканевой и органной дифференцировки изучаются комплексной наукой — *биологией развития*, использующей, помимо традиционных подходов экспериментальной эмбриологии и морфологии, методы молекулярной биологии, цитологии и генетики. Онтогенез и историческое развитие организмов — *филогенез* — неразрывные и взаимно обусловленные стороны единого процесса развития живой природы.

Итак, онтогенез — это индивидуальное развитие организма, в ходе которого происходит преобразование его морфофизиологических, физиолого-биохимических и цитогенетических признаков. Онтогенез включает две группы процессов: морфогенез и воспроизведение (репродукцию): в результате морфогенеза формируется репродуктивно зрелая особь. Онтогенез характеризуется устойчивостью — *гомеорезом*. *Гомеорез* — это стабилизированный поток событий, который представляет собой процесс реализации генетической программы строения, развития и функционирования организма.

С точки зрения эволюции обычно рассматриваются следующие аспекты онтогенеза: эмбриональные адаптации, филэмбриогенезы, автономизация онтогенеза, эмбрионизация онтогенеза.

### 5.1.2. Основные атрибуты онтогенеза

Выделяют следующие существенные и неотъемлемые характеристики онтогенеза:

1. Исходная запрограммированность процессов. Наличие уникальной неизменной генетической программы развития, сформированной вследствие мейоза и оплодотворения.

2. Необратимость онтогенеза. При реализации генетической программы невозможен возврат к предыдущим стадиям.

3. Углубление специализации: по мере развития уменьшается вероятность смены траектории онтогенеза.

4. Адаптивный характер: поливариантность онтогенеза обеспечивает возможность приспособления к различным условиям.

5. Неравномерность темпов: скорость процессов роста и развития изменяется.

6. Целостность и преемственность отдельных этапов. Признаки, появляющиеся на более поздних стадиях, базируются на признаках, проявляющихся на ранних стадиях.

7. Наличие цикличности: существует цикличность старения и омоложения.

8. Наличие критических периодов, связанных с выбором пути в узловых точках (точках бифуркации) или преодолением энергетических порогов.

### 5.1.3. Основные типы онтогенеза

К наиболее обсуждаемым типам онтогенеза относят:

1. Онтогенез организмов с бесполом размножением и/или при зиготном мейозе (прокариоты и некоторые эукариоты).

2. Онтогенез организмов с чередованием ядерных фаз при споровом мейозе (большинство растений и грибов).

3. Онтогенез организмов с чередованием полового и бесполого размножения без смены ядерных фаз. Метагенез — чередование поколений у кишечнополостных. Гетерогония — чередо-

вание партеногенетического и амфимиктического поколений у червей, некоторых членистоногих и низших хордовых.

4. Онтогенез с наличием личиночных и промежуточных стадий: от первично-личиночного анаморфоза до полного метаморфоза. При недостатке питательных веществ в яйце личиночные стадии позволяют завершить морфогенез, а также в ряде случаев обеспечивают расселение особей.

5. Онтогенез с выпадением отдельных стадий. Утрата личиночных стадий и/или стадий бесполого размножения: пресноводные гидры, олигохеты, большинство брюхоногих моллюсков. Утрата конечных стадий и размножение на ранних этапах онтогенеза — неотения.

Таким образом, существует множество основных типов онтогенеза и еще большее число производных типов. В теории эволюции обычно рассматривается онтогенез на примере цветковых растений и позвоночных животных.

## 5.2. Основные понятия онтогенеза

Междисциплинарный подход к изучению онтогенеза позволил сформировать ряд общих положений, включающих единство существенных свойств, связей и отношений биологических процессов в индивидуальном развитии организмов.

### 5.2.1. Автономизация онтогенеза

Характеристику общих положений онтогенеза обычно начинают с рассмотрения *автономизации онтогенеза* — процесса повышения независимости онтогенеза от условий внешней среды: экзогенные факторы развития замещаются эндогенными. Например, у хвостатых амфибий метаморфоз определяется в значительной степени факторами внешней среды (метаморфоз можно задержать понижением температуры), а у бесхвостых — изменением концентрации тироксина (гормона щитовидной железы), которая повышается под воздействием тиреотропного гормона гипофиза.

Автономизация онтогенеза тесно связана с канализацией развития и совершенствованием механизмов гомеореза.

Автономизация онтогенеза базируется на системе корреляций и координаций. Учение о корреляциях и координациях разработал И.И. Шмальгаузен.

*Корреляции* — это взаимозависимости между частями развивающегося организма, которые обеспечивают его устойчивое развитие.

Типы онтогенетических корреляций:

1. *Геномные* — обуславливают целостность генотипа. Достигаются с помощью диплоидности, доминирования, плейотропного действия генов и наличия полигенных систем с участием генов-модификаторов. Известны гены, прямо отвечающие за гистогенез и морфогенез.

2. *Морфогенетические* — обусловлены эмбриональной индукцией и нейрогуморальной регуляцией целостности организма.

3. *Эргонтические* — фенотипические корреляции, обусловленные взаимозависимостью между функциями органов.

В ходе эволюции изменение корреляций происходит таким образом, что формируются новые *координации* — согласованные изменения между частями организма с точки зрения филогенеза. Координации обеспечивают формирование адаптивных комплексов.

Типы филогенетических координаций:

1. *Биологические координации* — адаптивный ответ на изменения среды. Биологические координации устанавливаются через функциональную деятельность организма (например, удлинение тела и редукция конечностей у змей, змееобразных ящериц и амфибий). Биологические координации ведут к прогрессирующей специализации, но они могут быть разорваны с приобретением принципиально нового признака. Например, появление плавательного пузыря разрывает координацию между формой тела, формой хвоста и удельным весом тела рыб.

2. *Динамические координации* — координации между взаимосвязанными органами. Например, у млекопитающих хорошо развиты и орган обоняния, и обонятельные доли переднего мозга. Динамические координации повышают степень канализации онтогенеза и филогенеза и выражают функциональную обусловленность (коадаптацию) органов и систем органов.

**3. Топографические координации** — выражаются в закономерных изменениях пространственных соотношений между органами, не связанными непосредственной функциональной зависимостью. Пример крупной топографической координации — взаимное расположение нервной трубки, осевого скелета, пищеварительной трубки и сердца у хордовых. Топографические координации определяют общий план строения группы организмов.

Таким образом, автономизация онтогенеза тесно связана с повышением уровня организации группы организмов, а корреляции между органами в онтогенезе тесно связаны с координациями между органами в филогенезе.

### 5.2.2. Эмбрионизация онтогенеза

Процесс автономизации тесно связан с эмбрионизацией онтогенеза.

**Эмбрионизация** — возникновение в ходе эволюции способности проходить значительную часть зародышевого развития под защитой материнского организма или зародышевых оболочек.

У животных эмбрионизация онтогенеза выражается в переходе к *яйцекладному* и *внутриутробному* типам онтогенеза. Эволюционная смена типов эмбрионального развития повышает независимость гисто- и морфогенеза от внешней среды, способствует автономизации онтогенеза и возможности выхода в новую адаптивную зону.

У растений эмбрионизация онтогенеза может выражаться в редукции гаметофита, формировании семени с семенной кожурой и запасом питательных веществ в виде эндосперма и/или специализированных семядолей и формировании плода (ароморфоз) и плодоподобных структур (идиоадаптации).

### 5.2.3. Онтогенез животных

Зародышевый период обычно довольно четко отграничен от послезародышевого выходом зародыша из яйцевых и зародышевых оболочек, а у живородящих форм — рождением. Зародышевый период состоит из 3 этапов: *дробления яйца*, *обо-*



собления зародышевых листков и формирования отдельных органов — *органогенеза*.

Все многоклеточные животные на ранних стадиях развития обнаруживают сходство, это нашло отражение в биогенетическом законе. Начальный этап послезародышевого развития (ювенильный) может протекать у животных или по типу прямого развития, или по типу *метаморфоза* — непрямого развития.

*Прямое развитие* проходит без личиночных стадий, путем постепенного перехода вышедшего из яйцевых оболочек животного во взрослую форму. Среди беспозвоночных оно наблюдается у гребневи́ков, малоцетинковых червей, пиявок, некоторых насекомых, среди позвоночных — у большинства рыб, пресмыкающихся, птиц и млекопитающих. Рядом особенностей обладает присущее плацентарным млекопитающим и человеку внутриутробное развитие, при котором формирование зародыша, а затем плода происходит внутри материнского организма.

Для развития с метаморфозом (*непрямое развитие*) характерно наличие одной или нескольких личиночных стадий. Среди беспозвоночных оно наблюдается у некоторых паразитических плоских и круглых червей, моллюсков, большинства членистоногих, среди позвоночных — у земноводных и отдельных рыб. Личинки ведут свободный образ жизни, самостоятельно питаются и обладают специальными приспособлениями, так называемыми личиночными, или провизорными, органами (например, жабры личинок стрекоз, желточный мешок мальков рыб, жабры, хвост, органы прилипания головастиков), имеющими большое значение на данном этапе онтогенеза, но отсутствующими у взрослых форм. Между прямым и непрямым развитием имеется ряд переходов (например, развитие прямокрылых, клопов, тараканов).

Интенсивность развития и роста организмов зависит, помимо обусловленных наследственностью причин, от питания, температуры, влажности, освещения и многих других факторов среды. Формирование видовых особенностей организма заканчивается к наступлению половой зрелости, а развитие индивидуальных признаков продолжается до конца онтогенеза.

У некоторых групп животных (например, у птиц) с наступлением половой зрелости в основном прекращается рост, у других (например, у рыб) рост наблюдается в течение всей жизни. Длительность онтогенеза колеблется у разных видов от нескольких часов или дней (некоторые насекомые, например тли) до 200 лет (например, черепахи). Она не связана с уровнем их организации и систематическим положением — это один из видовых признаков, выработанных в процессе исторического развития. Изменения, претерпеваемые организмом в пожилом и старческом возрасте, изучает *геронтология*.

#### 5.2.4. Онтогенез растений

В онтогенезе растений различают *рост*, т. е. новообразование структурных элементов, приводящее к увеличению размеров организма, его массы; *развитие* — процесс, в ходе которого оплодотворенная яйцеклетка или вегетативный зачаток в результате деления и дифференцировки клеток приобретает форму взрослого организма и создает характерные для него типы специализированных клеток; *старение* — совокупность необратимых структурных и физиолого-биохимических изменений, проявляющихся в ослаблении биосинтеза и самообновлении белков, а также всех физиологических функций, что в итоге приводит к смерти организма.

В онтогенезе тесно взаимодействуют разные стороны единого процесса: *морфологическая*, включающая морфогенез — формообразование организма в целом, органогенез — формообразование отдельных органов и гистогенез — формирование тканей; *физиолого-биохимическая* — совокупность физиологических и биохимических процессов, протекающих в клетках, тканях, органах и в целом растении в ходе его развития; *генетическая* — процесс реализации наследственной информации; *экологическая* — рост и развитие организма в условиях внешней среды; *эволюционная* — изменение всех сторон онтогенеза, происходящее в длительной цепи поколений на разных этапах филогенеза. Таким образом, онтогенез растений — продукт длительной эволюции, определяется *генотипом* и выражается в последовательных сериях физиолого-

биохимических процессов, обуславливающих создание морфологических структур (органов) и являющихся предпосылкой для новых таких же процессов. В зависимости от условий среды и *нормы реакции* организма генотип реализуется в серии *фенотипов*, которые характеризуются соответствующими этапами (*фенофазами*), отмечающими появление новых структур.

Основная особенность онтогенеза высших растений и значительного числа видов водорослей — чередование бесполого (*спорофит*) и полового (*гаметофит*) поколений. Отправной точкой для образования спорофита служит зигота, а для гаметофита — прорастающая спора. Развитие спорофита и гаметофита — совокупность процессов (у низших растений различных, у высших — составляющих упорядоченную цепь), заканчивающихся образованием тех или иных органов. У папоротникообразных, например, спорофит представлен *зародышем*, кормусом, спорангием и спорой, а гаметофит — *заростком*, архегонием и антеридием, яйцеклеткой и сперматозоидом. У покрытосеменных гаметофит сильно упрощен.

На всех этапах онтогенеза организм — целостная тесно взаимодействующая со средой система. Это определяется взаимодействием его частей как в процессе *обмена веществ*, так и вследствие действия *фитогормонов*. Переход от одного этапа онтогенеза к следующему определяется совместным действием внутренних и внешних факторов. Длительность онтогенеза варьирует у растений от 20–30 мин до нескольких тысяч лет (секвойя, можжевельник, баобаб). Знание онтогенеза растений способствует их рациональному хозяйственному использованию, разработке приемов повышения урожая.

### 5.2.5. Биогенетический закон

*Биогенетический закон* — закономерность в живой природе, сформулированная немецким ученым Э. Геккелем (1866) и состоящая в том, что индивидуальное развитие особи (онтогенез) является коротким и быстрым повторением (рекапитуляцией) важнейших этапов эволюции вида (филогенеза). Факты, свидетельствующие о рекапитуляции (например, закладка у зародышей наземных позвоночных жаберных щелей), были

известны еще до появления эволюционного учения Ч. Дарвина. Однако лишь Дарвин дал этим фактам последовательное естественно-историческое объяснение (1859), установив, что стадии развития зародышей воспроизводят древние предковые формы. Он рассматривал рекапитуляцию как фундаментальную закономерность эволюции органического мира. Теория естественного отбора позволила Дарвину объяснить противоречивое сочетание целесообразности строения организмов с рекапитуляцией признаков далеких предков. Новое освещение биогенетический закон получил в теории *филэмбриогенеза*, разработанной русским биологом А.Н. Северцовым, который рассматривал рекапитуляцию в рамках закономерностей эволюции онтогенеза. Биогенетический закон расценивался им как следствие эволюции, осуществляющейся путем надставки (*анаболии*) конечных стадий онтогенеза. Вопреки мнению, будто биогенетический закон неприменим к растениям, ряд ботаников приводили примеры рекапитуляции у растений.

### 5.3. Дифференцировка

*Дифференцировка*, дифференциация онтогенетическая (биологическая) — возникновение различий между однородными клетками и тканями, их изменения в ходе развития, приводящие к специализации. Дифференцировка происходит в основном в процессе зародышевого развития, когда из одинаковых неспециализированных эмбриональных клеток образуются органы и ткани с различными по форме и функции клетками. Развивающийся зародыш дифференцируется сначала на зародышевые листки, затем на зачатки основных систем и органов, далее — на большое число специализированных тканей и органов, характерных для взрослого организма. Дифференцировка происходит также в некоторых органах взрослого организма (например, из клеток костного мозга дифференцируются различные клетки крови). Часто дифференцировкой называют и ряд последовательных изменений, претерпеваемых клетками одного типа в процессе их специализации (например, в ходе дифференцировки красных клеток крови эри-

тробласты преобразуются в ретикулоциты, а последние — в эритроциты). Дифференцировка выражается в изменении как формы клеток, их внутреннего и внешнего строения и взаимосвязей (например, миобласты вытягиваются, сливаются друг с другом, в них образуются миофибриллы и т. д.; у нейробластов увеличивается ядро, появляются отростки, соединяющие нервные клетки с различными органами и между собой), так и их функциональных свойств (мышечные волокна приобретают способность сокращаться, нервные клетки — передавать нервные импульсы, железистые — секретировать соответствующие вещества и т. д.).

Главные факторы дифференцировки — различия цитоплазмы ранних эмбриональных клеток, обусловленные неоднородностью цитоплазмы яйца, и специфическое влияние соседних тканей — *индукция*. На ход дифференцировки оказывают влияние ряд гормонов. Многие факторы, определяющие дифференцировку, еще неизвестны. Дифференцировка может происходить только в клетках, к ней подготовленных. Действие фактора дифференцировки вызывает сначала состояние латентной (скрытой) дифференцировки, или детерминации, когда внешние признаки дифференцировки еще не проявляются, но развитие ткани уже может происходить независимо от побудительного фактора. Например, дифференцировка нервной ткани вызывается зачатком хордомезодермы. Индукция же дифференцировки возможна и совершается только в эктодерме зародыша на определенной стадии его развития.

Обычно состояние дифференцировки необратимо, т. е. дифференцированные клетки уже не могут утратить своей специализации. Однако в условиях повреждения ткани, способной к регенерации, а также при злокачественном ее перерождении происходит частичная дедифференцировка, когда клетки утрачивают многие признаки, приобретенные в процессе дифференцировки, и внешне напоминают недифференцированные клетки зародыша. Возможны случаи приобретения дедифференцированными клетками дифференцировки в ином направлении (*метоплазия*).

## 5.4. Молекулярные основы онтогенеза

В основе онтогенеза лежит запрограммированное включение и выключение генов, т. е. процессов транскрипции. Экспрессии подвергаются только участки ДНК, которые не связаны в составе нуклеосом с гистонами.

### 5.4.1. Роль гистонов

Реализация генетической информации в онтогенезе происходит на следующих уровнях:

1. На уровне генетического аппарата ядра количество образующегося продукта экспрессии — белка или РНК — зависит от дозы, т. е. числа копий данного гена.

2. Считают, что основными неспецифическими ингибиторами экспрессии генов являются гистоны (гены ДНК нуклеосом не экспрессируются и отдельные гистоны, например H1, способны подавлять транскрипцию) [11]. В геноме эукариот гены гистонов повторяются в десятки раз чаще, чем структурные гены. Такая высокая повторяемость копий однотипных генов гистонов наблюдается на протяжении всего онтогенеза в тканях и у широкого спектра видов.

3. Во всех клетках одного организма количество ДНК одинаково и соответствует количеству ДНК в оплодотворенной яйцеклетке. Но в разных типах соматических клеток организма экспрессируются разные участки ДНК, что создает специфичный для них фенотип (клетки печени, мышц и нейроны существенно различаются по функции и структуре). Поэтому степень связывания ДНК с гистонами, т. е. степень и участок компактизации ДНК, может играть ключевую роль в онтогенезе.

По мнению Б.М. Ханжина (2004), репрессия генома гистонами является главным движителем дифференциальной репрессии в процессе развития. Он считает, что репрессия генома гистонами начинается с самых первых этапов эмбриогенеза и здесь интенсивность ее наивысшая. Начальный (интенсивный) этап репрессии способствует быстрой дифференцировке клеток в процессе исходного развития. Например, при развитии зародыша (вьюна) от стадии бластулы к гастрULE отмечено существенное снижение доли транскриптов с повторяющимися последовательностями

**ДНК.** Анализ эмбрионов морского ежа показал, что большое разнообразие мРНК на стадии гастрюлы прогрессивно снижается на более поздних стадиях развития. Сравнение гетерогенной ядерной РНК, синтезирующейся в эритроидных клетках по мере их созревания, показывает, что в них доля транскриптов (как отражение матричной активности генома) уменьшается в ряду эриробласт — ретикулоцит — эритроцит. Подобные результаты получены на дифференцирующихся миобластах.

Способность синтезировать РНК в ходе развития эритроцитов снижается в 8 раз. При образовании мышечных волокон из миобластов скорость синтеза рРНК снижается в 5–10 раз. Наблюдаемая специализация, например в синтезе проколлагена при развитии эмбриона (цыпленка), обусловлена в основном потерей или инактивацией мРНК для неколлагеновых белков. Как правило, специализированные клетки, находящиеся в состоянии терминальной дифференцировки, характеризуются резким сужением спектра синтезируемых белков и выраженным количественным преобладанием какого-либо индивидуального белка в составе массы синтезируемых белков: появление множества копий ограниченного числа фракций мРНК в поджелудочной железе происходит параллельно с формированием ее секреторной функции в онтогенезе. Одновременно показано, что скорость синтеза гистонов в эмбрионах (земноводных) на стадии двух клеток в 10 раз выше скорости их в ооците, а в период от двухклеточной стадии до стадии бластулы скорость синтеза гистонов возрастает еще в 3 раза.

На стадии дробления эмбрионов (морского ежа) гистоны составляют 25–30 % вновь синтезируемых белков, а мРНК гистонов — почти 70 % всех мРНК. В позднем онтогенезе вследствие непрекращающегося и преобладающего синтеза гистонов происходит дальнейшее снижение количества транскрибируемых генов. При этом с возрастом увеличивается количество гистонов и понижается содержание негистоновых белков в дезоксирибонуклеопротеидном (ДНП) комплексе. Снижение транскрипционной активности хроматина всегда связано с увеличением в нем гистоновых белков. Например, снижение матричной активности генетического аппарата в процессе постнатального развития сердечной мышцы (крысы) связано с повышением со-

отношения гистоны: ДНК. В процессе постнатального развития печени (крысы) в хроматине увеличивается содержание гистонов и уменьшается содержание негистоновых белков.

Итак, в транскрипционно-активном хроматине или гистонов нет, или количество их снижено, или связь гистонов с ДНК ослаблена. Наличие или отсутствие нуклеосом коррелирует с транскрипционным статусом гена: нуклеосомы выявляются только в транскрипционно неактивных генах.

Кратко напомним морфологию хроматина. Хроматин — цепь фрагментов ДНК длиной ~146 пар нуклеотидов, намотанных на гистоновые октамеры (коровые нуклеосомы), состоящие из тетрамера  $(H3 + H4)_2$  и двух димеров  $(H2A + H2B)$ . Эти фрагменты соединены короткими (20–60 пар нуклеотидов) линкерными участками ДНК, связанными с H1 или белками HMG. Цепь ДНК с нуклеосомами упакована в фибриллы диаметром 30 нм, которые, в свою очередь, образуют петли или домены. Домены фиксированы на белковом скелете ядра, который называют также ядерным матриксом. Размер петель варьируется от 20 до 200 тысяч пар нуклеотидов, и множество отдельных генов и групп родственных генов организованы в отдельные петли. Репликоны также имеют отношение к петельной организации ДНК: участки начала репликации часто совпадают с участками прикрепления ДНК к ядерному матриксу. Размер доменов, как правило, совпадает с размером репликонов. Петли ДНК прикреплены к ядерному матриксу в специфических участках, называемых участками прикрепления петель. Они обладают довольно сложной структурой и могут состоять из нескольких элементов, например из участков взаимодействия с ДНК-топоизомеразой 2.

Различают два типа доменов генома: 1) функциональные домены — единицы транскрипции (транскриптоны) и единицы репликации (репликоны); 2) структурные домены. Наиболее четко охарактеризованными структурными доменами являются предпочтительно чувствительные к нуклеазам области. Такие области могут включать один или несколько (часто функционально сцепленных) генов и межгенные пространства. Размеры закрепленных на ядерном матриксе петель ДНК сопоставимы со средними размерами ДНКазы-чувствительных доменов.



Существенная роль в репрессии хроматина и его конденсации отводится гистону Н1. После синтеза гистон Н1 подвергается постсинтетическим обратимым модификациям: ацетилированию, фосфорилированию, АДФ-рибозилированию. АДФ-рибозилирование сопровождается деконденсацией хроматина его высших структур. Ацетилирование уменьшает положительный заряд аминогрупп и, следовательно, ведет к ослаблению взаимодействия белка с ДНК, поскольку повышение аффинности белков к ДНК связано с увеличением суммарного положительного заряда. В свою очередь, фосфорилирование также уменьшает кооперативность связывания Н1 с ДНК. Н1 препятствует посадке транскрипционных факторов. Н1 предпочитает связываться с более длинными фрагментами ДНК, и в транскрипционно неактивных клетках отмечается увеличение линкерной ДНК. Итак, присутствие обогащенных аргинином линкерных белков и большая длина линкерной ДНК обеспечивают плотную упаковку нуклеосом и суперкомпактное состояние хроматина в транскрипционно неактивных клетках. Гетерохроматизация же хромосом (потеря ими активности) является ключевым фактором старения.

Опубликованы работы, которые доказывают, что потеря нуклеосом является не следствием, а причиной инициации транскрипции *in vivo*. Последними исследованиями показано, что первая стадия перестройки хроматина при инициации транскрипции — это связывание транскрипционного активатора с нуклеосомной ДНК-матрицей (при ацетилировании нуклеосом), что ведет к полному разрушению структуры нуклеосом без вытеснения гистонов. При реконструкции хроматина в различных вариациях гистонов восстановление нуклеосом полностью угнетает транскрипцию РНК-полимеразой 2, причем гистон Н1 является сильным ингибитором транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой, поскольку РНК-полимераза не может иницировать транскрипцию на ДНК, содержащей нуклеосомы. Установлено также, что гистоны нуклеосом и гистон Н1 при размещении в промоторной области генов индивидуально репрессируют транскрипцию и по-разному взаимодействуют с факторами транскрипции, связывающимися со специфическими последовательностями. Сборка нуклеосом на гене полностью

блокирует его транскрипцию. Гистонами, помимо репрессии транскрипции рРНК, тРНК и мРНК, непосредственно ингибируется синтез самой ДНК. Следовательно, гистоны понижают еще и репликативную активность генома, а это приводит к возрастному снижению митотической активности клеток, что при больших количествах однотипных клеток в органах и тканях и сложности системы метаболизма каждой отдельной клетки проявляется в позднем онтогенезе как старение клеточных популяций в системе многоклеточного организма.

Существует сходство молекулярных событий во всех процессах онтогенеза и на всех уровнях становления организма, например, при развитии эмбриона и при дифференцировке эмбриональных стволовых клеток. Итак, наиболее общий процесс онтогенеза, в том числе и его конечной стадии, состоит в том, что при старении происходит стремительная гетерохроматизация (инактивация) хромосом, что является ключевым фактором процесса старения при одновременном снижении уровня процессов репарации и увеличении частоты хромосомных аберраций, являющихся вторичными по отношению к гетерохроматизации. В этом процессе метилирование ДНК и деацетилирование гистонов являются взаимодополняющими факторами, участвующими в изменении структуры определенного хромосомного локуса и приводящими к отсутствию экспрессии.

По мнению Б.М. Ханжина (2004), в генетическом аппарате не существует некой центральной управляющей структуры, ответственной за направленные процессы онтогенеза, а универсальность авторегуляции генной активности показана в таких далеко отстоящих друг от друга элементах биосферы, как вирусы, бактерии и человек. Она доказана практикой генной инженерии. Это означает, что репрессия генома в клетках многоклеточного организма, которая происходит на всем протяжении онтогенеза — в эмбриогенезе, при созревании и старении организма, не вызвана какой-то специальной генетической запрограммированностью онтогенеза, а обусловлена в первую очередь дозой генов неспецифических репрессоров — генов гистонов, поскольку количество конечного продукта метаболизма зависит, как уже сказано, от числа копий данного гена [11].

### 5.4.2. Реализация одного из ведущих механизмов онтогенеза

Согласно точке зрения Б.М. Ханжина, основным движительным фактором онтогенеза является многоповторяемость генов гистонов в генетическом аппарате клеток организма. Она обеспечивает преимущественный синтез гистонов на всем протяжении онтогенеза, что и объясняет причину непрекращающейся в течение всей жизни репрессии генома клеток многоклеточного организма. При этом дифференциальная репрессия генетического аппарата модулируется структурой генома, его внешним окружением (структурой нуклеоплазмы, ядерной оболочки и перинуклеарной протоплазмы, процессами, происходящими в цитоплазме), межклеточными взаимодействиями и пр. Общая же схема построения организмов, от насекомых и до млекопитающих, общий план их строения заключены в общей структуре яйцеклетки, поскольку по наследству передается не только генетический аппарат, но и вся яйцеклетка в целом. Чрезвычайно важно подчеркнуть, что сам процесс репрессии генома, например снижение транскрипции и уровня рРНК, является одной из главных причин дифференцировки клеток. Дифференцировке клеток предшествует снижение синтеза рРНК, а в некоторых случаях ингибиторы транскрипции способны в малых дозах индуцировать дифференцировку. Описана индукция дифференцировки посредством ассоциации N1 с одним из промоторов ДНК, что прекращает взаимодействие с регуляторными элементами генов рРНК, прежде всего так называемым вышележащим связывающим фактором UBF — представителем HMG-семейства белков ядрышка, который позитивно регулирует синтез рРНК. UBF способен вытеснить N1 из нуклеосомного кора и ревертировать N1-опосредованную репрессию транскрипции Р-РНК, но N1 является более ДНК-аффинным конкурентом. Следует добавить, что сам N1 (как и H5) специфически ингибирует ацетилирование моно- и олигонуклеосом, что само по себе репрессирует геном. Показано, что ингибирование осуществляется главным образом за счет экранирования H3 хвостовыми участками линкерных гистонов, а не за счет конденсации хроматинового волокна [11].

Итак, молекулярно-генетическая основа дифференцировки — это активность специфических для каждой ткани *генов*. В каждой клетке, в том числе дифференцированной, сохраняется весь генетический аппарат (все гены). Однако активна в каждой из тканей лишь часть генов, ответственных за данную дифференцировку. Роль факторов дифференцировки сводится к строго избирательной активации (включению) этих генов. Механизм такого включения интенсивно изучается.

Активность определенных генов приводит к синтезу соответствующих белков, определяющих дифференцировку. Так, в эритроблестах синтезируется специфический белок красных кровяных клеток — гемоглобин, в мышечных клетках — миозин, в дифференцирующихся клетках поджелудочной железы — инсулин, трипсин, амилаза и др.; при дифференцировке хрящевой или костной ткани синтезируются ферменты, обеспечивающие образование и накопление вокруг клеток протеогликанов хряща и солей кости. Предполагается, что решающую роль в определении формы клеток, их способности к соединению друг с другом, их движениях в ходе дифференцировки играют белки клеточной поверхности.

## 5.5. Метаморфоз

Метаморфоз (от греч. *metamorphōsis* — превращение) у растений — видоизменения основных органов растения, связанные обычно со сменой выполняемых ими функций или условий функционирования. Метаморфоз происходит в онтогенезе растения и заключается в изменении хода индивидуального развития органа, которое выработалось и закрепилось в процессе эволюции. Метаморфозу более всего подвержены побег в целом и лист как его боковой орган, что связано с разнообразием влияющих на них условий среды.

У животных метаморфозом, или метаболией, называется глубокое преобразование строения организма в период постэмбрионального развития. Метаморфоз связан обычно с резкой сменой условий существования и образа жизни животного в течение его индивидуального развития — онтогенеза, например,

с переходом от свободноплавающего к прикрепленному образу жизни, от водного — к наземному или воздушному и т. п. Поэтому в *жизненном цикле* животных, развивающихся с метаморфозом, бывает хотя бы одна личиночная стадия, в которой организм существенно отличается от взрослого животного. При развитии с метаморфозом животные на разных стадиях онтогенеза выполняют разные функции, способствующие сохранению и процветанию вида. Уже у простейших, например у сосущих инфузорий, есть элементы метаморфоза: отпочковывающиеся новые особи имеют ресничный покров и плавают, затем теряют реснички, становятся прикрепленноживущими и питаются с помощью вытягивающихся трубочек. Для низших беспозвоночных (губки, кишечнополостные) характерен метаморфоз, при котором свободноплавающие личинки (паренхимула, амфибластула, планула) выполняют функцию расселения вида. Во многих случаях такой метаморфоз осложняется сменой поколений (фаз развития), размножающихся бесполом или половым путем (например, у сцифомедуз, многих плоских червей). Своеобразен некротический метаморфоз у немертин, у которых внутри личинки развивается будущая взрослая особь, а основная масса тела личинки отмирает.

При метаморфозе без чередования поколений (у многих беспозвоночных) из яйца выходит личинка, выполняющая расселительную функцию (например, трохофора морских многощетинковых червей, велигер морских моллюсков). При этом у взрослого животного различают ларвальные (сохранившиеся от первой личинки) и постларвальные (появившиеся позже) сегменты (например, у ракообразных антеннулы, антенны и мандибулы развиваются из придатков науплиуса и соответствуют ларвальным сегментам).

Переход к жизни в пресной воде и на суше привел к утрате личиночных стадий развития. Случаи, как, например, у виноградской улитки, когда из яйца вылупляется улитка, похожая на взрослую, но которая в яйце проходит стадию, напоминающую велигер морских форм, называется *криптометаболией*. У многих многоножек и низших бессяжковых насекомых в постэмбриональном периоде развития изменения связаны лишь с

увеличением числа сегментов и члеников усиков — *анаморфоз*. Для большинства первичнобескрылых насекомых характерно развитие без существенных изменений — *протометаболия*. Развитие крыльев у насекомых привело к разным изменениям в их онтогенезе. Если образ жизни ранних постэмбриональных стадий и взрослой формы сходен, из яйца выходит личинка (нимфа), похожая на взрослое насекомое, и изменения организации сопровождаются в основном постепенным ростом зачатков крыльев (*гемиметаболия*, *эпиморфоз*).

Если в онтогенезе происходит резкое разделение основных функций (питание в стадии личинки, расселение и размножение во взрослой стадии), то говорят о сложном метаморфозе (*голометаболия*). В этом случае червеобразная личинка обычно не похожа на взрослое насекомое. Переход личинки во взрослую форму сопровождается резкими изменениями организма и осуществляется на стадии непитающейся, обычно малоподвижной *куколки*, в теле которой происходит разрушение личиночных тканей и формирование органов взрослого насекомого (крыльев и др.). Личинки иглокожих (диплеурула, бипиннария, плутеус и др.), а также кишечнодышащих (торнария, хвостатая личинка асцидий) свободно плавают, выполняя функцию расселения вида.

Среди позвоночных метаморфоз известен у миног, личинка которых — пескоройка — живет в грунте, а взрослые миноги — полупаразиты рыб. У ряда рыб, например у двоякодышащих, личинка с наружными жабрами, а у взрослых особей жабры расположены в специальной полости, имеется у них также легкое. У земноводных из яйца выходит личинка — головастик, похожая на рыбку и обитающая в воде. По мере метаморфоза личиночные органы утрачиваются и появляются органы взрослого животного. Лягушонок с остатком хвоста выходит на сушу и вскоре приобретает облик взрослой лягушки.

Регуляция метаморфоза осуществляется гормонами. У насекомых в 1954 г. выделен и в 1966 г. синтезирован гормон проторакальных желез — экдизон, регулирующий метаморфоз и линьку. Задержку метаморфоза вызывает ювенильный гормон прилежащих тел. У земноводных метаморфоз регулируется гормонами щитовидной железы.

## 5.6. Филогенез

Термин «филогенез», или «филогения», используют для обозначения исторического развития живых организмов: как всего органического мира Земли, так и отдельных таксонов (от царств до видов). Его ввел Э. Геккель в 1866 г.

Раздел биологии, изучающий филогенез и его закономерности, называется *филогенетикой*. Исследование филогенеза и реконструкция его необходимы для развития общей теории эволюции и построения естественной системы организмов, выводы филогенетики важны также для исторической геологии и стратиграфии.

Прилагательное «филогенетический» используется в самых различных значениях. Например, филогенетической системой называют систему органического мира, отражающую степень родства между таксонами. При этом филогенетическая система должна быть синтезом наибольшего возможного числа признаков.

Выражение «филогенетические преобразования» следует понимать как преобразования в ходе исторического развития группы организмов.

Геккель предложил использовать для исследования филогенеза метод тройного параллелизма — сопоставление данных палеонтологии, сравнительной анатомии и эмбриологии. Ныне в филогенетике все шире используются данные генетики, биохимии, молекулярной биологии, этологии, биогеографии, физиологии, паразитологии.

Филогенез большинства групп носит характер адаптивной радиации. Графическое изображение филогенеза — родословное (или филогенетическое) дерево. Основная движущая сила, определяющая адаптивный характер филогенетических преобразований организмов, — естественный отбор.

Направления филогенеза ограничиваются исторически сложившимися особенностями генетической системы, морфогенеза и фенотипа каждой конкретной группы. Любые филогенетические преобразования происходят посредством перестройки онтогенезов особей, при этом приспособительную ценность могут иметь изменения любой стадии индивидуаль-

ного развития. Таким образом, филогенез представляет собой преемственный ряд онтогенезов последовательных поколений.

Наиболее хорошо исследован филогенез позвоночных (особенно высших групп), из беспозвоночных — моллюсков, иглокожих, членистоногих, плеченогих. Плохо изучен филогенез прокариот и низших растений. Дискуссионной остается проблема происхождения различных типов организмов и взаимоотношений между ними.

## 5.7. Связь между онтогенезом и филогенезом

Итак, онтогенезом называется индивидуальное развитие организма, а филогенезом — историческое развитие систематической группы организмов. Понятия онтогенеза и филогенеза неразрывно связаны между собой: с точки зрения эволюционной теории историческое развитие живой природы представляет собой череду онтогенезов.

Термины «онтогенез» и «филогенез» используются для описания *развития*, поэтому между этими понятиями существуют и признаки различия, и признаки сходства (табл. 5.1).

Впервые взаимосвязь онтогенеза и филогенеза была выявлена в начале XIX в. (К. Кильмейер, И. Меккель, К. Бэр). К. Бэр сформулировал *закон зародышевого сходства*: на ранних стадиях эмбриогенеза зародыши разных видов сходны между собой. Ф. Мюллер (1886) сформулировал *принцип recapитуляции*: признаки взрослых предков так или иначе повторяются в эмбриогенезе их потомков. Э. Геккель (1866) сформулировал биогенетический закон: онтогенез есть быстрое и краткое повторение филогенеза. Э. Геккель считал, что филогенез усложняется за счет удлинения онтогенеза путем добавления новых стадий: уже имеющиеся стадии развития не изменяются, а лишь сокращается их длительность. В XX в. проблемы эволюции онтогенеза разрабатывали А.Н. Северцов, И.И. Шмальгаузен, А. Сэдживик, Г. де Бер и др. Было введено понятие *репетиции* — повторения предковых признаков не для целых стадий онтогенеза, а лишь для отдельных органов. В настоящее время принята следующая формулировка биогенетического закона: онтогенез есть быстрое и краткое повторение филогенеза, но не для целых стадий, а лишь для отдельных органов.



нетического закона: *в онтогенезе возможна частичная репетиция отдельных признаков и процессов, существовавших в онтогенезе предковых форм.*

Повторение структур, характерных для предков, в эмбриогенезе потомков названо *рекапитуляциями*. Рекапитулируют не только морфологические признаки — хорда, закладки жаберных щелей и жаберных дуг у всех хордовых, но и особенности биохимической организации и физиологии.

Таблица 5.1

## Сравнительная характеристика онтогенеза и филогенеза

Критерий сравнения	Онтогенез	Филогенез
<b>Признаки различия</b>		
Исходная запрограммированность процессов	Наличие уникальной неизменной генетической программы развития, сформированной вследствие мейоза и оплодотворения	Генофонд эволюционирующей группы непрерывно изменяется, ряд изменений генофонда связан с адаптационным процессом
Продолжительность и периодизация	Протекает в сжатые сроки, существует начало и окончание	Протекает в исторически длительные сроки и принципиально не ограничен
<b>Признаки сходства</b>		
Обратимость или необратимость	Невозможен возврат к предыдущим стадиям	Исчезнувший признак не может вновь появиться в прежнем виде
Углубление специализации	По мере развития уменьшается вероятность смены траектории онтогенеза	Группа, вступившая на путь специализации, не покидает его
Наличие адаптивной радиации	Поливариантность онтогенеза обеспечивает возможность приспособления к различным условиям	Группа, у которой появляется безусловно прогрессивный признак, дает начало множеству новых групп, формирующих множество новых экологических ниш обитания

Окончание табл. 5.1

Критерий сравнения	Онтогенез	Филогенез
Равномерность или неравномерность процессов	Скорость процессов роста изменяется	Темпы эволюционных преобразований различны: медленные ( <i>брадителлическая эволюция</i> ), средние ( <i>горотеллическая эволюция</i> ) и быстрые ( <i>тахителлическая эволюция</i> )
Целостность и преемственность отдельных этапов	Признаки, появляющиеся на более поздних стадиях, базируются на признаках, проявляющихся на ранних стадиях	Новые, эволюционно молодые группы организмов вбирают в себя все эволюционные достижения предковых групп
Наличие цикличности	Цикличность старения и омоложения	Различные механизмы эволюции закономерно сменяют друг друга

Так, в эволюции позвоночных происходит постепенная утрата ферментов, необходимых для распада мочевой кислоты — продукта метаболизма пуринов. У большинства беспозвоночных конечный продукт распада мочевой кислоты — аммиак, у земноводных и рыб — мочевины, у многих пресмыкающихся — аллантаин, а у некоторых млекопитающих мочевая кислота вообще не расщепляется и выделяется с мочой. В эмбриогенезе млекопитающих и человека отмечены биохимические и физиологические рекапитуляции: выделение ранними зародышами аммиака, позже мочевины, затем аллантаина, а на последних стадиях развития — мочевой кислоты.

Однако в онтогенезе высокоорганизованных организмов не всегда наблюдается строгое повторение стадий исторического развития, как это следует из биогенетического закона. Так, зародыш человека никогда не повторяет взрослых стадий рыб, земноводных, пресмыкающихся и млекопитающих, а сходен по ряду черт лишь с их зародышами. Ранние стадии развития сохраняют наибольшую консервативность, благодаря чему рекапитулируют более полно, чем поздние. Это связано с тем, что одним из наиболее важных механизмов интеграции ранних этапов эмбриогенеза является эмбриональная индукция,

а структуры зародыша, формирующиеся в первую очередь, такие как хорда, нервная трубка, глотка, кишка и сомиты, представляют собой организационные центры зародыша, от которых зависит весь ход развития.

Генетическая основа рекапитуляции заключена в единстве механизмов генетического контроля развития, сохраняющемся на базе общих генов регуляции онтогенеза, которые достаются родственным группам организмов от общих предков.

## 5.8. Эмбриональные адаптации.

### Модусы филэмбриогенеза.

### Автономизация и эмбрионизация онтогенеза

Эмбриональным развитием называются ранние стадии онтогенеза, которые протекают под защитой яйцевых оболочек, зародышевых оболочек или материнского организма.

#### 5.8.1. Эмбриональные (эмбрионально-личиночные) адаптации

У животных существуют следующие *типы эмбрионального развития*:

1. Первично-личиночный: личинка способна к самостоятельному существованию. Такими являются, например, паренхимула (губки), планула (кишечнополостные), трохофора (полихеты), головастик (амфибии). Первично-личиночный тип развития связан с многоэтапностью онтогенеза.

2. Неличиночный яйцекладный — прохождение ранних этапов гисто- и морфогенеза под защитой яйцевых оболочек (насекомые с прямым развитием, яйцекладущие амниоты).

3. Вторично-личиночный. Характеризуется разнообразием вторичных типов личинок. Например, личинки насекомых с полным превращением возникают в связи с половозрастной дифференциацией экологических ниш. Отдельно выделяют личинок-паразитов.

4. Внутриутробное развитие и живорождение: яйцеживорождение (многие нематоды, скорпионы, рыбы, пресмыкающиеся) и истинное живорождение (млекопитающие).

Независимо от типа эмбрионального развития зародыши и личинки должны иметь определенные приспособления (адаптации), обеспечивающие возможность его развития.

Все адаптивные признаки эмбрионов и личинок Э. Геккель разделил на две группы: ценогенезы и палингенезы. *Ценогенезы* — это приспособления к эмбрионально-личиночным стадиям (адаптивные признаки зародышей), которых не было у предковых форм, например зародышевые оболочки ленточных червей, насекомых и амниот. Иначе говоря, ценогенезы — это эмбриональные адаптации, т. е. признаки, имеющие адаптивное значение на ранних этапах онтогенеза. *Палингенезы* — это признаки взрослых предков, которые проявляются в эмбриогенезе потомков, например формирование зародышевых листков, жаберных дуг, однокамерного сердца. Онтогенез — целостный процесс, поэтому эволюционная ценность ценогенезов и палингенезов определяется конечным результатом — возможностью достижения репродуктивного возраста.

Эмбриональное развитие завершается полным или неполным метаморфозом. Метаморфоз — наиболее критический этап онтогенеза: эмбриональные адаптации исчезают, а дефинитивные (завершающие, конечные) адаптации еще не сложились. Поэтому при сложном жизненном цикле на каждом этапе онтогенеза формируются собственные эмбриональные адаптации. Например, у насекомых с полным метаморфозом стадия собственно эмбрионального развития характеризуется наличием серозной и амниотической оболочек, стадия личинки — определенными морфофизиологическими и поведенческими адаптациями (покровительственная или предохраняющая окраска, определенная поза), стадия куколки — другими морфофизиологическими адаптациями (плотные хитиновые покровы, паутинные коконы, покровительственная окраска).

На эмбрионально-личиночных стадиях адаптивное значение могут иметь не только ценогенезы, но и палингенезы, например внутренние жабры и двухкамерное сердце у головастика.

### 5.8.2. Филэмбриогенезы

*Филэмбриогенезы* — это эволюционные преобразования процессов онтогенеза, связанные с адаптациями взрослых (половозрелых) организмов.

Наиболее универсальными способами эволюционных изменений органов можно считать гетерохронии, гетеротопии и выпадение стадий онтогенеза (термины «гетерохрония» и «гетеротопия» ввел Э. Геккель).

*Гетерохрония* — это смещение времени закладки органа. Примеры гетерохронии: головной мозг позвоночных развивается быстрее, чем пищеварительная система; срастание тазовых костей у человека происходит позже, чем формирование головного мозга.

*Гетеротопия* — это смещение места закладки органа. Примеры гетеротопии: половые железы у трехслойных животных закладываются в мезодерме (у кишечнополостных — в эктодерме или в энтодерме); целом у первичноротых закладывается телобластическим путем, а у вторичноротых — энтероцельным.

Выпадение стадий онтогенеза связано с утратой личиночных стадий, стадии взрослого организма, промежуточных стадий онтогенеза. Примеры выпадения стадий онтогенеза: утрата стадий планулы и медузы у пресноводной гидры, утрата стадии трохофоры у олигохет и пиявок. При выпадении стадий онтогенеза биогенетический закон не выполняется. Так происходит, например, при утрате личиночных стадий и при педоморфозах.

В работе «Модусы филэмбриогенеза» (1935) А.Н. Северцов выделил 12 модусов (способов) филэмбриогенеза. К основным модусам филэмбриогенеза он отнес архаллакисы, девиации и анаболии.

*Архаллакисы* — это изменения на ранних стадиях онтогенеза.

Основные механизмы архаллакисов:

- изменение начальной массы зачатков органов;
- изменение начальных процессов дифференцировки зачатков органов;
- гетеротопии — изменение места закладки органов;
- гетерохронии — изменение времени закладки органов.

Путем архаллакисов могут возникать *ароморфозы* (зародышевые листки, хорда, нервная трубка и головной мозг у позвоночных, шерстный покров у млекопитающих), идиоадаптации (изменение числа зубов и позвонков), рудименты (отрицательные архаллакисы).

*Девииации* — изменения органов на средних этапах онтогенеза. Девииации встречаются чаще, чем архаллакисы. Путем девиации также могут возникать и ароморфозы, и идиоадаптации, и редуцированные органы.

Примеры девиаций:

- возникновение среднего уха за счет преобразования рудиментарной жаберной щели (брызгальца);
- возникновение сложных зубов у млекопитающих;
- видоизменение побегов у растений (клубни и луковицы);
- редукция спинной мускулатуры у черепах;
- преобразование уплотненного слоя эпидермиса в роговые щитки у рептилий и перья у птиц.

*Анаболии* — изменения онтогенеза на поздних стадиях развития. Представляют собой надставки к уже имеющимся стадиям. Биогенетический закон выполняется в целом лишь при анаболиях.

Анаболии встречаются чаще, чем девиации. Путем анаболии также могут возникать и ароморфозы, и идиоадаптации, и редуцированные органы. Примеры: формирование четырехкамерного сердца у теплокровных позвоночных, изменение формы листьев, редукция пальцев у копытных, редукция хвоста у головастиков.

## 5.9. Филогенетические преобразования органов и функций

Каждый орган неразрывно связан с выполнением определенных функций. Поэтому *филогенетические (эволюционные)* преобразования органов и функций представляют собой единый процесс.

Функциональные изменения органов основаны на их изначальной мультифункциональности. Например, крылья летучих мышей выполняют функции полета, терморегуляции, осязания, синтеза витамина D, улавливания добычи.

Различают следующие модусы филогенетических преобразований органов и функций.

Количественные функциональные изменения органов:

1. *Расширение функций.* Например, уши у слона служат дополнительным органом терморегуляции: кровеносная система выполняет функцию терморегуляции и защитную функцию.

**2. Сужение функций.** Например, конечности лошади утратили лазающую и хватательную функции. Сужение функций часто связано с их иммобилизацией — утратой функций в связи с редукцией органа.

**3. Интенсификация функций.** Например, увеличение переднего мозга привело к формированию второй сигнальной системы; развитие шерстного покрова обеспечило и терморегуляцию, и защиту от физико-химических повреждений. Интенсификация функций часто связана с их активацией — преобразованием пассивного органа в активный. Примеры: втяжные когти кошачьих, подвижные челюсти змей, использование метаболической воды обитателями степей и пустынь.

### 5.9.1. Качественные функциональные изменения органов

Выделяют несколько типов функциональных изменений органов в филогенезе:

**1. Смена функций** при специализации органа по Дорну (1875) — эволюционное преобразование органа, при котором одна из второстепенных функций становится более важной, чем прежняя главная функция. Например, подъязычная дуга висцерального черепа позвоночных последовательно сменила следующие функции: опорно-защитная функция второй пары жаберных дуг у предков рыб, участие в образовании брызгальца у низших рыб (скаты, осетровые, лопатоносы), опора для жаберной крышки у костных рыб, передача звуковых колебаний и глотание у наземных позвоночных. Передние конечности позвоночных преобразуются и в ласты, и в крылья. У цветковых растений лепестки — или видоизмененные трофофиллы, или микроспорофиллы. Возможность смены функций связана с механизмами преадаптации.

**2. Разделение функций.** Например, конечности членистоногих выполняют функции хождения, захвата и измельчения пищи, дыхания и др.; сплошной хвостовой плавник у водных позвоночных дифференцируется на рулевые спинной и анальный плавники и на двигательный хвостовой плавник.

**3. Фиксация функций.** Например, переход от стопохождению к пальцехождению в ходе естественного отбора и замещение ненаследственных изменений наследственными (данный модус не следует путать с ламарковским «законом упрощения и неупражнения»).

### 5.9.2. Субституция

В ходе эволюции часто наблюдается *субституция* (от лат. *substitūtio* — ставлю вместо, назначаю взамен) — замещение одного органа другим или передача функций от одного органа к другому. Различают субституцию органов и субституцию функций.

*Субституция органов*, или гомотопная субституция, — замещение в ходе эволюции одного органа другим, занимающим сходное положение в организме и выполняющим биологически равноценную функцию. В этом случае происходит редукция замещаемого органа и прогрессивное развитие замещающего. Так, у хордовых осевой скелет — хорда — замещается сначала хрящевым, затем костным позвоночником. В ряде случаев субституция приводит к появлению аналогичных органов, например у растений листья (фотосинтезирующие органы) замещаются филлодиями (уплощенными черешками) или филлокладиями (уплощенными стеблями). Термин «субституция органов» введен Н. Клейненбергом в 1886 г.

*Субституция функций*, или гетеротопная субституция, — утрата в ходе эволюции одной из функций (при этом выполнявший ее орган редуцируется) и замещение ее другой, биологически равноценной (выполняемой другим органом). Так, функция перемещения тела в пространстве при помощи ног (хождение) у змей замещена перемещением при помощи изгибаний позвоночника (ползание); дыхание с помощью жабр (извлечение кислорода из воды) у наземных позвоночных замещено газообменом в легких. Термин «субституция функций» введен А.Н. Северцовым в 1931 г.

Субституция тесно связана с *принципом компенсации* и редукцией органов. Например, у птиц редукция зубов связана с развитием мускулистого желудка.



# Глава 6. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

Эволюционные изменения могут касаться всех фаз онтогенеза, т. е. могут приводить к изменениям не только зрелых организмов, но и эмбрионов. Полагают, что признаки, характеризующие ранние фазы развития, должны отличаться большим консерватизмом, чем более поздние. Изменения на ранних этапах эмбриогенеза обычно приводят к большим изменениям в процессе дальнейшего развития.

## 6.1. Этапы раннего онтогенеза

К этапам раннего онтогенеза относятся оплодотворение и дробление.

*Оплодотворение* происходит при слиянии яйцеклетки со сперматозоидом, что ведет к образованию *зиготы*.

*Дробление* — это ряд последовательных митотических делений зиготы и далее бластомеров, заканчивающихся образованием многоклеточного зародыша — *бластулы*. Возникающие при дроблении клетки называют *бластомерами*. Сначала бластомеры прилегают друг к другу, образуя скопление клеток, называемое *морулой*. Затем между клетками образуется полость — *бластоцель*, заполненная жидкостью. Клетки оттесняются к периферии, образуя стенку бластулы — *бластодерму*. Общий размер зародыша к концу дробления на стадии бластулы не превышает размера зиготы.

Особенностью митотических делений дробления является то, что с каждым делением клетки становятся все мельче, пока не достигнут обычного для соматических клеток соотношения объемов ядра и цитоплазмы. У морского ежа, например, для этого требуется шесть делений и зародыш состоит из 64 клеток. Между очередными делениями не происходит роста клеток, но обязательно синтезируется ДНК.

В этом периоде уже существует сложная система митотического деления клеток, регулируемая циклинами и Cdk-киназами клеточного цикла:

- G1 начало — активность Cdk низкая (образуются пререпликационные комплексы на ДНК (ori));
- G2 середина — активность Cdk проявляется за счет ассоциации Cdk4 и Cdk6 с циклинами D1, D2 и D3, в результате наблюдается фосфорилирование белка Rb, который вызывает экспрессию генов циклинов E и A, Cdk1 и белков репликации;
- переход G1-S — необходимы комплексы циклин E-Cdk2 и циклин A-Cdk2, начало репликации;
- переход G2-M требует комплексов циклин A-Cdk1 и циклин B1-Cdk1 (служат для фосфорилирования белков цитоскелета, гистонов и белков оболочки ядра).

Изменения митотического деления могут быть вызваны некоторыми белками, в том числе p27 — Cdk-ингибитором: p27 нарушает конформацию комплекса циклин A-Cdk2, что ингибирует протеинкиназную активность и прекращает клеточный цикл

В это время мультипротеиновые комплексы конденсин и кохезин участвуют в формировании митотических хромосом. Каждая митотическая хромосома включает пару сестринских хроматид, связанных белковым комплексом кохезина. Особую роль играет трехслойная структура кинетохора метафазной хромосомы: внутренняя пластинка содержит белки для связи с центромерным гетерохроматином, наружная пластинка — фиброзную корону, связанную с биохимическими моторами движения, — динеины и кинезины перемещают хромосому по микротрубочкам. Для деления клеток функционирует центросомный цикл: в конце митоза центросома содержит две центриоли, расположенные под прямым углом; в S-фазе формируется пара дочерних центриолей; дочерние центриоли растут в G2-фазе, а в начале митоза разделяются на две центросомы, содержащие по две центриоли.

В профазе образуется митотическое веретено, которое образовано двумя центросомами, между ними располагаются микротрубочки, состоящие из белка тубулина. Каждое деле-

ние клеток включает синхронизированные во времени процессы разрушения и восстановление надмолекулярных структур. Так, например, рассматривается модель разрушения ядерной оболочки: цитоплазматические моторы-динеины во время профазы и ранней метафазы перемещают ядерную оболочку по микротрубочкам в сторону centrosомы, что ведет к ее напряжению и фрагментации. Для разрушения белковых факторов, выполнивших свою роль в делении клеток, существует убиквитин-зависимый механизм в протеасомах. Кроме того, не исключено действие белков, способных прекратить клеточный цикл (the spindle checkpoint, т. е. отметка, отменяющая стадию клеточного цикла). Так, присутствие белка Mad2 на кинетохоре хромосомы не позволяет хромосоме занять свое место в метафазной пластинке, что будет препятствовать началу анафазы митоза. И наконец, образование контрактильного кольца в процессе цитокинеза требует полимеризации актина [22].

Скорость продвижения репликационной вилки по ДНК в ходе дробления обычная. Вместе с тем в ДНК бластомеров наблюдается больше точек инициации, чем в соматических клетках. Синтез ДНК идет во всех репликациях одновременно и синхронно. Поэтому время репликации ДНК в ядре совпадает с временем удвоения одного, притом укороченного репликаона.

В начале дробления другие виды ядерной активности, например транскрипция, практически отсутствуют. В разных типах яиц транскрипция генов и синтез РНК начинаются на разных стадиях. В тех случаях, когда в цитоплазме много различных веществ, как, например, у земноводных, транскрипция активируется не сразу. Синтез РНК у них начинается на стадии ранней бластулы. Напротив, у млекопитающих синтез РНК начинается уже на стадии двух бластомеров.

В периоде дробления образуются РНК и белки, аналогичные синтезируемым в процессе овогенеза. В основном это гистоны, белки клеточных мембран и ферменты, необходимые для деления клеток. Названные белки используются сразу же наравне с белками, запасенными ранее в цитоплазме яйцеклеток.

Наряду с этим в период дробления возможен синтез белков, которых не было ранее. В пользу этого свидетельствуют

данные о наличии региональных различий в синтезе РНК и белков между бластомерами. Иногда эти РНК и белки начинают действовать на более поздних стадиях.

*Гастрюляция* — стадия, когда однослойный зародыш — бластула — превращается в *многослойный*, двух- или трех-слойный, называемый *гастроулой* (от греч. *gastēr* — желудок).

У примитивных хордовых, например у ланцетника, однородная однослойная бластодерма во время гастрюляции преобразуется в наружный зародышевый листок — *эктодерму* и внутренний зародышевый листок — *энтодерму*. Энтодерма формирует первичную кишку с полостью внутри — *гастроцель*. Отверстие, ведущее в гастроцель, называют *бластопором*, или первичным ртом. *Два зародышевых листка* являются определяющими морфологическими признаками гастрюляции. Их существование на определенной стадии развития у всех многоклеточных животных, начиная с кишечнополостных и кончая высшими позвоночными, позволяет думать о гомологии зародышевых листков и единстве происхождения всех этих животных. У позвоночных во время гастрюляции, помимо двух упомянутых, образуется еще и третий зародышевый листок — *мезодерма*, занимающая место между экто- и энтодермой. Заметим, что мезодерма в процессе эволюции впервые образуется у плоских червей. Процесс гастрюляции характеризуется важными клеточными преобразованиями, такими как направленные перемещения групп и отдельных клеток, избирательное размножение и сортировка клеток, начало цитодифференцировки и индукционных взаимодействий.

Для ранних этапов эмбриогенеза характерны древние механизмы анаэробного способа образования энергии. В анаэробных условиях пируват восстанавливается в лактат — это анаэробный гликолиз. В гликолизе методом субстратного фосфорилирования образуются 2 молекулы АТФ на 1 молекулу глюкозы или 3 молекулы АТФ, если глюкоза поступала из гликогена в виде Г-1-Ф (гликогенолиз). Для сравнения отметим, что в аэробных условиях и при наличии в клетках митохондрий пируват переносится в митохондрии, где окислительно декарбоксилируется до ацетил-КоА; ацетильная

группа ацетил-КоА окисляется и декарбоксилируется в ЦТК (цикле Кребса); пять пар атомов водорода (одна пара получена на 1-м этапе и четыре пары из ЦТК — на 2-м этапе) поступают в цепь переноса электронов (ЦПЭ), где методом окислительного фосфорилирования образуется АТФ. В аэробных условиях при окислении одной молекулы глюкозы до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  образуется 30–32 АТФ. Следовательно, аэробное окисление глюкозы эффективнее анаэробного в 15–16 раз.

На фазу гастрюляции приходится начало цитодифференцировки, что означает переход к активному использованию биологической информации собственного генома.

## 6.2. Органогенезы

*Органогенезы*, заключающиеся в образовании отдельных органов, составляют основное содержание эмбрионального периода. Они продолжаются в личиночном и завершаются в ювенильном периоде. Органогенезы отличаются наиболее сложными и разнообразными морфогенетическими преобразованиями. Необходимой предпосылкой перехода к органогенезам является достижение зародышем стадии гастрюлы, а именно формирование зародышевых листков. Занимая определенное положение по отношению друг к другу, зародышевые листки, контактируя и взаимодействуя, обеспечивают такие взаимоотношения между различными клеточными группами, которые стимулируют их развитие в определенном направлении. Это так называемая *эмбриональная индукция* — важнейшее следствие взаимодействия между зародышевыми листками.

В ходе органогенезов изменяются форма, структура и химический состав клеток, обособляются клеточные группы, представляющие собой зачатки будущих органов. Постепенно развивается определенная форма органов, устанавливаются пространственные и функциональные связи между ними. Процессы морфогенеза сопровождаются дифференциацией тканей и клеток, а также избирательным и неравномерным ростом отдельных органов и частей организма. Обязательным условием

органогенезов наряду с размножением, миграцией и сортировкой клеток является их избирательная гибель.

Самое начало органогенеза называют *нейруляцией*. Нейруляция охватывает процессы от появления первых признаков формирования нервной пластинки до замыкания ее в нервную трубку. Параллельно формируются хорда и вторичная кишка, а лежащая по бокам от хорды мезодерма расщепляется в краниокаудальном направлении на сегментированные парные структуры — *сомиты*.

Нервная система позвоночных, включая человека, отличается устойчивостью основного плана строения на протяжении всей эволюционной истории подтипа. Для этого периода важны два процесса: начало формирования сосудов и связь клеток с элементами межклеточного вещества. Эти органотрофические процессы сопровождаются нарастанием мощности аэробных процессов, а следовательно, и эффективности биохимических молекулярных моторов. Молекулярные моторы — это ферменты, трансформирующие химическую энергию в механическую работу.

В эукариотических клетках выделяют три различных класса моторов: миозины, кинезины и динеины.

В этих моторах необходимы следующие условия:

- наличие протяженной полярной структуры, вдоль которой в одном направлении перемещаются актиновые филаменты (например, миозин в мышечном сокращении) и микротрубочки (кинезины и динеины);
- молекулярная организация взаимодействующих субъединиц должна обеспечивать однонаправленное движение;
- энергия для движения получается при гидролизе АТФ и реализуется через конформационные изменения белков;
- связывающие центры для АТФ и подвижных элементов локализованы в глобулярных каталитических доменах, называемых головками;
- взаимодействие субъединиц молекулярных моторов обеспечивает перемещение структур в вязкой цитоплазме.

В настоящее время известны 18 классов миозинов, 10 семейств кинезинов и две группы динеинов. Три типа моторов различаются по молекулярной массе: кинезины — 45 кДа,

миозины — 100 кДа и динеины — 500 кДа, по структуре — кинезины и миозины. Молекулярные моторы используются различными живыми организмами для обеспечения клеточной активности: контракции, транспорта органелл, подвижности клеток, клеточного деления, передачи информации, процессов развития и др. (табл. 6.1).

Таблица 6.1

**Использование молекулярных моторов в функционировании клеток (Schliwa M., 2006)**

Функция клетки	Кинезины	Миозины	Динеины
Транспорт органелл	+	+	+
Эндоцитоз		+	
Митоз/мейоз	+	+	+
Цитокинез	+	+	
Транспорт РНК	+	+	
Флагеллярная подвижность			+
Динамика микротрубочек	+		+
Взаимодействие микротрубочек	+		+
Взаимодействия актина	+		
Поддержание левой/правой асимметрии	+		+
Движение клеток, формирование		+	
Движение микроворсинок и филоподий		+	
Передача информации	+	+	
Связывание с другими моторами	+	+	+
Воспринимающие функции	+	+	+
Транспорт вирусов	+		+

Макромолекулы экстрацеллюлярного матрикса — протеогликаны формируют матрикс, в котором находятся белки фибронектин, коллаген и ламинин, имеющие места связывания друг с другом и с рецепторами — интегринами.

В организме млекопитающих коллаген составляет 25 % от всех белков. Это левая спираль с шагом 0,96 нм и 3,3 остатка в каждом витке, более пологая по сравнению с  $\alpha$ -спиралью.

Здесь, в отличие от  $\alpha$ -спирали, образование водородных мостиков невозможно. Известны более 15 типов коллагеновых молекул (изоколлагены).

Выделяют следующие типы коллагенов, важных для органогенеза:

- тип I [ $\alpha(1)$ ] $2\alpha 2(I)$  и тип II [ $\alpha(II)$ ] $3$  — кости, дентин, роговица, гиалиновый хрящ;
- тип III [ $\alpha(III)$ ] $3$  — дерма, десны, клапаны сердца;
- тип IV [ $\alpha(IV)$ ] $3$  — базальные мембраны;
- тип V [ $\alpha(V)$ ] $2\alpha 2(V)$  и тип VI  $\alpha 1(VI)$ ,  $\alpha 2(VI)$  — кости, роговица, клапаны сердца, артериальные сосуды;
- тип VII  $\alpha 1(VII)$  и тип VIII  $\alpha 1(VIII)$  — эндотелий сосудов;
- тип IX  $\alpha 1(IX)$   $\alpha 2(IX)$  и тип X  $\alpha 1(X)$  — хрящевая ткань.

Изоколлагены типов I—III образуют фибриллы, изоколлагены типов IV и VII являются сетьформирующими, например в базальных мембранах, изоколлагены IX и XII участвуют в образовании фибрилл. Существуют также два белка, важных для поддерживающей и формообразовательной функций в органогенезе: *ламнин* — это белок, состоящий из трех полипептидных цепей, организованных в виде крестообразной структуры, причем домены ламинина связывают коллаген типа IV, гепарансульфат и гликопротеины поверхности клеток; *энтактин* служит для связывания между ламинином и коллагеном. Коллаген типа IV, гепарансульфат, ламинин и энтактин могут образовывать *базальные мембраны*. Коллаген типа IV на 1/4 длиннее молекул других типов коллагена (при биосинтезе не теряются концевые телопептиды), что позволяет ему создавать двухмерную сеточку, к которой прикрепляются эндотелиальные и эпителиальные клетки и которая образует ложе для мышечных и жировых клеток. При резком уменьшении содержания коллагена типа IV эпидермис легко отделяется от дермы (пузырчатка).

*Протеогликаны* — это сложные белки, в которых с молекулами белка ковалентно связаны гликозамингликаны. Схема строения протеогликанов:

1. Гликозамингликаны (кератансульфат, хондроитинсульфат и др.) соединены через связывающий трисахарид (галактоза — галактоза — ксилоза) с серином корового белка.



2. Коровый белок присоединяется к гиалуроновой кислоте, образуя структуру типа ершика для мытья пробирок.

3. Гиалуроновая кислота состоит из 250 тысяч несulfатированных дисахаридных единиц. Она образует свободные от клеток пространства для целлюлярной миграции в норме и при патологии.

4. Функции протеогликанов: а) специфически взаимодействуют с коллагеном, эластином, фибронектином и др.; б) являясь полианионами, связывают катионы; в) определяют форму и упругоэластические характеристики органов; г) участвуют в рецепции, эндо- и экзоцитозе, межклеточном взаимодействии; д) регулируют процессы трансмембранного переноса (например, клубочковую фильтрацию), включая работу синапсов; е) обеспечивают гомеостатическое действие (антикоагулянтное действие, функционирование тучных клеток и др.); ж) образуя структуры типа молекулярных сит (гель), обеспечивают барьерную функцию, защищая организм от проникновения микробов, чужеродных молекул, токсинов.

Во внеклеточном веществе имеется ряд адгезивных неколлагеновых белков, имеющих последовательности арг-гли-асп (RGD) и служащих для белково-лигандных взаимоотношений (например, с интегральными белками плазматических мембран — интегринами). *Адгезивными белками* считают фибронектин, ламинин, нидоген, фибриллярные коллагены и коллаген IV типа — их относят к белкам «зрелой» соединительной ткани. *Фибронектин* — гликопротеин, состоящий из двух субъединиц, которые связаны на С-концах двумя дисульфидными связями. В каждой субъединице до 15 раз повторяется одна и та же последовательность из 90 аминокислотных остатков. Эти домены являются местами специфического связывания с гепарином, коллагеном, поверхностями клеток. Фибронектин регулирует миграцию клеток в межклеточном веществе соединительной ткани.

Для распада белковых молекул межклеточного вещества служат металлопротеиназы матрикса (МПМ) и их тканевые ингибиторы (ТИМПМ).

*Металлопротеиназы* — это цинкзависимые ферменты, катализирующие распад протеогликанов, гликопротеинов и коллагена: 72 кДа желатиназа (МПМ-2, коллагеназа А) расщепляет денатурированный коллаген, коллаген типов IV, V, VII и X, эластин, фибронектин; 92 кДа желатиназа (МПМ-9, коллагеназа В) расщепляет желатин, коллаген типов IV и V, фибронектин; нейтрофильная коллагеназа (МПМ-8) расщепляет коллагены типов I–III; стромализины (МПМ-3, МПМ-10, МПМ-11) расщепляют протеогликаны, фибронектин, ламинин; матрилизин (МПМ-7) расщепляет фибронектин, ламинин, протеогликаны, эластин, энтактин и др.

Межклеточное вещество играет важную роль в фиксации клеток. В плазматической мембране клеток имеются специальные белки *интегрины*, которые служат для связи мембраны с белками внеклеточного матрикса (коллаген, фибронектин), а также через цитоплазматические белки винкулин и талин — с цитоскелетом клетки. Это один из способов фиксации клетки в определенном месте органа. Большое значение в функционировании клеток в органе имеют межклеточные контакты, а также контакты с базальной мембраной (кожа, кишечник).

Таким образом, процессы органогенеза требуют существенной активации экспрессии групп генов, обеспечивающих:

- формирование структурных компонентов клеток;
- синтез молекул внеклеточного матрикса, позволяющего быть транспортной средой для метаболитов;
- конструирование системы фиксации клетки в сетке межклеточного матрикса за счет интегринов, внеклеточных и внутриклеточных белков;
- синтез белков и других компонентов для формирования органелл;
- создание молекул и везикулярных структур для внутриклеточного транспорта веществ в рамках механизмов экзоцитоза и эндоцитоза;
- формирование механизмов сортировки и адресной поставки молекул;

- функционирование внутри- и межклеточной систем сигналинга;
- молекулярную основу для реализации специфической функции данного типа клеток.

### 6.3. Генотип

При половом размножении в процессе оплодотворения геномы двух родительских половых клеток объединяются, образуя *генотип нового организма*. Все соматические клетки такого организма обладают двойным набором генов, полученных от родителей в виде определенных аллелей. Таким образом, генотип — это генетическая конституция организма, представляющая собой совокупность всех наследственных задатков его клеток, заключенных в их хромосомном наборе — кариотипе.

Каждый вид хромосом в кариотипе, содержащий определенный комплекс генов, представлен двумя гомологами, унаследованными от родителей с их половыми клетками. Двойной набор генов, заключенный в кариотипе, генотип — это уникальное сочетание парных аллелей генома. В генотипе содержится программа развития конкретной особи.

Любые мутационные изменения в наследственном материале гамет — генеративные мутации — становятся достоянием следующего поколения, если такие гаметы участвуют в оплодотворении. Поэтому отклонения в течении митоза или мейоза в клетках-предшественницах гамет имеют большое эволюционное значение. Если же мутации любого ранга (генные, хромосомные или геномные) возникают в соматических клетках (соматические мутации), они передаются только потомкам этих клеток, т. е. не выходят за пределы данного организма. Исключение составляют соматические мутации, возникшие в клетках органов вегетативного размножения, от которых они передаются новому поколению организмов. Одной из причин соматических мутаций являются патологические митозы. При нарушении нормального течения митоза (нерасхождение хроматид отдельных хромосом, многополюсные митозы и т. д.) дочерние клетки получают аномальную наследственную про-

грамму и их дальнейшее развитие отклоняется от нормы. Патологические митозы часто наблюдаются в клетках злокачественных опухолей.

В качестве наглядного примера роли генотипа в формировании фенотипа можно привести современные данные о роли генов в спортивных достижениях. В 2003 г. была успешно реализована тринадцатилетняя международная программа «Геном человека», согласно которой все структурно-функциональные проявления жизнедеятельности определяются функционированием 20–30 тыс. генов. Среди них более 240 генов связаны с различными видами двигательной активности, т. е. их можно причислить к «спортивным» генам. К ним относят:

- гены сердечно-сосудистой системы *ACE* — ангиотензин-превращающий фермент; *AGT* — ангиотензиноген; *AGTR1* — ангиотензин 2 рецептор 1; *AGTR2* — ангиотензин 2 рецептор 2; *BDKRB2(BKR2)* — брадикинин рецептор B2; *REN* — ренин; *NOS3* — синтаза оксида азота; *ADRB1 $\beta$ -1* — адренорецептор; *ADRB2 $\beta$ -2* — адренорецептор;
- гены свертываемости крови *F5 (FV)* — фактор 5 свертывания крови (Лейден); *ITGB3(GPIIIa)* — рецептор тромбоцитарного гликопротеина IIIa; *F2 (FII)* — протромбин; *PAI1* — ингибитор активатора тканевого плазминогена I типа;
- гены метаболизма и энергетического обмена *PPARA $\alpha$*  — рецептор, активируемый пролифератором пероксисом; *PPARD $\delta$*  — рецептор, активируемый пролифератором пероксисом; *PPARG $\gamma$*  — рецептор, активируемый пролифератором пероксисом; *UCP2* — разобщающий белок 2; *UCP3* — разобщающий белок 3; *PPARGC1A(PGCA1)* — коактиватор 1- $\alpha$ ; *APOE* — аполипопротеин E; *APOC3* — аполипопротеин CIII; *NOS3* — эндотелиальная синтаза оксида азота;
- гены, характеризующие особенности и строение поперечно-полосатой мышечной ткани, *ACTN3* —  $\alpha$ -актин-3; *AMPD1* — АМФ-дезаминаза (M-изоформа);
- гены нейромедиаторов *SLC6A4* — серотонин; *HTR2A(SR)* — рецептор серотонина; *DRD2* — рецептор дофамина;
- гены структуры и метаболизма костной и соединительной ткани *COL1A1* — проколлаген  $\alpha$ -1; *VDR* — рецептор витамина D;

- факторы некроза опухолей *TNFA* — фактор некроза опухоли  $\alpha$ ;
- гены системы детоксикации *ABCB1 (MDR1)* — АТФ-зависимая кассета; *CYP2D6* — цитохром 2d6; *CYP2C9* — цитохром 2c9.

В докторской диссертации И.И. Ахметова «Молекулярно-генетические маркеры физических качеств человека» (2010) приведены следующие заключения:

1. Доказана объективность использования полиморфизмов генов в качестве маркеров предрасположенности к различным видам спорта, направленным на развитие и проявление выносливости, быстроты и силы. Показана значимо более высокая частота *NFATC4 Gly160*, *PPARA rs4253778 G*, *PPARD rs2016520 C*, *PPARGC1A Gly482*, *PPARGC1B 203Pro*, *PPPSR1 51*, *TFAM 12Thr*, *UCP2 55Val*, *UCP3 rs1S00849 T* и *VEGFA rs2010963 C* аллелей в группе стайеров и более высокая частота *HIF1A 582Ser*, *PPARA 1S4253778 C*, *PPARG 12A1a* и *PPARGC1B 203Pro* аллелей в группе спортсменов, занимающихся скоростно-силовыми видами спорта, по сравнению с контрольной выборкой. У титулованных спортсменов отмечается значимо более высокая частота этих аллелей по сравнению с менее квалифицированными спортсменами, что в соответствии с генетической концепцией спортивного отбора отражает накопление благоприятствующих определенной двигательной деятельности вариантов генов у спортсменов высокой квалификации.

2. Доказаны: а) аддитивное влияние изученных полиморфизмов генов на предрасположенность к занятиям различными видами спорта; б) вероятность достижения высоких результатов в видах спорта, направленных на развитие выносливости либо быстроты (силы), повышается с увеличением носительства числа аллелей, ассоциированных с этими качествами. Индивиды с наличием девяти и более аллелей выносливости (какие-либо из *NFATC4 Gly160*, *PPARA rs4253778 G*, *PPARD rs2016520 C*, *PPARGC1A Gly4S2*, *PPARGC1B 203Pro*, *PPP3R1 51*, *TFAM 12Thr*, *UCP2 55Val*, *UCP3 rs1800849 T* и *VEGFA rs2010963 C* аллелей) имеют в 3 раза большие шансы

стать выдающимися стайерами, чем носители меньшего числа аллелей выносливости. Индивиды с наличием трех и более аллелей быстроты (силы) — какие-либо из *HIF1A* 582Ser, *PPARA* rs4253778 C, *PPARG* 12A1a, *PPARGC1B* 203Pro аллелей — имеют в 2,4 раза больше шансов стать выдающимися спортсменами в видах спорта, направленных на развитие быстроты и силы, чем носители меньшего числа аллелей быстроты (силы).

3. Выявлены закономерные взаимосвязи генетических маркеров и функциональных признаков: результаты физиологического тестирования гребцов-академистов показали статистически значимую взаимосвязь *HIF1A* Pro582, *NFATC4* Gly160, *PPARA* rs4253778 G, *PPARGC1A* Gly482, *PPARGC1B* 203Pro, *PPP3R1* 5I, *TFAM* 12Thr, *UCP2* 55Val, *UCP3* rs1800S49 T, *VEGFA* rs2010963 C аллелей с высокой физической работоспособностью (суммарный вклад этих аллелей в фенотипическую дисперсию максимального потребления кислорода составляет 21,1 %). У гребцов *HIF1A* Pro582, *NFATC4* Gly160, *PPARA* rs4253778 G, *PPARD* rs2016520 C, *PPARGC1A* Gly482, *PPARGC1B* 203Pro, *PPP3R1* 5I, *TFAM*, *UCP2* 55Val, *UCP3* rs1800849 T и *VEGFA* rs2010963 C аллели ассоциированы с высокими значениями мышечной и аэробной выносливости. У детей среднего школьного возраста *HIF1A* 582Ser, *PPARA* rs4253778 C, *PPARD* rs2016520 T, *PPARG* 12A1a, *PPARGC1A* 482Ser и *PPARGC1B* 203Pro аллели ассоциированы с высокими скоростно-силовыми показателями. У спортсменов, занимающихся силовыми видами спорта, *HIF1A* 582Ser, *PPARGC1A* 482Ser и *UCP2* 55Val аллели взаимосвязаны с высокими значениями силы (суммарный вклад этих аллелей в фенотипическую дисперсию силы составляет 23 %).

4. Установлена связь между полиморфизмами генов и антропометрическими (композиционными) показателями: *HIF1A* Pro582, *PPARA* rs4253778 G, *PPARD* rs2016520 C и *PPARG* Prol2 аллели ассоциированы с высоким содержанием медленных мышечных волокон. *HIF1A* 582Ser, *PPARA* rs4253778 C, *PPARD* rs2016520 T, *PPARG* 12A1a аллели ассоциированы с преобладанием быстрых мышечных волокон *m. vastus lateralis* у физически активных мужчин и конькобежцев (суммарный

вклад аллелей в фенотипическую дисперсию состава мышечных волокон составляет 25 %). *HIF1A* 582Ser, *PPARD* rs2016520 T, *PPARGC1A* 482Ser, *PPP3R1* 5D, *UCP2* 55Val и *VEGFA* rs2010963 C аллели взаимосвязаны с выраженной мышечной массой (суммарный вклад аллелей в фенотипическую дисперсию мышечной массы составляет 25 %). *PPARA* rs4253778 C, *PPARD* rs2016520 T, *PPARG* 12Ala, *PPARGC1A* 482Ser и *UCP2* 55Val аллели сопряжены с высоким жиротложением (суммарный вклад аллелей в фенотипическую дисперсию жировой массы составляет 32 %) у спортсменов, занимающихся силовыми видами спорта. *PPARGC1A* 482Ser и *PPARG* 12A1a аллели ассоциированы с высоким ростом у спортсменов, занимающихся академической греблей, конькобежным многоборьем и баскетболом, а также у детей среднего школьного возраста.

## 6.4. Пути приобретения организмами биологической информации

Благодаря генетической рекомбинации, которая закономерно происходит в процессе гаметогенеза и при оплодотворении, половое размножение представляет собой *эволюционно обусловленный механизм обмена генетической информацией между организмами одного биологического вида*.

Однако некоторые факты из области зоологии и особенно вирусологии и микробиологии указывают на то, что имеются пути приобретения биологической информации и от организмов других видов. Эта информация воспроизводится в фенотипе организма и определяет развитие признаков, не закодированных в генетическом материале родителей. Так, в клетках пищеварительного дивертикула брюхоногого моллюска *Elysia viridis* сохраняются хлоропласты поедаемой водоросли *Codium fragile*, в результате чего моллюск приобретает способность к фотосинтезу. Стрекательные капсулы гидроидных полипов, которых поедают некоторые реснитчатые черви, не перевариваются, а перемещаются в эпителиальный пласт и используются червем в качестве орудия защиты. В классической зоологии

такие примеры получили название *клеттогенеза*, или эволюции путем воровства.

Явление *трансдукции* заключается в том, что в генетический материал клетки-хозяина (бактериальной или эукариотической) встраивается нуклеиновая кислота вируса с фрагментом генома другой клетки. Привносимая таким образом биологическая информация вследствие редупликации чужеродной ДНК может передаваться в ряду клеточных поколений, а также воздействовать на состояние генетической системы клетки-хозяина, изменяя, например, частоту мутирования отдельных генов. Чужеродная ДНК может присутствовать в клетке в виде плазмид и эписом — фрагментов нуклеиновой кислоты, лишенных, в отличие от вирусных частиц, белковых чехлов. *Плазмиды* самостоятельны по отношению к хромосомам клетки-хозяина, а *эписомы* могут встраиваться в них. Биологическая информация плазмид и эписом, проявляясь в фенотипе, дает широкий круг признаков, включая устойчивость к антибиотикам.

Примеры проникновения в организм действующей биологической информации организмов из других таксонов, прежде всего вирусов, описаны у высших животных и человека. Так, сотрудники, длительно работающие в онкологических лабораториях с вирусной опухолью кроликов — папилломой Шопа, как правило, имеют пониженное содержание в плазме крови аминокислоты аргинина. Объясняется это тем, что вирус папилломы, которым заражены такие люди, несет ген синтеза аргиназы, катализирующей распад аргинина.

## 6.5. Реализация наследственной информации в индивидуальном развитии.

### Мультигенные семейства

В процессе индивидуального развития организм закономерно меняет свои характеристики. Особенно интенсивные изменения происходят в эмбриональном периоде онтогенеза, когда из зиготы формируются структуры многоклеточного организма. При этом все многообразие клеток, выполняющих в



организме различные функции, происходит из одной клетки путем митотического деления. Поскольку в результате митоза дочерние клетки получают полноценную наследственную информацию, заключенную в кариотипе, все клетки организма в генотипическом отношении равноценны. Некоторые различия, однако, наблюдаются из-за наличия цитоплазматических генов, например митохондриальных, которые распределяются при делении не строго равномерно.

Чем определяются морфологические, физиологические и биохимические различия, появляющиеся между клетками в ходе развития?

1. В процессе овогенеза в цитоплазме яйцеклетки накапливаются не только богатые энергией вещества, обеспечивающие развитие зародыша, но и мРНК для синтеза белков, необходимых на самых ранних стадиях эмбрионального развития. Распределение этих веществ в цитоплазме яйцеклетки оказывается неравномерным. Проникновение сперматозоида в яйцеклетку вызывает перераспределение отдельных компонентов в объеме клетки, из-за чего уже при первых делениях зиготы в дочерних клетках оказывается цитоплазма с разным составом веществ.

2. Взаимодействие между компонентами цитоплазмы и ядром приводит к *дерепрессии* определенных генов. Их продукты определяют дальнейшее углубление различий между разными частями зародыша, т. е. дифференцировку. Возникающие различия порождают новые взаимодействия между соседними клеточными группами, которые вызывают дерепрессию новых генов, вследствие чего меняется спектр активных генов и, следовательно, генетическая программа на последующий отрезок процесса развития. Таким образом, в ходе индивидуального развития первоначально репрессированный геном зиготы подвергается постепенной дерепрессии, причем в разных частях зародыша дерепрессируются разные группы генов. Набор активно функционирующих генов определяет своеобразие спектра белков, которые синтезируются клетками, выполняющими различные функции.

3. Как отмечалось ранее, в процессе онтогенеза в клетках организма происходит смена активно функционирующих генов. Гены, транскрибировавшиеся в эмбриональном периоде, к моменту рождения или непосредственно после него репрессируются, в то же время активируются гены, определяющие специфические функции клеток во взрослом организме.

Нередко вещества, *продуцируемые определенным типом клеток в разные периоды онтогенеза*, несколько различаются по своим свойствам. Изменение свойств диктуется *изменением условий существования организма*, например, в эмбриональном и постэмбриональном периодах развития. Эти различия объясняются сменой функционирования близких, но не идентичных по заключенной в них информации генов. Такие гены в ряде случаев образуют группы, получившие название «*мультигенное семейство*». Примером служат гены гемоглобина.

*Мультигенное семейство* — это группа генов, очень близких по нуклеотидным последовательностям, со сходными фенотипическими функциями. Число генов в разных семействах у представителей разных видов варьирует от единиц до нескольких сотен. К примеру, число генов гистонов у разных видов в отдельных семействах колеблется от 10 до 1200, генов тРНК — от 6 до 400, генов 5S-рНК — от 200 до 24 000, генов  $\alpha$ -глобинов — от 1 до 5,  $\beta$ -глобинов — от 2 до 7. К числу белков, кодируемых мультигенными семействами, кроме отмеченных относятся актины и тубулины, играющие важную роль в подвижности клеток, коллагены соединительной ткани, некоторые белки клеточных мембран и сыворотки крови.

Варианты организации мультигенных семейств создают необходимые условия для эффективной регуляции экспрессии соответствующих генов.

Если продукт определенного гена необходим лишь на небольшом отрезке времени в онтогенезе, но в значительных количествах, мультигенное семейство образовано большим числом идентичных генных копий, обычно соединенных тандемно. Примером могут служить гены рРНК, которые в геноме

соматических клеток взрослой шпорцевой лягушки представлены 450 копиями. Вместе с тем в овогенезе для быстрого образования необходимого количества рибосом, которых в яйце *Xenopus* содержится около  $10^{12}$ , гены рРНК амплифицируются, и число их копий возрастает в 4000 раз.

В других мультигенных семействах, состоящих, как правило, из неидентичных генов, в ходе онтогенеза происходит переключение с одного гена на другой. Белки, контролируемые определенными генами такого семейства, наилучшим образом соответствуют либо условиям на разных стадиях онтогенеза, либо клеткам различных типов.

В эритроцитах взрослого человека основная форма гемоглобина человека  $HbA_1$  представлена тетрамерами с общей формулой  $\alpha_2\beta_2$  и составляет около 97 % от общего содержания гемоглобина в красных кровяных клетках. Его отличительной чертой является присутствие в составе тетрамеров  $\beta$ -цепей. На долю минорной формы гемоглобина взрослого человека —  $HbA_2$  ( $\alpha_2\delta_2$ ) — приходится 2 %. Характерная для  $HbA_2$   $\delta$ -цепь отличается от  $\beta$ -цепи только десятью аминокислотными остатками. После рождения у всех детей в эритроцитах обнаруживается также небольшое количество фетального гемоглобина  $HbF$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ), доля которого составляет менее 1 %. Данное распределение соответствует экспрессии  $\alpha$ - и  $\beta$ -кластеров, расположенных в 16-й и 11-й хромосомах соответственно. Эволюционные расхождения кластеров  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов привели к возникновению у человека мультисемейства экспрессирующихся генов и множества неэкспрессирующихся псевдогенов. В эмбриональный период синтез  $\zeta$ - и  $\epsilon$ -субъединиц гемоглобина происходит преимущественно в желточном мешке и парааортальной области, а затем в печени. В результате данного процесса синтезируются эмбриональные гемоглобины Gower 1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) и Portland ( $\epsilon_2\gamma_2$ ). В табл. 6.2 показан количественный и качественный состав гемоглобинов, выделенных из красных кровяных клеток эмбрионов человека на разных стадиях эмбрионального развития.

Таблица 6.2

Количественный состав гемоглобина эмбрионов

Длина эмбрионов, мм	Hb Gover 1 ( $\zeta_2\varepsilon_2$ )		Hb Gover 2 ( $\alpha_2\varepsilon_2$ )		Hb Portland ( $\varepsilon_2\gamma_2$ )		Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ )		Hb A <sub>1</sub> ( $\alpha_2\beta_2$ )		Суммарное количество гемоглобина, мг
	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%	
20	0,37	46,3	0,19	23,7	—	—	—	—	0,14	30,0	1,36
40	1,14	14,3	1,46	18,3	0,52	6,5	4,83	60,7	0,28	—	10,0

В фетальный период онтогенеза поочередно репрессируется и иницируется экспрессия генов эмбриональных гемоглобинов. Образование фетальных форм гемоглобина определяется экспрессией генов  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$ , а также двух генов —  $G\gamma$  либо  $A\gamma$   $\gamma$ -цепей. Аминокислотные последовательности  $G\gamma$ - и  $A\gamma$ -цепей идентичны, за исключением 136-го положения, в котором может присутствовать либо аминокислота глицин ( $G\gamma$ ), либо аланин ( $A\gamma$ ). Порядок экспрессии генов эмбриональных, фетальных гемоглобинов и гемоглобинов взрослого человека показан на рис. 6.1.

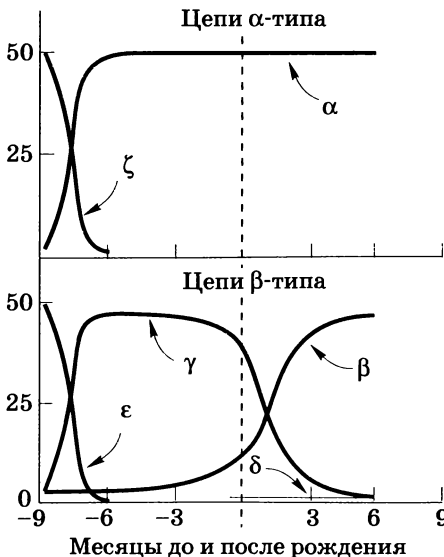


Рис. 6.1. Смена синтеза цепей гемоглобина человека в онтогенезе

Гемоглобин HbF синтезируется в течение последних двух триместров неонатальной жизни и обладает повышенным сродством к кислороду по сравнению с гемоглобином взрослого человека A<sub>1</sub>, поскольку фетальный гемоглобин менее прочно связывается с аллостерическим эффектором 2,3-дифосфоглицератом. После рождения происходит репрессия синтеза фетального гемоглобина и начинают синтезироваться основная форма гемоглобина взрослого человека A<sub>1</sub> и минорная форма A<sub>2</sub>. Однако в некоторых случаях синтез  $\gamma$ -цепей во взрослых эритроидных клетках продолжается, это явление получило название наследственной персистенции фетального гемоглобина.

Кластер  $\alpha$ -глобиновых генов локализован в терминальном участке 16-й хромосомы, в регионе, где отмечается постоянная экспрессия генов вблизи теломеры.  $\beta$ -глобиновый кластер расположен в коротком плече 11-й хромосомы, в участке p15.5, который содержит часто повторяющуюся ДНК, выполняющую роль фазоспецифического энхансера транскрипции. Данные различия подтверждаются тем фактом, что два  $\alpha$ -глобиновых гена экспрессируются на постоянном уровне в эритроидных клетках, начиная с ранних стадий эмбрионального периода и заканчивая синтезом основной формы гемоглобина человека у взрослых. Однако стоит отметить, что расположенный ближе к LCR  $\alpha 2$ -глобиновый ген экспрессируется на более высоком уровне, чем идентичный по структуре  $\alpha 1$ -глобиновый ген. В отличие от  $\alpha$ -глобинового кластера синтез  $\beta$ -подобных глобиновых генов происходит последовательно: сначала экспрессируется  $\epsilon$ -глобиновый ген, затем начинается экспрессия двух генов  $\gamma$ , а в постнатальный период образуются продукты  $\delta$ - и  $\beta$ -глобиновых генов. При этом экспрессия  $\beta$ -глобинового гена намного превышает экспрессию гена  $\delta$ -цепей.

К кластеру  $\alpha$ -глобиновых генов с 5'-конца примыкает так называемый *гиперчувствительный сайт-40* (HS-40), выполняющий роль эритроидспецифического энхансера транскрипции, который состоит из ряда близко расположенных регуля-

торных генов. К кластеру  $\beta$ -глобиновых генов примыкает так называемый *регион контроля локуса (LCR)*, включающий пять ДНК-сайтов, высокочувствительных к расщеплению ДНКазой I. Данный регион контролирует строгую очередность синтеза  $\beta$ -подобных глобиновых цепей и обеспечивает эффективную экспрессию данных генов в каждый конкретный момент онтогенеза.

Гены, входящие в кластеры  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов, обладают сходной генетической структурой. Так, кодирующие последовательности всех  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов включают три экзона, прерывающихся двумя интронами. Более того, каждый глобиновый ген включает собственный промотор. Образующиеся в результате транскрипции молекулы пре-иРНК подвергаются сплайсингу, при этом определенные мутации в промоторах способны влиять на эффективность процесса образования зрелых глобиновых иРНК. В то же время промоторные мутации способны изменять характер экспрессии глобиновых генов в эритроидных клетках, что может служить одной из причин развития талассемии.

Участки, расположенные на 5'-конце каждого из глобиновых генов и называемые проксимальными промоторами, предназначены для связывания белковых комплексов, контролирующих инициацию и транскрипцию мРНК. Данные *cis*-активные регионы, находящиеся в проксимальной части кодирующих генов, включают последовательности АТА, ССААТ и САССС. Отстоящий на 1000 или 2000 пар оснований от 5'-конца генов так называемый дистальный промотор участвует в регуляции активации или «замолкания» глобиновых генов. В свою очередь, к GATA-последовательности ДНК (A/T)GATA(A/G) может присоединяться транскрипционный регуляторный белок GATA-1, находящийся строго в эритроидных клетках. На рис. 6.2 (см. также цветную вклейку между с. 96–97) отражена упрощенная схема регулирования экспрессии  $\beta$ -глобиновых генов, происходящая в эритроидных клетках.

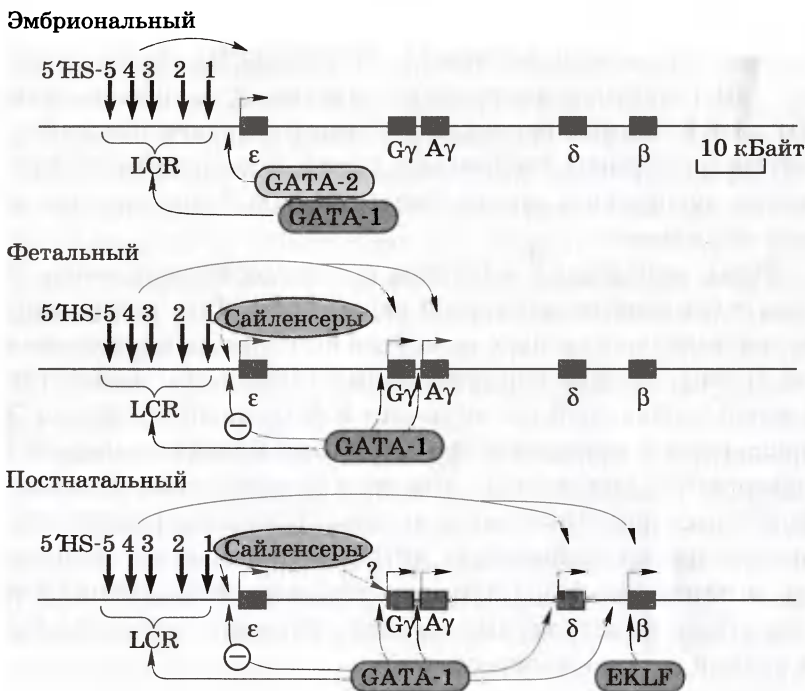


Рис. 6.2. Упрощенная схема регуляции экспрессии β-глобиновых генов

Другой транскрипционный регуляторный белок — trans-активный фактор EKLF — позволяет регулировать положительную экспрессию β-глобиновых генов, однако способен влиять и на другие эритроидные гены. Существуют и другие транскрипционные факторы или комплексы: NF-E2, BP-1, SSP, FOG, FKLF, DRED и PYR, однако до настоящего времени не существует общепринятой схемы, отражающей данные многообразные ген-белковые взаимоотношения.

Итак, наиболее хорошо изучены мультигенные семейства α- и β-глобиновых генов. У человека они представлены кластером из семи β-глобиновых генов, расположенных в 11-й хромосоме, и кластером из пяти α-глобиновых генов, локализующихся в 16-й хромосоме. У эмбрионов человека активно функционируют ζ-глобиновый ген из α-семейства и ε-глобиновый ген из β-семейства, обеспечивающие образование

эмбрионального  $\zeta_2\varepsilon_2$ -гемоглобина. На более поздних стадиях онтогенеза у плода эти гены репрессируются, но дерепрессируются другие гены семейств, определяющие синтез фетального  $\alpha_2\gamma_2$ -гемоглобина. После рождения начинают экспрессироваться  $\delta$ - и  $\beta$ -глобиновые гены, обеспечивающие образование преобладающего  $\alpha_2\beta_2$ - и минорного  $\alpha_2\delta_2$ -видов гемоглобина взрослого человека. (В обоих кластерах имеются также неэкспрессирующиеся псевдогены  $\psi\alpha_1$ ,  $\psi\xi_1$ ,  $\psi\beta_1$ ,  $\psi\beta_2$ .)

Смена типов синтезируемого гемоглобина у эмбриона, плода и после рождения связана с конкретными условиями существования организма на разных стадиях онтогенеза. Так, у человека гемоглобин плода имеет более высокое сродство к кислороду, чем гемоглобин взрослого, что облегчает перенос кислорода через плаценту.

Таким образом, изменение характеристик фенотипа организма на разных стадиях онтогенеза является *результатом регуляции экспрессии генов*, целью которой в одних случаях является наращивание продукции определенных белков, а в других — переход от синтеза одного белка к синтезу белка, более соответствующего изменяющимся условиям существования.

Наличие некоторого количества наследственного материала в цитоплазме в виде кольцевых молекул ДНК митохондрий и пластид, а также других внеядерных генетических элементов дает основание подробнее рассмотреть их участие в формировании фенотипа в процессе индивидуального развития. Цитоплазматические гены не подчиняются менделевским закономерностям наследования, которые определяются поведением хромосом при митозе, мейозе и оплодотворении. Из-за того, что организм, образуемый вследствие оплодотворения, получает цитоплазматические структуры главным образом с яйцеклеткой, цитоплазматическое наследование признаков осуществляется по материнской линии. Такой тип наследования был впервые описан в 1908 г. К. Корренсом в отношении признака пестрых листьев у некоторых растений. Примером цитоплазматического наследования признаков могут служить некоторые патологические состояния, описанные у человека, причиной которых является первичный дефект митохондриальной ДНК (мтДНК).



## 6.6. Некоторые концепции индивидуального развития

Биология развития изучает способы генетического контроля индивидуального развития и особенности реализации генетической программы в фенотип в зависимости от условий. Под условиями понимают различные внутриуровневые и межуровневые процессы и взаимодействия: внутриклеточные, межклеточные, тканевые, внутриорганные, организменные, популяционные, экологические.

### 6.6.1. Деление клеток

Благодаря делению из зиготы, которая соответствует одноклеточной стадии развития, возникает многоклеточный организм. Пролиферация клеток, происходящая после стадии дробления, обеспечивает рост организма. Избирательному размножению клеток принадлежит заметная роль в обеспечении морфогенетических процессов.

В постнатальном периоде индивидуального развития благодаря клеточному делению осуществляется обновление многих тканей в процессе жизнедеятельности организма, а также восстановление утраченных органов, заживление ран.

Зигота, бластомеры и все соматические клетки организма, за исключением половых клеток, в периоде созревания гаметогенеза делятся митозом. Клеточное деление как таковое является одной из фаз клеточного цикла. От продолжительности интерфазы ( $G_1 + S + G_2$ -периоды) зависит частота последовательных делений в ряду клеточных поколений. Интерфаза имеет разную продолжительность в зависимости от стадии развития зародыша, локализации и функции клеток.

В настоящее время известен ряд веществ, которые побуждают клетки к делению, например *фитогемагглютинин*, некоторые гормоны, а также комплекс веществ, выделяющихся при повреждении тканей. Открыты также тканеспецифичные *ингибиторы* клеточного деления — *кейлоны*. Их действие заключается в подавлении или замедлении скорости деления клеток в тех тканях, которые их вырабатывают. Например,

эпидермальные кейлоны действуют только на эпидермис. Будучи тканеспецифичными, кейлоны лишены видовой специфичности. Так, эпидермальный кейлон трески действует и на эпидермис млекопитающего.

Таким образом, деление клеток является чрезвычайно важным процессом в онтогенетическом развитии. Оно протекает с разной интенсивностью в разное время и в разных местах, носит клональный характер и подвержено генетическому контролю. Все это характеризует клеточное деление как сложнейшую функцию целостного организма, подчиняющегося регулирующим влияниям на различных уровнях: генетическом, тканевом, онтогенетическом.

### 6.6.2. Миграция клеток

Клеточные перемещения наряду с другими клеточными процессами имеют очень большое значение, начиная с процесса гастрюляции и далее в процессах морфогенеза. Клетки мезенхимного типа мигрируют одиночно и группами, а клетки эпителиев обычно согласованно, пластом. Мезенхима — это скопление веретеновидных или звездчатых клеток, погруженных в межклеточный матрикс. Эпителий — группы клеток, плотно прилежащих друг к другу боковыми стенками и имеющих апикальную и базальную поверхности. Как мезенхима, так и эпителии могут быть образованы из любого из трех зародышевых листков. Клетки мезенхимного типа наиболее подвижны, так как не образуют между собой стойких контактов.

Существуют гипотезы о *дистантных* воздействиях на клетки на основе хемотаксиса и о *контактных* воздействиях. Мезенхимные клетки способны к амебоидным движениям. Движение их по типу хемотаксиса показано для некоторых видов специализированных клеток (гоноциты, сперматозоиды, некоторые клетки крови). Для эмбриональных клеток многоклеточных животных достоверных случаев хемотаксиса не обнаружено. Контактные взаимодействия более распространены. Важным для перемещения клеток в эмбриогенезе является фибронектин. Таким образом, несомненно, что для миграции клеток очень важны их способность к амебоидному движению

и свойства клеточных мембран. И то и другое генетически детерминировано, так что и сама миграция клеток находится под генетическим контролем, с одной стороны, и влияниями окружающих клеток и тканей — с другой.

### 6.6.3. Сортировка клеток

В процессе эмбриогенеза клетки не только активно перемещаются, но и «узнают» друг друга, т.е. образуют скопления и пласты только с определенными клетками. Значительные координированные перемещения клеток характерны для периода гастрюляции. Смысл этих перемещений заключается в образовании обособленных друг от друга зародышевых листков с совершенно определенным взаимным расположением. Клетки как бы сортируются в зависимости от свойств, т. е. избирательно.

Замечено, что необходимыми условиями сортировки являются степень подвижности клеток и особенности их мембран. В поздней бластуле амфибий, например, клетки будущей эктодермы обладают тенденцией слипаться друг с другом и распространяться в виде сплошного слоя над мезодермой и энтодермой. Эта тенденция проявляется и в культуре тканей. Клетки мезодермы имеют тенденцию впячиваться в любой находящийся поблизости комок клеток, а клетки энтодермы относительно неподвижны.

Существует ряд гипотез, объясняющих избирательную сортировку клеток. Возможно, контакты между подобными клетками сильнее, чем между чужеродными, из-за различий в поверхностном заряде их мембран. Обнаружено, что поверхностный заряд клеток мезодермы ниже, чем заряд клеток экто- или энтодермы, благодаря чему клетки мезодермы легче деформируются и втягиваются в бластопор в начале гастрюляции. По другой гипотезе, контактные взаимодействия между одинаковыми клетками основываются на антигенных свойствах их мембран. Большое значение имеют молекулы адгезии — *селектины*, *кадгерины* и др. Известно не менее пяти типов мембранных белков, участвующих в контактах клеток с внеклеточным матриксом и другими клетками: интегрины, селектины, кадгерины, муцины и иммуноглобулины (табл. 6.3).

Таблица 6.3

## Интегрины [8]

Тип	Представители	Функция
Интегрины. Структурные белки адгезии	18 типов $\alpha$ -интегринов и 8 типов $\beta$ -интегринов	Обеспечение двусторонней связи клеток с внеклеточным матриксом. Контролируют клеточную адгезию, форму клеток, их поляриность, рост, дифференцировку и подвижность
	Талин-1, белок цитоскелета, локализующийся в местах контактов клетки с субстратом или другой клеткой	Участвует в сборке актиновых нитей. Взаимодействие интегрин с талином увеличивает сродство интегрин к внеклеточному лиганду. Взаимодействие усиливается фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатом
	Винкулин	Подавление подвижности клеток, снижение сродства интегринов к талину. Модулятором активности винкулина служит фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат
	Актинины 1-4	Связывание интегринов с актином и образование поперечных сшивок нитей актина. Модулятором активности служит фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат
	Тензины 1-2	Стимуляция клеточной миграции и участие в фибрилlogenезе путем превращения растворимого фибронектина в фибриллярный матрикс. Комплексы точечной адгезии выполняют функцию якоря для фибронектина и актина. Перемещение интегринов и натяжение фибронектина осуществляются за счет сокращения актомиозинового комплекса
	Кавеолины 1-3	Интегральные мембранные связывающие холестерол белки, участвующие в проведении сигналов (через тирозинкиназную, ГТФазную активности)

Продолжение табл. 6.3

Тип	Представители	Функция
Интегрины. Структурные белки адгезии	<p>Паксиллин</p> <p>Тирозинкиназа точечной адгезии ФАК</p>	<p>Непосредственно связывается с <math>\alpha</math>-интегринами и при фосфорилировании активируется</p> <p>Фосфорилируется и активируется под действием лигандов интегринов. Участие в проведении сигнала за счет фосфорилирования белков и функционирования в качестве адаптора</p>
Кадгеринины (классические кадгеринины, десмосомальные кадгеринины, протокадгеринины, кадгеринины группы Flamingo, рецепторная протеинкиназа RET)	<p>Интегральные белки плазматической мембраны, важнейший фактор межклеточной адгезии. Сигнал о взаимодействии кадгерининов двух клеток передается внутрь каждой из них (в форме осцилляций <math>Ca^{2+}</math>, изменяя активности различных протеинкиназ или других посредников) и трансформируется в изменения обменных процессов. В свою очередь, изменения в характере метаболизма в соседних клетках могут через кадгеринины отражаться на прочности межклеточных контактов</p> <p>15 классических кадгерининов: эпителиальный (E), нейрональный (N), плацентарный (P), сосудисто-эндотелиальный (VE) и др.</p> <p><math>\alpha</math>-Катенин</p> <p><math>\delta</math>-Катенин (p120-катенин)</p>	<p>Содержат места связывания цитоплазматических белков катенинов, которые служат мостиками между кадгерининами и актиновыми нитями цитоскелета. Непосредственно с кадгерининами взаимодействует <math>\beta</math>-катенин, который связан с актином через <math>\alpha</math>-катенин</p> <p>Посредник взаимодействия кадгерининов с актиновым цитоскелетом</p> <p>Взаимодействие с примембранной областью внутриклеточного домена кадгерининов, регуляторное воздействие на межклеточную адгезию</p>

Окончание табл. 6.3

Тип	Представители	Функция
Кадгерины (классические кадгерины, десмосомальные кадгерины, протокадгеринины, кадгеринины группы Flamingo, рецепторная протеинкиназа RET)	$\beta$ -Катенин	Компонент клеточной адгезии, контролируемый паракринными сигнальными молекулами, и коактиватор транскрипционных факторов в ядре клетки. Активирующие мутации $\beta$ -катенина являются наиболее частой причиной инициации рака толстой кишки
	Протокадгерин CNR	Обнаружен в точках роста аксонов, в активных зонах пре- и постсинаптической мембраны. Необходим для повышения эффективности синаптической передачи сигналов и долговременной памяти
	Кадгерины Flamingo, протокадгеринины FAT	Участвуют в механизмах поляризации клеток

Таким образом, сортировка клеток и их избирательная адгезия наряду с другими клеточными процессами играет важную роль в морфогенезе развивающегося зародыша и одновременно подвержена многоуровневому регуляторному воздействию (генетическим, межклеточным, онтогенетическим), отражая целостность организма как системы.

#### 6.6.4. Гибель клеток

В развитии зародышей наряду с размножением клеток важную роль играют *процессы гибели клеток*. В настоящее время выделяют два принципиально различных типа клеточной гибели: апоптоз и некроз.

*Апоптоз* описан для многих клеток и малых организмов типа нематоды *C. elegans*, является эволюционно консервативным механизмом гибели клеток. Механизмы апоптоза [20] включают комплекс структурных и биохимических изменений: рецепторы гибели клетки, аспартат-специфичные цистеиновые протеиназы (каспазы), митохондрии, семейство белковых фак-

торов Bcl-2, семейство белков-ингибиторов апоптоза (IAP), ряд биорегуляторов. Апоптоз реализуется двумя путями:

- Внешний путь запускается через рецепторы гибели клеток (действие фактора некроза опухолей — TNF, фактора роста нервов — NGF, индуцирующего гибель сигнального комплекса — DISC и др.), расположенные на поверхности клеток, что ведет к формированию прокаспазы-8 → каспазы-8 → активации эффекторных каспаз-3, 6, 7 → расщеплению макромолекул и фрагментации ядер.

- Внутренний путь регулируется митохондриями и включается токсическими повреждениями генома, гипоксией, свободными радикалами, нарушениями регуляции ростовыми факторами, что ведет к освобождению факторов, индуцирующих апоптоз (цитохрома *c*, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, апоптозиндуцирующего фактора — AIF), к формированию комплекса «апоптосома» → прокаспазы-9 → каспазы-9 → активации эффекторных каспаз-3, 6, 7 → расщеплению макромолекул и фрагментации ядер.

Итак, оба пути включают активацию *эффекторных каспаз*, обеспечивающих гидролитическое расщепление ряда макромолекул и проявление морфологических признаков апоптоза.

Белковые факторы Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> ингибируют апоптоз, предотвращая освобождение стимуляторов апоптоза из митохондрий. Активацию эффекторных каспаз предотвращают белки семейства IAP и сурвивин. Для снятия их действия существуют «ингибиторы ингибиторов» Smac/DIABLO, HtrA2/Omi.

Апоптоз широко распространен и типичен для физиологических условий. Наряду с описанными ранее делением, сортировкой и миграцией клеток он способствует достижению характерных для определенного биологического вида черт его морфофункциональной организации.

*Некроз* — незапрограммированная гибель клеток, тканей или органов в живом организме. Гибель клеток наступает, когда ее защитные механизмы (микросомальное окисление, репаративный синтез ДНК, антиоксидантная система и пр.) не справляются с повреждениями макромолекул и биорегуляторов. Некроз вызывают механические повреждения, инфекции,

опухоли, ишемия, воспаление, окислительный стресс, радиационное воздействие. Некроз клеток возникает *в нефизиологических условиях*, например в результате действия неблагоприятных факторов, таких как стойкое кислородное голодание, разного рода токсины и др.

Наиболее яркие примеры разрушения клеток и органов относятся к постэмбриональным стадиям метаморфоза земноводных и насекомых. У головастиков резорбируются (рассасываются) хвост, кишечник и жаберные крышки, у личинок насекомых разрушается большинство внутренних органов. В ходе эмбрионального развития высших позвоночных и человека также наблюдаются процессы дегенерации органов, которые вначале закладываются, а затем исчезают. У особей женского пола дегенерируют вольфовы протоки, у особей мужского пола — мюллеровы протоки, что является, по-видимому, результатом влияния половых гормонов. У эмбриона человека вначале закладываются ребра у 7-го шейного позвонка и 9–10-го хвостовых позвонков, затем они обычно исчезают, так что шейные позвонки, как правило, ребер не несут и в копчике остается 4–5 позвонков.

Примером генетического контроля апоптоза является открытие гена *p53*. Белок, контролируемый этим геном, обладает способностью при определенных условиях блокировать клеточное деление и запускать механизм апоптоза. Мутационные изменения и дефектность функции этого гена или регулирующих его активность нуклеотидных последовательностей ДНК встречаются в опухолевых клетках и обнаружены, по данным разных исследователей, у 55–70 % раковых больных.

Таким образом, очевидно, что избирательная гибель клеток не менее важна для морфогенеза, чем другие клеточные процессы. Гибель клеток имеет три уровня регуляции: генетический контроль, межклеточные взаимодействия и организменный уровень.

### 6.6.5. Дифференциальная экспрессия генов

Дифференциальная экспрессия генов считается основным механизмом дифференцировки клеток. Сохранение полного хромосомного набора развивающегося организма обеспечи-



вается прежде всего механизмом митоза (возможные случаи соматических мутаций, возникающих как исключение, во внимание не принимаются). Цитофотометрическим способом установлено, что количество ДНК в них не уменьшается, а методом молекулярной гибридизации показано, что клетки разных тканей идентичны по нуклеотидным последовательностям. На этом основании цитогенетический метод применяют для диагностики хромосомных и геномных болезней человека (хотя ошибки методов достигают 5–10 %), а метод гибридизации ДНК — для идентификации личности и установления степени родства.

мРНК необходимы для обеспечения жизнедеятельности клеток и детерминируются генами «домашнего хозяйства», представленными в геноме в виде нескольких нуклеотидных последовательностей со средней частотой повторяемости. При изучении разнообразия мРНК в почках, печени и головном мозге мышей, в яйцеводах и печени кур были обнаружены около 12000 различных мРНК. Лишь 10–15 % из них были специфичны для какой-либо одной ткани. Они считаются с уникальных нуклеотидных последовательностей тех структурных генов, действие которых специфично в данном месте в данный момент и которые называются «генами роскоши». Таких генов, ответственных за дифференцировку клеток, примерно 1000–2000.

В ряде случаев окончательная дифференцировка связана с «достройкой» молекул ферментов или гормонов или четвертичной структуры белка. Это уже посттрансляционные события. Например, фермент тирозиназа появляется у зародышей амфибий еще в раннем эмбриогенезе, но переходит в активную форму лишь после их вылупления.

По мнению Б.М. Ханжина (2004), дифференциальная репрессия (и экспрессия) — это ауторегуляторные процессы на молекулярном, клеточном и организменном уровнях [11]. Как было установлено, определенного вида матричные (информационные) мРНК локализуются в определенных отделах перинуклеарной цитоплазмы. А не случайное распределение ядерных пор по поверхности ядра соответствует расположе-

нию разрыхленных (транскрибируемых) и компактных (молчащих) доменов генома. Другими словами, начальная схема построения многоклеточного организма как бы заложена в морфологии оболочки ядра и цитоплазме оплодотворенной яйцеклетки, а не только записана в генетическом аппарате ядра. При этом ни ядро, ни такие органеллы, как эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы, митохондрии, пероксисомы, не могут быть созданы абсолютно заново без наличия хотя бы фрагментов этих структур. Данные органеллы перед клеточным делением распадаются на фрагменты и затем собираются заново из этих фрагментов [22].

Однажды начав определенную дифференцировку, клетки продолжают двигаться в этом направлении, даже если индуцирующий дифференцировку фактор уже исчез. Показано, в частности, что после 11 суток культивирования клеток CFU-E в присутствии эритропоэтина дальнейшая эритроидная дифференцировка становится независимой от этого вещества. Фенотип взрослых (мышей) зависит от эпигенетических событий в ранних эмбрионах, например определенное ядерно-цитоплазматическое взаимодействие в ранних эмбрионах может программировать дальнейшее функционирование генома.

У млекопитающих обнаружено наличие позиционных сигналов, градиент которых определяет у зародыша детерминацию головного и хвостового сегментов и формирование тела вдоль переднезадней оси. Переднезадняя полярность эмбрионов (дрозофилы) инициируется во время онтогенеза через дифференциальную локализацию материнской РНК. Показано, что конечная дифференциальная экспрессия гомеотических генов вдоль переднезадней оси развивающегося зародыша определяет положение и идентичность различных структур тела.

Формирование органов зародыша определяется распределением (градиентом) морфогенетических факторов (специфических мРНК) в яйце, что, в свою очередь, устанавливается распределением транскрипционных факторов, которые представляют собой продукты транскрипции гомеотических

генов. Консервативными элементами гомеотических генов являются *гомеодомены* (*гомеобоксы*), имеющие высокий уровень гомологии у разных видов. Открытие гомеобоксов ознаменовало начало новой эры в биологии развития. В результате был идентифицирован целый класс специфических контролирующих генов, детерминирующих план построения тела. Одинаковые по сути механизмы могут задавать пространственную разметку в таких разных системах, как целое туловище зародыша курицы, зачатки его конечности или даже отдельное перо. Продукты гомеобоксных генов являются транскрипционными регуляторами. Все они содержат консервативную последовательность из 60 аминокислот — гомеодомен, с помощью которого способны связываться со специфическими участками ДНК в регуляторных областях других генов и влиять на их транскрипционную активность. Гомеодоменсодержащие белки — это факторы транскрипции, которые имеют общий ДНК-связывающий домен (гомеодомен). Эти белки играют важную роль в регуляции развития. В настоящее время идентифицировано более 300 гомеобоксных генов, которые подразделяются примерно на 30 классов на основании характерных консенсусных последовательностей гомеодоменов. Гомеобоксные гены (например, *QUOX-8* перепела), в свою очередь, регулируются дорсовентральной полярностью и взаимодействием тканей.

Гомеозисные гены мыши, человека и других позвоночных расположены на хромосоме в том же порядке, что и комплекс гомеозисных генов у мухи. Паттерн переднезадней экспрессии индивидуальных генов этого комплекса одинаков у мухи и позвоночных. Итак, каждое животное имеет сходные гены, одинаково расположенные на хромосоме и используемые для спецификации одних и тех же относительных областей вдоль переднезадней оси. Как было сказано, существуют не только гомологичные гены, но и гомологичные пути проведения сигналов у таких разных организмов, как мухи, лягушки и дрожжи. Те же самые белки, которые необходимы для развития ноги насекомого, участвуют и в образовании конечности позвоночного [11].

Итак, описываются два возможных и самых простых способа, с помощью которых клетки могут занимать свое относительное положение в раннем эмбрионе. Во-первых, позиционный сигнал передается матерью путем закладки в яйце морфогенетических детерминант. Другая возможность реализуется с помощью межклеточных взаимодействий. Приведем несколько примеров дифференциальной экспрессии генов под влиянием межклеточных взаимодействий. Например, внеклеточные сигналы регулируют факторы транскрипции в печени при дифференцировке печеночных клеток. При этом различные комбинации внешних факторов, создающих дифференцирующие условия, по-разному влияют на экспрессию индивидуальных печеночноспецифических факторов транскрипции. Ответы исследуемых генов фибробластов кожи на фактор роста эпидермиса зависят от плотности фибробластов в монослое и, следовательно, регулируются межклеточными контактами фибробластов с матриксом. Внеклеточный матрикс координированно модулирует факторы транскрипции в печени и морфологию гепатоцитов. Тканево-специфическая экспрессия генов носит сложноспецифический характер. Например, в сердечной мышце экспрессируется ген легкой цепи-2 сердечного миозина, который неактивен в клетках скелетных мышц. Причем в скелетных мышцах синтезируются ядерные факторы, которые не синтезируются в сердечной мышце и которые, связываясь с определенным участком в генетическом аппарате клеток сердечной мышцы, экспрессируют ген легкой цепи-2 сердечного миозина.

Процесс отмирания провизорных органов в онтогенезе может выглядеть следующим образом: в любом месте зародыша существует мозаика концентраций веществ, вырабатываемых окружающими клетками или тканями. В определенных местах зародыша создается такая мозаика концентраций градиентов веществ, которая включает гены апоптоза, и ткань или орган в данном месте отмирает. Но остаются условия для включения апоптозных генов в клетках, которые имеют отклонения от нормы, существующей в данном месте. Изучение мо-

лекулярных механизмов, обуславливающих такие клеточные программы, как пролиферация, дифференцировка и апоптоз, показывает, что за переход от одной программы к другой отвечает аппарат управления клеточным циклом на основе регуляции экспрессии специфических генов на уровне транскрипции. Такие группы функционально взаимосвязанных генов образуют так называемые генные сети, характеризующиеся многочисленными обратными связями и сложной динамикой поведения.

Дифференцировка и созревание ткани сопровождаются существенным снижением разнообразия генетической информации, экспрессирующейся в этой ткани, как происходит, например, при созревании мозжечка (у крыс). Другими словами, обобщая, можно сказать, что на фоне постоянно идущей репрессии генома (вследствие многоповторяемости генов гистонов и вызванного этим преимущественного синтеза белков-гистонов) дифференциальная экспрессия генов в онтогенезе — это результат действия и взаимодействия топологии, химии, биохимии, механики и колебательных процессов взаимосвязанных (взаимозависимых) биохимических реакций и структур. Используя понятие (принцип) модуляции в биологических (как и в технических) системах, онтогенез можно представить как процесс, где общий, постоянно идущий процесс репрессии генома все время модулируется процессами взаимодействия между элементами организма (между молекулами в клетке, между клетками, между тканями организма и между организмами в окружающей среде).

### 6.6.6. Генетический контроль развития

Очевидно, что *генетический контроль развития* существует, ибо как тогда понять, почему из яйца крокодила развивается крокодил, а из яйца курицы — курица? Каким образом гены определяют процесс развития? Это центральный и очень сложный вопрос, но для всеобъемлющего и убедительного ответа на него данных явно недостаточно.

Анализ генетического контроля затрудняется несколькими моментами. Прежде всего тем, что роль генов неодинакова.

Часть генома состоит из генов, определяющих так называемые жизненно важные функции и отвечающих, например, за синтез тРНК или ДНК-полимеразы, без которых невозможно функционирование ни одной клетки. Эти гены названы *house keeping*, или генами «домашнего хозяйства». Другая часть генов непосредственно участвует в детерминации, дифференцировке и морфогенезе, т. е. функция их, по-видимому, более специфическая, ключевая. Для анализа генетического контроля необходимо, кроме того, знать место первичного действия данного гена.

## 6.7. Стволовые клетки и ранний эмбриогенез

Для тех, кто хотел бы понять молекулярные механизмы раннего онтогенеза, возможно, окажется полезным знакомство со стволовыми клетками [7].

### 6.7.1. Фенотип эмбриональных стволовых клеток

В отличие от специализированных клеток эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) сохраняют уникальную потенцию наборами мРНК «ранних» генов эмбриогенеза. Редактируя мРНК, ЭСК обходятся без многих блоков трансигнализации, которые используются дифференцированными клетками. ЭСК для контакта с микроокружением используют минимальное число рецепторов, сигнальных белков, транскриптаз хроматина. Между тем наборы *housekeeping* — генов, обслуживающих потоки энергии, веществ, метаболизм экспрессированы на уровне дифференцированных клеток.

Второй важнейшей характеристикой незрелых ЭСК в культуре является высокий потенциал пролиферации. На поверхности пролиферирующих ЭСК экспонирован уникальный общий рецептор для LIF, SCF, IL-6. Эта тройка сигналов через трансмембранную субъединицу GP-130 и, соответственно, Jak-Stat-3 транскрипционный комплекс процессирует сигналы в ядро, стимулируя вхождение G<sub>0</sub>-клеток в митоз.

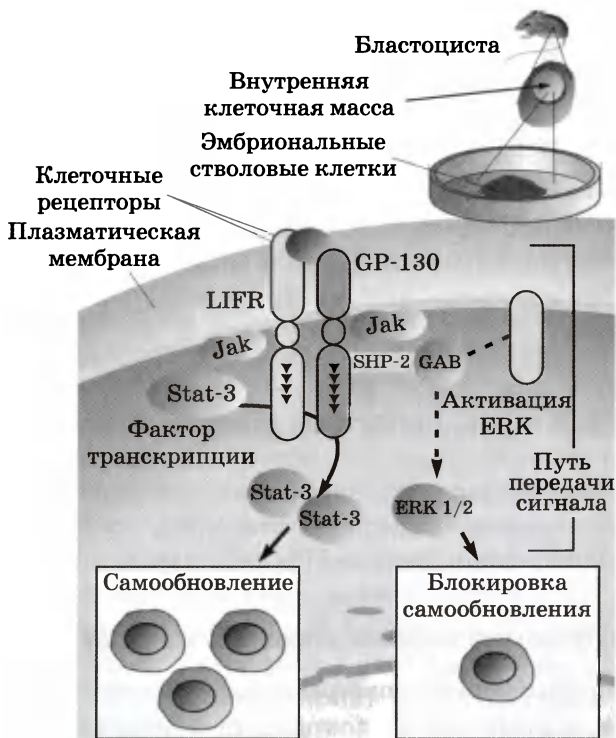


Рис. 6.3. Система сигнализации LIF-рецептора в клеточное ядро

Схема событий между рецептором с ядром выглядит следующим образом (рис. 6.3, см. также цветную вклейку между с. 96–97):

- Высокоаффинное селективное связывание LIF, SCF, IL-6 с внешним рецептором активирует латентный фактор транскрипции Stat-3.
- Домен Stat-3-SIE DNA binding специфически взаимодействует с промотором *c-fos* на уровне ДНК хроматина.
- Активированный Stat-3 в комплексе с фактором тотипотентности Oct-4 запускает митозы и самообновление клонов ЭСК.
- Интенсивное самообновление ЭСК в культуре сопряжено с активацией тирозинфосфатазы SHP-2. Этот регулятор-

ный фермент дефосфорилирует фосфотирозины разных белков (включая цитоплазматический сигнальный домен GP-130).

• Удаление фосфорных групп с тирозинов вызывает стойкую активацию проводящей субъединицы GP-130. Активация GP-130 стимулирует следующую киназу ERK (extracellular regulated kinase). SHP-2-зависимая активация ERK необходима в качестве кофактора для устойчивого самообновления ЭСК *in vitro*.

Сохранение *тотипотентности* пролиферирующих мышинных линий ЭСК связано с присутствием в этих клетках дополнительного регуляторного белка Gab-1 — кофактора экспрессии *главного белка тотипотентности Oct4*. Похоже, что белок Oct4 выполняет разные функции в ранних зародышах млекопитающих. Избыток Oct4 в эмбриобласте и ЭСК блокирует развитие клеток трофобласта, поддерживая тотипотентность пролиферирующих незрелых клеток. С началом органогенеза Oct4 контролирует начало рестрикционного созревания многих клеточных линий. Oct4 необратимо исчезает в созревающих клетках. В неактивном виде Oct4 выявлен в зрелых ооцитах, зиготе и эпибласте. В фетусе Oct4 выявляется в половом бугорке и примордиальных половых клетках. Если в ЭСК увеличить экспрессию Oct4, клетки спонтанно дифференцируются в энтодерму и мезодерму. Оказалось, что Oct4 активирует одни гены в зародышевых тканях, ингибируя другие.

Бластоцисты мыши без возможности синтеза белка Oct4 (нет гена в гомозиготе Oct4-/-) останавливаются в развитии после имплантации. Такие аномальные зародыши преимущественно содержат клетки трофобласта, тогда как клетки эмбриобласта гибнут. Однако клетки трофобласта также вяло пролиферируют, поскольку в зародышах отсутствует FGF4 (индуктором экспрессии гена FGF4 является Oct4).

Все зародыши-гетерозиготы Oct4-/+ проходят фазу имплантации без аномалий, поскольку 30–50 % уровня Oct4 в эмбриобласте достаточно для его превращения в эпибласт и первичную полосу. Уровень Oct4 не влиял существенно на



постимплантационную гибель зародышей. Особую роль рецептор LIF/GP-130 играет в задержке развития бластоцист у мышей и других грызунов на стадии диапаузы. Такие «законсервированные» на 3–4 недели бластоцисты, переживающие в полости матки, содержат зрелые клетки эпибласта вместо эмбриобласта. У зародышей с поврежденным GP-130 блокировано созревание эпибласта в диапаузных бластоцистах.

Jak-Stat-3-«кабель» трансигнализации используется региональными гематогенными, мышечными стволовыми клетками для самообновления клеток клонов. LIF-рецептор ЭСК существенно влияет на выживание прогениторных клеток в культуре. М. Ревел из Вайсмановского института (Израиль) показал, что прогениторные клетки в гематогенных клонах теряют способность формировать димерный вариант рецептора, который способен связывать IL-6. Такие клетки немедленно элиминируются из клона апоптозом. Если стволовые клетки трансфицировать генетической конструкцией, содержащей ген лиганда IL-6 и ген GP-130 рецептора, то трансфицированным клоном возвращается потенция к неограниченному самообновления с минимальным апоптозом. Такие клоны долгосрочно обновлялись *in vitro* и *in vivo*.

На следующем этапе прогениторные клетки пролиферируют под контролем спаренных рецепторов Delta/Notch в комплексе с фактором *томопотентности* — продукта семейства генов *Hes*. В клонах стволовых клеток ЦНС экспрессирована пара *Hes1*, *Hes5*, тогда как один *Hes5* экспрессирован в клетках-предшественницах олигодендроцитов.

«Минимальный фенотип» ЭСК и примордиальных половых клеток (ППК) проявлялся ошаренной формой клеток из-за отсутствия цитоскелета, белков и рецепторов адгезии на поверхности плазматической мембраны, а также многих кофакторов сигнализации, смонтированных в компоненты цитоскелета. ЭСК и ППК имели высокую активность теломеразы и щелочной фосфатазы. В отличие от региональных стволовых клеток ППК не имели на поверхности бета1-интегрина. ППК вступают в дифференцировку, формируя вторичные агрегаты

клеток в суспензии (эмбриоидные тельца). Бессмертные тотипотентные линии ЭСК были выделены из эмбрионов крыс, коровы, приматов, свиней. Показательно, что все ЭСК имели не только близкое строение, но и практически универсальный набор антигенов-маркеров (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-81, TRA-1-60).

### 6.7.2. Эмбриональные стволовые клетки — модель изучения раннего эмбриогенеза и органогенеза

С помощью ЭСК удалось выяснить, какими были первые гены либо комбинации генов, реализующие трехмерную карту зародыша, а также коды линейного созревания клеток-предшественниц в зрелые функциональные единицы органов (дольки печени, альвеолы легкого, нефроны почек).

Развитие зародышей с выключенной гамма-субъединицей ламинина LAMC1<sup>-/-</sup> останавливается на стадии формирования экстраэмбриональной энтодермы из-за дефекта миграции клеток. Нокаут гена *Brachyury* вызывал раннюю гибель зародышей из-за блока развития мезодермы. Выключение гена *GATA-4* останавливало развитие энтодермы. Вторым производным master-gene энтодермы оказалась транскриптаза *vHNF-1* (variant Hepatocyte Nuclear Factor 1), которая на очередном этапе активировала следующее семейство генов: *HNF-4alpha1*, *HNF-1alpha*, *HNF-3gamma*. Третьим master-gene энтодермы оказался ген *cas* (casanova). Выключение этого гена блокировало развитие всей энтодермы зародышей.

Порядок включения важнейших генов постимплантационного периода существенно не зависит от факторов микроокружения. Зародыши мыши *GATA3*<sup>-/-</sup> погибали на 11–12-й день гестации от блока гематопоза в фетальной печени. Зародыши мыши *SCL*<sup>-/-</sup> погибали на 10-й день от блока желточного кроветворения. Зародыши *Flt*<sup>-/-</sup>, как и зародыши *Flk*<sup>-/-</sup>, погибали вскоре после имплантации из-за дефектов васкулогенеза и капиллярогенеза. Без этих рецепторов ангиобласты подвергались ошибочной сборке. В результате возникали фатальные аномалии в желточном мешке. Если мутация *Flk*<sup>-/-</sup> наиболее

сильно поражала зародыш (где сосредоточено максимальное число этих рецепторов), то мутация *Flt-/-* чаще всего блокировала развитие желточного мешка. Если в нокаут-зародыши своевременно пересаживали нормальные ЭСК, дефект развития устранялся.

Показано, что для любых линий ЭСК *in vitro* характерна синхронная активация 5 факторов транскрипции: *Oct4*, *Oct6*, *Sox-2*, *PEA3* и *REX-1*. С началом вступления незрелых пролиферирующих ЭСК в дифференцировку экспрессия 5 факторов транскрипции более или менее синхронно угасает. Экспрессия *UTF1* находится под синергестическим контролем генов *Oct4/Sox-2*. В свою очередь, активный белковый комплекс транскриптаз *Oct4/Sox-2* активирует третий ген — *FGF4*. По-видимому, комплекс *Oct4/Sox-2* контролирует также экспрессию следующих ранних генов в ЭСК: *osteopontin adhesion molecule* (*Opn*), коактиватор транскрипции *UTF1*, фактор транскрипции *REX-1*. В ряде линий ЭСК этот генетический «конвейер» поддержания плюрипотентности клеток нарушается при пассировании. Экспрессия вышеупомянутых факторов транскрипции существенна для оценки качества ЭСК, поступающих из клеточных банков.

Выключение генов *nodal*, *FGF-5*, *Oct3* останавливало развитие нейроэктодермы и нервной пластинки. Ген *Nkx-2-5*, *CSX* избирательно контролировал закладку кардиогенной мезодермы, *Msx3* — закладку нейральной трубки, *EKLF* — закладку желточного кроветворения.

Техникой нокаута был идентифицирован *SIL*-ген, ответственный за парное симметричное формирование зачатков органов. На мутантных мышях открыто семейство генов *Taube Nuss*, контролирующих уровень апоптоза клеток у зародышей на стадии органогенеза. Эти гены особенно важны для элиминации провизорных клонов и органов.

Расшифрованы функции семейства сигнальных белков *Stat* (*signal transducer and activator of transcription*) в ЭСК мышей. *Stat-1* обеспечивает сигнализацию между рецепторами интерферона и хроматином. Выключение *Stat-1* элимини-

ровало все клоны зародышей, экспонирующие рецепторы для интерферона. Зародыши Stat4<sup>-/-</sup> и Stat6<sup>-/-</sup> развивали летальные дефекты созревания тимоцитов. Зародыши Stat3<sup>-/-</sup> погибали внутриутробно на стадии раннего органогенеза. Зародыши Stat5a<sup>-/-</sup> имели внутриутробные аномалии развития молочной железы. Этим же способом показано, что выключение гена *Hox-1* частично блокирует гематопоэз в зародышах. Выключение генов *Hox-7* и *Hox-8* вызывает аномалии развития миоцитов. После имплантации клетки эмбриобласта дифференцируются в экстраэмбриональную энтодерму и эмбриональную эктодерму.

Если из среды убрать питательные вещества и LIF, пролиферация клонов приостанавливалась. ЭСК формировали агрегаты (*эмбриоидные тельца*). В части агрегатов шла дифференцировка клеток, которая в обратном порядке по отношению к зародышу включала маркерные гены трех зародышевых листков. Наружный слой маркировал экстраэмбриональную энтодерму геном *GATA-4*, тогда как внутренний слой — в эктодерму маркерным геном *nodal*. Одновременно в клеточных агрегатах убывала экспрессия гена *Oct4*. Несколько лабораторий научились эффективно контролировать дифференцировку клеточных агрегатов (эмбриоидных телец) после *экспрессии генов трех зародышевых листков*. Задача заключалась в направленном получении клеток одного зародышевого листка из эмбриоидных телец. С этой целью научились включать гены гастрულიции и органогенеза в эмбриоидных тельцах в более медленном темпе.

Включение генов органогенеза автоматически вело к утрате туморигенности (признаков опухоли) постмитотическими клетками эмбриоидных агрегатов. Более того, трансплантационная выживаемость и активная колонизация такой плюрипотентной ткани в организме реципиента была выше по сравнению с исходными ЭСК. Пересадки тотипотентной зародышевой ткани на стадии экспрессии первых генов зародышевых листков вытеснят в недалеком будущем пересадки клеточных линий стволовых клеток из-за более высокой эффективности колонизации, приживания, плюрипотентности ростков.

С помощью ЭСК апо-Е3-/- удалось вывести линию мышей с высокой предрасположенностью к атерогенному атеросклерозу. У этих животных в постнатальном периоде развивалась гиперхолестеринемия и исчезала природная резистентность к стенозирующим бляшкам. Эти мыши сейчас широко используются для тестирования новых гиполипидемических и антиатерогенных препаратов.

В заключение изложенного следует отметить, что за последние 15 лет выделение и культивирование клеток мезенхимального происхождения из постнатальных органов и тканей человека является основой для получения клеточных материалов (стволовых клеток), используемых в регенеративной медицине для терапии патологий различного генеза: заболеваний печени, кожи, нервной системы, опорно-двигательного аппарата, повреждений сердца, сердечно-сосудистых заболеваний и др. Кроме того, иммуномодулирующие свойства клеток мезенхимального происхождения могут быть использованы при аутоиммунных заболеваниях и при трансплантации органов и тканей. И.В. Вахрушевым в 2011 г. была защищена диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук «Сравнительная характеристика мезенхимальных клеток пульпы молочного зуба и костного мозга: фенотип и первичная оценка возможности применения в тканевой инженерии кости». Материалы диссертации являются своеобразным прорывом в решении задачи обеспечения организма стволовыми клетками, совместимыми с данным конкретным человеком на протяжении его онтогенеза, т.е. на протяжении всей жизни. В данной работе в результате разнообразных экспериментов показано, что культура мезенхимальных клеток пульпы молочного зуба обладает не меньшим остеогенным потенциалом, чем у мезенхимальных стромальных клеток костного мозга. Наряду с очевидными успехами терапевтическое применение мезенхимальных клеток костного мозга ограничено рядом проблем. С возрастом количество этих клеток в костном мозге резко уменьшается и, кроме того, они накапливают мутации (возникающие, например, под действием

неблагоприятных факторов внешней среды), снижающие их остеорегенеративный потенциал. Более того, забор материала для получения культур этих клеток требует пункции красного костного мозга — болезненной и небезопасной инвазивной процедуры. Очевидно, что молочный зуб, выпавший естественным путем, это чрезвычайно простой и не связанный ни с какими рисками способ получения исходного материала для выделения мезенхимальных клеток. Благодаря высокой пролиферативной активности клеток пульпы молочного зуба один выпавший зуб позволяет получить сотни миллионов мезенхимальных клеток. Поэтому целесообразно, чтобы эти клетки закладывались на хранение в банки аутологичных стволовых клеток. В настоящее время в таких банках хранятся лишь образцы пуповинной крови, в которой содержание плюрипотентных клеток невелико и колеблется в широких пределах от родов к родам. Закладка мезенхимальных клеток пульпы молочного зуба в криобанки позволит существенно расширить круг детей, чьи аутологичные стволовые клетки могут быть заложены на хранение с целью последующего использования в течение жизни. Кроме того, внедрение пульпы зуба в качестве доступного и эффективного источника мультипотентных клеток может внести значительный вклад в развитие клеточных технологий и тканевой инженерии, что сегодня крайне актуально для здравоохранения.

## **6.8. Последствия молекулярных нарушений в эмбриогенезе**

Рассмотрим несколько примеров верифицируемых врожденных нарушений метаболизма. Окончательная диагностика этих состояний осуществляется только биохимическими методами.

При недостаточности ферментов обмена гликогена и ключевых ферментов основного пути обмена глюкозы в раннем эмбриогенезе — анаэробного гликолиза — возникают заболевания, связанные с накоплением гликогена (табл. 6.4).

Таблица 6.4

**Врожденные заболевания, связанные с накоплением гликогена в органах**

Тип	Дефект фермента	Ткань	Болезнь	Структура гликогена
I	Глюкозо-6-фосфатаза	Печень	Болезнь Гирке	Нормальная
II	$\alpha$ -1,4-гликозидаза	Все лизосомы	Болезнь Помпе	Нормальная
III	Амило-1,6-гликозидаза (дебраншинг-фермент)	Все органы	Болезнь Кори	Внешние цепи отсутствуют или очень короткие
IV	Амило-(1,4 $\rightarrow$ 1,6)-трансгликозидаза (браншинг-фермент)	Печень, возможно, все органы	Болезнь Андерсена	Очень длинные неразветвленные цепи
V	Гликогенфосфорилаза	Мышцы	Болезнь Мак-Ардла	Нормальная
VI	Гликогенфосфорилаза	Печень	Болезнь Херса	Нормальная
VII	Фосфофруктокиназа	Мышцы	—	Нормальная
VIII	Киназа фосфорилазы	Печень	Болезнь Таруна	Нормальная
IX	Гликогенсинтаза	Печень	—	Нормальная, нарушено качество синтеза

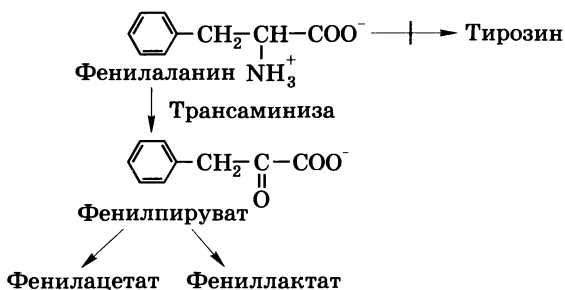
Лимитирующими реакциями синтеза мочевины являются реакции, катализируемые карбамоилфосфатсинтетазой, орнитинтранскарбамоилазой и аргиназой. Поскольку цикл мочевины переводит токсичный аммиак в нетоксичную мочевину, все нарушения синтеза мочевины вызывают гипераммониемию (аммонийную интоксикацию). Известны следующие дефекты ферментов цикла мочевины (орнитинового цикла):

- *гипераммониемия типа I* (дефект карбамоилфосфатсинтетазы, семейное заболевание);
- *гипераммониемия типа II* (дефект орнитинтранскарбамоилазы, связан с X-хромосомой);

- *цитрулинемия* — редкое рецессивно наследуемое заболевание, связанное с дефектом аргининсукцинатасинтетазы, сопровождается выделением с мочой 1–2 г цитруллина в сутки и повышением его содержания в крови и спинномозговой жидкости;
- *аргининсукцинатацидурия* — редкое рецессивно наследуемое заболевание, характеризуется повышенным выделением с мочой и повышенным содержанием в крови и спинномозговой жидкости аргининсукцината (дефект аргининсукцинаталиазы);
- *гипераргининемия* — дефект аргиназы, вызывающий повышение количества аргинина в крови и спинномозговой жидкости.

Все дефекты ферментативных превращений в цикле мочевины сопровождаются гипераммониемией, т. е. повышением концентрации  $\text{NH}_4^+$  в плазме крови. Некоторые из этих дефектов проявляются в первые двое суток после рождения ребенка. Эти дефекты ведут к необратимым поражениям мозга и развитию коматозного состояния. Почему же увеличенная концентрация  $\text{NH}_4^+$  в крови оказывает токсический эффект? Возможно, повышенный уровень глутамина, образованного из глутаминовой кислоты и  $\text{NH}_4^+$ , за счет осмотических эффектов вызывает отек мозга. Терапия таких врожденных состояний требует поиска дополнительных биохимических путей вывода избытка  $\text{NH}_4^+$  из организма.

Нарушение обмена фенилаланина (тирозина). Дефект гена фенилаланин гидроксилазы встречается у одного из 10 000 новорожденных. В результате фенилаланин превращается по альтернативному пути, который приводит к накоплению фенилпирувата, фенилацетата и фениллактата (см. формулу).





При выявлении дефекта назначается диета с низким содержанием фенилаланина, но с достаточным содержанием тирозина. Ранняя диагностика и диета в первые 4–5 лет жизни предотвращают повреждение мозга.

Все метаболиты экскретируются с мочой в большом количестве, и поэтому заболевание характеризуется ведущим признаком — *фенилкетонурией* и называется *фенилпировиноградной олигофренией*. Накопление фенилаланина и его метаболитов в раннем возрасте нарушает нормальное развитие мозга, вызывая умственную отсталость. Это может быть обусловлено тем, что фенилаланин по конкурентному механизму нарушает транспорт других аминокислот через гематоэнцефалический барьер, приводя к нарушению процессов метаболизма в мозге. Половина больных умирает до достижения 20 лет.

Алкаптонурия — это аутосомно-рецессивное заболевание, возникающее с частотой 1:25 000. Дефективным ферментом является *гомогентизатоксидаза*. Гомогентизат накапливается в тканях и крови и экскретируется с мочой. Гомогентизат окисляется оксидазой до бензохинона ацетата, который подвергается полимеризации с образованием темного пигмента алкаптона. Алкаптон накапливается в соединительной ткани, костях и различных органах, приводя к *охронозу*. Цвет мочи изменяется на коричневый или черный. Моча дает положительный тест с хлоридом железа и нитратом серебра. Заболевание не является опасным для жизни и поэтому не требует специального лечения.

Альбинизм развивается в результате нарушения синтеза пигмента меланина. Это аутосомно-рецессивное заболевание, возникающее с частотой 1:20 000. Причиной альбинизма является дефект *тирозиныазы*. Наиболее важной функцией меланина является защита кожи от солнечной радиации. Потеря меланина делает кожу альбиносов чувствительной к солнечным лучам, что повышает риск развития рака кожи. Фотофобия (боязнь солнечного света) обусловлена отсутствием пигмента в сетчатке, хотя это не нарушает зрения у альбиносов.

При дефекте *пара-гидроксифенилпироват-гидроксилазы* в организме накапливается тирозин. Заболевание называется

*тирозиноз*. При его наличии у детей обнаруживается отставание в развитии.

При недостаточности лизилгидроксилазы и уменьшении количества гидроксилизина снижается количество гидроксипролина, что повышает хрупкость стенки капилляров (синдром Элерс — Данлоса, тип VI). Гиперподвижность суставов возможна при уменьшении поперечных сшивок в коллагене (тип V) или недостаточности аминoproколлаген-пептидазы (тип VII). При синдроме Марфана уменьшено количество поперечных сшивок в коллагене, что отражается в виде деформаций скелета и развитии аневризмы аорты.

Ганглиозидозы — наследственные заболевания, характеризующиеся распадом психических функций вплоть до идиотии, дегенерацией нейронов, демиелинизацией, прогрессирующим депонированием ганглиозидов в цитоплазме нейронов. Таким является заболевание Тея — Сакса. Признаки заболевания: 1) прогрессирующие умственные и двигательные расстройства, начинающиеся в детстве и заканчивающиеся летальным исходом; 2) аутосомно-рецессивное наследование; 3) нейрональный липидоз с накоплением  $G_{M1}$  и/или  $G_{M2}$ ; 4) накопление структурнородственных гликолипидов, гликопротеинов, полисахаридов; 5) отсутствие или серьезный дефицит специфических лизосомальных гликогидролаз.

При наследуемой недостаточности  $\alpha$ -маннозидазы,  $\alpha$ -фукозидазы,  $\alpha$ -нейраминидазы и аспартилглюкозаминидазы развиваются заболевания маннозидозы, фукозидозы, сиалидозы и аспартилглюкозаминурия. Их часто относят к группе муколипидозов.

## Глава 7.

# ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ — ОСНОВА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Согласно современной парадигме о дифференциальной активности генов в развитии, предполагается, что все фенотипическое разнообразие специализированных соматических клеток определяется тем, что в каждом конкретном клеточном типе функционируют свойственные только этому типу клеток гены, способные к экспрессии.

## 7.1. Функциональная характеристика гена

Определяя возможность развития отдельного качества, присущего данным клетке или организму, ген характеризуется *дискретностью* действия. Ввиду того что в гене заключается информация об аминокислотной последовательности определенного полипептида, его действие является *специфичным*. Однако в некоторых случаях одна и та же нуклеотидная последовательность может детерминировать синтез не одного, а нескольких полипептидов. Это наблюдается в случае альтернативного сплайсинга у эукариот и при перекрывании генов у фагов и прокариот. Очевидно, такую способность следует оценить как *множественное*, или *плейотропное*, действие гена (хотя традиционно под плейотропным действием гена принято понимать участие его продукта — полипептида — в разных биохимических процессах, имеющих отношение к формированию различных сложных признаков). Определяя возможность транскрибирования мРНК для синтеза конкретной полипептидной цепи, ген характеризуется дозированностью действия, т. е. количественной зависимостью результата его экспрессии от дозы соответствующего аллеля этого гена.

Опираясь на хромосомную теорию наследственности, Т. Морган предположил, что дифференцировка клеток в процессе онтогенеза является результатом последовательных реципрокных (взаимных) влияний цитоплазмы и меняющихся

продуктов активности ядерных генов. Таким образом, впервые прозвучала идея о *дифференциальной экспрессии генов* как основном механизме цитодифференцировки. Сохранение полного хромосомного набора развивающегося организма обеспечивается прежде всего механизмом *митоза* (возможные соматические мутации возникают как исключение). Проведенные цитогенетическим методом исследования кариотипов различных соматических клеток показали почти полную их идентичность. Цитофотометрическим способом установлено, что количество ДНК в них не уменьшается, а методом молекулярной гибридизации показано, что клетки разных тканей идентичны по нуклеотидным последовательностям.

Все ли гены сохраняют способность к реализации заключенной в них информации? О сохранении генетических потенциалов ядер можно судить по результатам опытов, проведенных над растениями и животными. Прошедшая длительный путь дифференцировки *соматическая клетка моркови способна развиваться в полноценный организм*. У животных отдельные соматические клетки после стадии бластулы, как правило, не способны развиваться в целый нормальный организм, но их *ядра, будучи пересажены в цитоплазму овоцита* или яйцеклетки, начинают вести себя соответственно той цитоплазме, в которой они оказались. Существенным достижением в этой области является получение овечки Долли и других трансгенных животных. Общим законом для многоклеточных растительных и животных организмов является то, что, несмотря на структурные и функциональные различия клеток данного организма, в генетическом отношении они *однородны, тождественны и тотипотентны*.

Гипотеза дифференциальной экспрессии генов в признак принимается в настоящее время в качестве основного механизма цитодифференцировки.

Экспрессия гена в признак — это сложный этапный процесс, который можно изучать разными методами: электронной и световой микроскопией, биохимически и др. Имеются данные по изучению количества и качества РНК в ядре и цитоплазме клеток организмов, находящихся на разных стадиях эмбрионального развития, а также в клетках различных типов

дифференциальной транскрипции генов, функционирующих в разные фазы онтогенеза и синтезирующих соответствующие молекулы мРНК. Генотипы клеток различных дифференцированных тканей особи идентичны (они соответствуют генотипу исходной зиготы), однако в них функционируют разные гены. В настоящее время процесс клеточной дифференцировки объясняется с позиций теории дифференциальной активности генов — одной из наиболее плодотворных и обобщающих теорий, сложившихся в биологической науке в XX в. Согласно этой теории, *специализация клеток является результатом действия соответствующих групп генов, характерных для каждого типа клеток*. Последующий морфогенез в большей степени зависит от сложных взаимодействий между тканями, чем морфогенез на ранних стадиях развития. Следует отметить также, что начало клеточной дифференцировки, происходящей в раннем развитии, предоставляет уникальные возможности для исследования процесса регуляции на уровне генома в клетках животных. Для раннего развития характерны возникновение функциональных различий между клетками и появление пространственно разграниченных специфических группировок дифференцированных типов клеток там, где они прежде отсутствовали. Эти процессы должны в основном зависеть от становления мозаичного характера генетической активности в ядрах дифференцирующихся клеток, в результате чего возникает вопрос о регуляции действия генов.

### **7.3. Объяснение процесса клеточной дифференцировки с точки зрения дифференциальной активности генов**

Чтобы принять предположение о том, что процесс дифференцировки является результатом дифференциальной активности генов, необходимы некоторые предпосылки:

1. Дифференцировка зависит от транскрипции содержащейся в геноме информации.
2. У многоклеточных организмов ядро каждой живой клетки содержит тот же самый геном, что и ядро зиготы (Дриш в

1982 г., а затем и другие эмбриологи-экспериментаторы показали, что на самых ранних стадиях развития — стадиях дробления — можно перемещать ядра из одних клеток в другие, не вызывая при этом нарушений в развитии).

3. В процессе детерминации и дифференцировки не происходит необратимых повреждений генома. Был проведен эксперимент: неоплодотворенные яйцеклетки лягушки облучали большой дозой ультрафиолета, которая инактивировала ядра, но практически не повреждала цитоплазму. С помощью микрохирургической техники в такие энуклеированные яйцеклетки пересаживались ядра из дифференцированных клеток — эпителия кишечника головастика. В некоторых случаях удалось получить полностью нормальных плодовитых взрослых особей. Если для опыта брали ядра одной особи, то все развившиеся животные представляли собой клоны, т. е. были сходны между собой так, как и однояйцевые монозиготные близнецы человека.

4. Обратимость дифференцированного состояния может быть показана с помощью гибридизации соматических клеток *in vitro* (получение гибридов между клетками далеких видов с разными типами молекулярной организации генома, например между клетками птиц и млекопитающих).

Таким образом, поскольку детерминация и дифференцировка не связаны с количественными или качественными изменениями генома (в абсолютном большинстве случаев), принято считать, что эти процессы основаны на эпигеномной наследственности. Сущность ее состоит в постоянном воспроизведении в ряду поколений соматических клеток такой надмолекулярной организации хромосом, которая позволяет функционировать в каждом типе клеток строго определенным набором генов. Экспериментальные исследования ранних стадий развития амфибий показали однородность ядер, образующихся при дроблении. Например, Шпеман (1928) перетягивал яйцеклетку после оплодотворения так, что только в одной половине оказывалось ядро. В этой половине шли деления, другая же, безъядерная, половина не дробилась. Между обеими частями яйцеклетки оставался узкий мостик цитоплазмы. После 4-го деления, когда было уже 16 ядер, одно из них попадало

в безъядерную часть, и клетка после этого начинала дробиться, из нее образовывалась полноценная личинка. В настоящее время принято, что ядра соматических клеток обладают не только всей полнотой генетической информации, свойственной данному организму, но и потенциальной способностью обеспечивать нормальное индивидуальное развитие организма. Однако по мере развития деблокирование генетической информации ядер оказывается все более и более трудным, хотя, по-видимому, возможным в любом ядре, содержащем полное количество ДНК. Из этого следует, что в процессе онтогенеза наследственные структуры ядер не претерпевают каких-либо необратимых изменений.

5. Никогда в ядре не функционирует весь геном. Отдельные гены последовательно, по мере развития, начинают функционировать, т. е. синтезировать соответствующие мРНК, в то время как функция других генов блокируется. Таким образом, приобретение клетками новых признаков и утрата старых в ряду клеточных поколений представляет собой результат *эпигенетической изменчивости*, которая и обеспечивает дифференциацию клеток. Показано, в частности, что возникновение различий в образующихся информационных РНК, которые определяют белковый синтез, обусловлены резкими изменениями в функционировании хромосом и ДНК ядра. Так, в политенных хромосомах личинок двукрылых при этом образуются утолщенные диски, вздутия и пуфы. В них хромосомы деспирализуются и идет интенсивный синтез РНК. В разные периоды жизни личинки повышенную активность обнаруживают отличающиеся участки хромосом. Более того, под влиянием гормона линьки экдизона образуются два новых пуфа, которые существуют, пока действует гормон. Следовательно, в каждый отдельный период жизни в клетке функционирует только часть ее генетического аппарата, а остальная часть находится в репрессивном состоянии. После определенного отрезка времени начинает функционировать другая группа генов, которая, вероятно, одновременно репрессирует остальной генетический материал.

6. Развитие характеризуется *сменой активности различных генов* и их постепенным включением в работу при онтоге-

нетическом развитии организма. Процессы развития связаны с взаимодействием цитоплазмы и ядра. Здесь функционируют обратные связи, при которых возникают вещества цитоплазмы, возможно, индукторы и репрессоры, регуляторы транскрибирования генов. Это отчетливо видно из фактов многочисленных мутаций, прерывающих процессы развития особи на разных его этапах. На каждом этапе онтогенеза активны только те гены, функция которых осуществляется именно на этом этапе. Первоначально включенные гены, контролирующие основные процессы клеточного метаболизма, активны на протяжении всей жизни особи. Действие других генов может инактивироваться после выполнения ими своей функции. Четкая упорядоченность в связи со стадиями индивидуального развития установлена для смены функционирования генов гемоглобина у млекопитающих. Велика роль проникающих в клетку стероидных гормонов в регуляции генной активности у животных. Отдельные гормоны активируют гены не во всех клетках, а только в клетках-мишенях, содержащих специальные рецепторные белки, с которыми специфически связываются молекулы гормона. Это связывание происходит в цитоплазме, а затем образовавшийся комплекс проникает в ядро, где и взаимодействует с определенными негистоновыми белками хромосом. В отсутствие гормонов эти белки блокируют либо промоторные, либо иные, регуляторные, участки определенных генов. Комплекс гормон — рецепторный белок снимает блокирующее действие негистонового белка-репрессора, следствием чего являются транскрипция данного гена, созревание мРНК, транспорт ее в цитоплазму и синтез белка.

7. Важную роль играет *скорость*, с которой клетки многоклеточных организмов реагируют на активирующие (или дерепрессирующие) внешние сигналы. Сейчас хорошо известно, что индуцибельные бактериальные системы почти мгновенно реагируют на соответствующие индуктивные стимулы. Например, у *B. subtilis* индуцированный синтез мРНК для гистидазы начинается менее чем через две минуты после введения гистидина. По данным последних исследований, лаг-период примерно равен времени, необходимому для синтеза одной молекулы



мРНК. В опытах по противоточному разделению РНК печени при экстрагировании после введения кортизона уже через пять минут в спектре РНК были обнаружены значительные изменения. Следует отметить, что какая-то часть этого времени затрачивается на достижение гормоном участков генома, ответственных за синтез РНК. Сходные результаты были получены при применении других гормонов, таких, например, как тестостерон (на введение которого клетки печени самца и самки реагировали по-разному), а также нестероидных гормонов — тироксина и инсулина. Известно, что уже через две минуты после обработки эстрогеном удельная активность ядерной РНК клеток матки возрастает на 40 %. Геном реагирует на введение гормона почти немедленно. А если учесть время, которое необходимо для проникновения гормона в клетку, то можно высчитать, что *реакция генома на введение гормонов реализуется в течение всего лишь нескольких секунд*. Следует отметить, что быстрой реакция генома может быть, по-видимому, и в растительных клетках. Так, например, интенсивность синтеза РНК в ядрах изолированного эндосперма кокосового ореха уже через несколько минут после воздействия гиббереллином, ауксином или кинетином значительно повышается. В исследованиях влияния солнечного освещения на адаптированные к темноте листья капусты также отмечена быстрая реакция генома на изменение условий внешней среды. После продолжительного пребывания в темноте в клетках листа содержатся в основном моносомы и синтез белка протекает с относительно низкой интенсивностью. Уже через 4 мин после начала освещения в клетках появляются новые матричные РНК, и вслед за этим резко увеличивается число полисом. Согласно приведенным ранее данным, геномы многоклеточных животных способны реагировать на соответствующие стимулы, поступающие из внешней среды, с такой же скоростью, как и бактериальные геномы, т. е. в пределах от нескольких секунд до 1–2 мин.

8. Анализ особенностей действия генов оказался возможным при изучении клеток в условиях культуры тканей. Характерной чертой поведения дифференцированных клеток при их введении в культуру ткани служит процесс *дедиффе-*

*ренцировки*. Клетки теряют специализированные функции и превращаются в фибробласты, похожие на клетки из раннего эмбрионального развития. Эти факты свидетельствуют о том, что, попадая в культуру ткани, в пробирке дифференцированные клетки теряют связь с регулирующей программой, и их гены, обеспечивавшие специализированные функции, «замолкают» в изолированных от организма условиях. Вместе с тем имеются факты, что функции генов жестко определяются создавшимися в клетке условиями. В этих случаях введение специализированных клеток в культуру не лишает их способности синтезировать свойственные им вещества. Это касается клеток, синтезирующих коллаген. Клетки из раковых опухолей эндокринных желез продолжают синтезировать гормоны. В некоторых случаях перевод клеток в культуры запускает функции генов. Описаны случаи, когда клетки в культуре из нормальных тканей начинали синтезировать инсулин. Молчащие гены переходят в функциональное состояние под контролем биохимических регуляторов. Это показано на введении ядерных эритроцитов кур в условия культуры клеток человека *HeLa*. Клетки *HeLa* снабжают эритроциты кур веществами — дерепрессорами генов. Объем ядра эритроцитов увеличивается, а затем начинаются транскрипция мРНК и синтез белков. В течение клеточного цикла работа генов прерывается на время митоза. Это было доказано при исследовании синхронизированных культур клеток.

## 7.4. Тканеспецифические гены

Тканеспецифические гены, определяющие особенности клеточной дифференцировки, испытывают давление системы других генов, контролирующих их функции. Эти гены можно разделить на регуляторные, временные и «архитектурные». Приведем результаты исследований Л.И. Корочкина (1996) о проявлении в семявыносящей луковице самцов *Drosophila virilis* (один из хорошо генетически изученных видов рода *Drosophila*) гена, кодирующего тканеспецифический изофермент (фракцию фермента) эстеразу. Этот изофермент, попадая

в половые пути самки при оплодотворении, расщепляет в них цис-вакценилацетат с образованием феромона — пахнущего продукта, который сообщает самцам, что данная самка больше не нуждается в их услугах. Оказалось, что уровень активности структурного гена эстеразы, который локализован во 2-й хромосоме, зависит от сигналов, поступающих от регуляторного гена, разместившегося в половой X-хромосоме. Он определяет, сколько молекул мРНК будет синтезировано в клетке. Однако хотя мРНК синтезируется и транспортируется в цитоплазму клетки, синтез фермента не начинается, пока не поступит сигнал от другого гена, гена «времени», который расположен в 4-й хромосоме и от которого зависит момент начала синтеза молекул эстеразы на матрицах мРНК.

Что же это за сигнал? По предварительным данным, это одна из транспортных РНК, несущих аминокислоты к месту синтеза белка, она оказалась особенно нужной для синтеза изофермента эстеразы. Однако молекулы изофермента, которые синтезируются в клетке, могут находиться там либо в свободном, либо в связанном с белками клеточных мембран состоянии. У разных линий и видов мухи соотношение свободной и связанной с мембранами фракций может быть различным, оно определяется специальным «архитектурным» геном, отвечающим за синтез определенного белка, встроенного в эти мембраны.

## 7.5. Молекулярные данные о генетической регуляции специфических синтезов в клетке

Согласно Л.И. Корочкину (1996), рядом со структурным геном существует небольшой (от 20 до 100 нуклеотидных пар) участок ДНК, который, по-видимому, воспринимает контролирующие сигналы (возможно, связывающиеся с ДНК специфические низкомолекулярные белки) и заставляет структурный ген функционировать в нужное время и в нужном месте с определенной степенью активности. Утрата этого участка влечет за собой нарушение функции гена: он или не работает, или работает плохо или необычно, что приводит к нарушениям в развитии зародыша, а иногда и к его гибели. Как же находят

такие специфические участки ДНК, выполняющие командные функции при структурном гене?

Это стало возможным благодаря соединению методов молекулярной биологии и экспериментальной эмбриологии, позволившему получать так называемых трансгенных животных, т. е. животных, в геном которых с помощью микроманипуляций введены чужеродные гены.

Если, например, нужно узнать, от какого участка ДНК зависит тканеспецифичность экспрессии гена, кодирующего алкогольдегидрогеназу (фермент, расщепляющий спирт) у дрозофилы, то с помощью методов генной инженерии изготавливают искусственные конструкции, содержащие интересующий структурный ген и смежные участки ДНК, имеющие в разных вариантах конструкции разную длину. Такие конструкции соединяют с подвижным генетическим элементом — Р-элементом, способным перемещаться в геноме, внедряться в его ДНК и закрепляться там, и затем вводят в развивающиеся яйца дрозофилы, принадлежащей к такой линии, у представителей которой алкогольдегидрогеназа в результате мутации утратила свою активность. Трансгенных животных узнают, таким образом, по появлению активности алкогольдегидрогеназы. Среди них есть мухи, у которых полностью восстанавливается тканевая специфичность экспрессии гена алкогольдегидрогеназы. Тогда смотрят, какой же длины фрагмент регуляторной ДНК попал в их геном, и заключают, что он-то и является «виновником» специфической активности структурного гена в определенном наборе тканей и органов [6].

## 7.6. Стволовые клетки и дифференцировка

Стволовые клетки — это клетки, сохраняющие потенциал к развитию в разных направлениях. Из стволовой клетки могут возникнуть и кожная, и нервная клетки, и клетки крови. Считалось, что во взрослом организме стволовые клетки отсутствуют, что их существование ограничивается самым ранним периодом эмбрионального развития. Однако в 70-е гг. прошлого столетия А.Я. Фриденштейн с соавторами обнаружили эти

клетки в мезенхиме (строме) взрослого костного мозга. По принадлежности к строме их в дальнейшем стали называть *стромальными стволовыми клетками*. Тогда же были опубликованы работы, демонстрировавшие наличие стволовых клеток практически во всех органах взрослых животных и человека. В связи с этим принято разделять стволовые клетки на *эмбриональные стволовые клетки (ЭСК)* (их выделяют из эмбрионов на стадии бластоцисты) и *региональные стволовые клетки (РСК)* (их выделяют из органов взрослых особей или из органов эмбрионов более поздних стадий).

Будучи *мультипотентными*, стволовые клетки составляют существенный восстановительный резерв организма и способствуют замещению дефектов, возникающих в силу тех или иных обстоятельств. Особое удивление биологов вызвало наличие стволовых клеток в центральной нервной системе. Они отвечают на различные поражения нервной ткани размножением (сами нервные клетки, как известно, утрачивают способность к размножению уже на стадии нейробласта) и дифференцировкой в нервные и глиальные клетки. Полагают, что изолированные нейральные РСК способны превращаться и в другие производные.

Стволовые клетки являются удобной моделью для анализа роли генов в процессе дифференцировки. Способность стволовых клеток (как РСК, так и ЭСК) трансформироваться в разных направлениях делает их весьма удобной модельной системой для изучения молекулярно-генетических событий, обуславливающих дифференцировку клеток в разных направлениях. Анализ культур стволовых клеток с помощью молекулярно-генетического микроэрей-метода продемонстрировал, что в одном клоне мезенхимных стволовых клеток синтезируется по крайней мере 1200 мРНК. В разных стволовых клетках присутствует похожий набор предсинтезированных мРНК-копий многих генов.

В стволовых клетках проявляется общий принцип онтогенеза — функция генов с опережением, т. е. синтез тех мРНК, которые будут нужны (будут работать) на стадиях развития, порой значительно более поздних [7], [10].

Изменились ли принципиально наши представления о клеточной дифференцировке с открытием стволовых клеток? Вопреки утверждению некоторых авторов, пока не изменились. Действительно:

- Как уже отмечалось, дифференцировка самых разных стволовых клеток происходит по тем же законам, что были сформулированы для клеточной дифференцировки вообще. И в этом заключается ценность стволовых клеток как модельной экспериментальной системы.

- Клетка, в том числе стволовая, с выходом в дифференцировку утрачивает способность к делению, по крайней мере на стадии терминальной дифференцировки и прилежащих к ней стадиях.

- Исследование поведения стволовых клеток не поколебало представлений о стабильности и необратимости клеточной дифференцировки. Мы по-прежнему можем утверждать, что из фиброцита, плазматической клетки или париетальной клетки желудка никогда не получится нейрон, а из нейрона не возникнет кожная клетка.

В ходе клеточного деления стволовых и камбиальных клеток возникают материнская и дочерняя клетки. Материнские клетки используются для самоподдержания популяции, а дочерние — если они стволовые — выходят либо в стволовую клетку, либо непосредственно в дифференцировку, а если камбиальные — непосредственно в дифференцировку. На стадии стволовой клетки сохраняются свойства ранних эмбриональных клеток развиваться в разных направлениях, на стадии камбиальной клетки эта способность утрачивается, они производят лишь региональные структуры.

Генетические факторы играют ведущую роль в онтогенезе живых организмов. Для различных биологических видов — мыши, собаки, лошади, человека — характерна различная максимальная продолжительность жизни — 3, 20, 40 и 110 лет соответственно, хотя живут они в сходных условиях окружающей среды и имеют практически одинаковые механизмы метаболизма. Метаболизм формируется на основе генетической информации и может модифицироваться факторами среды обитания. Поэтому целесообразно подытожить ранее рассмотренные положения онтогенеза и филогенеза применительно к человеку по мере его перемещения по шкале жизни.

### 8.1. Периодизация онтогенеза человека

Основные периоды жизни человека представлены в табл. 8.1. Антенатальный период — период внутриутробного развития (дородовый онтогенез), в котором выделяют эмбриональный (до 10 недель беременности), пренатальный (до 28 недель беременности) и поздний антенатальный периоды (от 28 недель беременности до рождения).

Перинатальный период длится с 28 недель беременности до 7 дней жизни, период новорожденности — от рождения до 28 дней жизни, грудной возраст — до года.

Постэмбриональный период — период индивидуального развития от рождения (выхода из яйцевых оболочек) до смерти. В этом периоде завершаются формообразовательные процессы, происходят половое созревание, размножение, старость и смерть. Периоды постнатального онтогенеза: дорепродуктивный, репродуктивный (пубертатный), пострепродуктивный.

Таблица 8.1

## Периодизация онтогенеза человека

Период	Пол	
	Мужской	Женский
Эмбриональный	До 10 недель беременности	До 10 недель беременности
Пренатальный	До 28 недель беременности	До 28 недель беременности
Поздний антенатальный	28 недель беременности — рождение	28 недель беременности — рождение
Новорожденности*	1–28 суток	1–28 суток
Грудной	29 суток — 1 год	29 суток — 1 год
Раннего детства	1–3 года	1–3 года
Детства (1-й период)	3–6 лет	3–6 лет
Детства (2-й период)	6–12 лет	6–11 лет
Подростковый*	12–16 лет	11–15 лет
Юношеский	16–21 год	15–20 лет
Зрелый (1-й период)	21–35 лет	20–35 лет
Зрелый (2-й период)*	35–60 лет	35–55 лет
Пожилрой	60–75 лет	55–75 лет
Старческий	75–90 лет	75–90 лет
Долгожителей	Свыше 90 лет	Свыше 90 лет

\* Критические периоды постнатального онтогенеза.

## 8.2. Обмен веществ в антенатальном периоде

Биохимические особенности плода в позднем антенатальном периоде во многом определяют особенности химического состава и обменных процессов у новорожденных. На метаболизм плода и особенности биохимических показателей влияют как процессы, протекающие в самом организме, так и транспорт метаболитов через плацентарный барьер от матери к плоду.

### 8.2.1. Обмен углеводов

В тканях плода в условиях относительно низкого содержания кислорода преобладает филогенетически наиболее древний анаэробный путь окисления углеводов. Включение глю-



козы в катаболизм идет через альдозоредуктазную реакцию, трансформирующую ее в сорбит с последующим окислением данного спирта сорбитолдегидрогеназой до фруктозы. Поэтому в крови плода обнаруживаются фруктоза и сорбит. У взрослых людей этот путь не имеет физиологического значения, так как глюкоза вовлекается в катаболизм с участием глюкокиназной и гексокиназной реакций.

У плода активно функционирует *пентозофосфатный путь окисления глюкозы*, который является источником пентоз и НАДФН, необходимых для синтеза нуклеиновых кислот, макроэргических соединений, липидов. Активность ключевого окислительного фермента пентозофосфатного пути — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы — максимальна у плода и падает после рождения.

Процесс *синтеза гликогена* у плода наиболее активно протекает в последние 2–3 мес внутриутробного развития. Содержание гликогена в печени в последние недели беременности достигает 10 %, а в мышечной ткани — 3 %. У плода наблюдается относительная гипогликемия.

У плода в клетках слизистой кишечника синтезируются *ферменты переваривания углеводов*, которые принимают участие в расщеплении дисахаридов до моносахаридов с последующим их всасыванием. К 32-й неделе беременности их активность достигает 70 % от активности у доношенных новорожденных. Основной фермент — лактаза — образуется медленнее и к 30–34-й неделе беременности определяется в виде следов. Активность ее повышается к концу нормально протекающей беременности.

### 8.2.2. Обмен липидов

Транспорт жирных кислот к плоду через плаценту осуществляют эритроциты и сыворотка крови. Состав жирных кислот и фосфолипидов плода определяется их содержанием в организме матери.

Характерной особенностью липидного обмена плода является низкая активность процесса *липолиза*. Использование жиров как энергетического материала тканями плода весьма

ограничено, так как для их окисления требуется значительное количество кислорода.

Поскольку перенос готовых липидов через плаценту весьма ограничен, в печени и жировой ткани активно протекает *липогенез*. К концу внутриутробного развития плода общее количество липидов в организме может достигать 8–16 % от массы тела. Особенно значимы запасы *бурой жировой ткани* (содержащей повышенное количество митохондрий), играющей в постнатальном периоде важную роль в процессе термогенеза.

Для синтеза липидов в организме плода используются глюкоза и ее метаболиты. При этом исходным материалом для синтеза жирных кислот *de novo* служит активная форма уксусной кислоты (*ацетил-КоА*), которая не только образуется в тканях плода, но и может довольно легко поступать к нему через плаценту от матери. Для синтеза жиров могут использоваться и готовые жирные кислоты, которые также могут поступать к плоду через плаценту (к концу беременности в жировой ткани матери усиливаются липолитические процессы).

На ранних этапах развития плода в его тканевых жирах содержится мало ненасыщенных жирных кислот. Однако по мере развития плода в липидах возрастает содержание *линолевой* и *арахидоновой кислот*.

В печени плода окисление жиров протекает с низкой интенсивностью, снижена также способность к продукции кетонных тел и глицерофосфолипидов. Вместе с тем в печени имеются все ферменты, необходимые для синтеза холестерина *de novo*. Хотя активность лимитирующего фермента его синтеза ( $\beta$ -гидрокси- $\beta$ -метил-глутарил-КоА-редуктазы) сравнительно невелика, тем не менее плод на 80 % обеспечивает свою потребность в холестероле и лишь 20 % холестерола поступает к нему через плаценту.

Перед рождением наиболее распространенным тканевым фосфолипидом (за исключением ткани мозга) является *фосфатидилхолин*, в котором преобладает линолевая кислота. Особенно важна роль фосфатидилхолина в образовании *сурфактанта* — поверхностно-активного вещества легочных альвеол. В головном мозге плода по мере его развития содер-

жание фосфатидилхолина постепенно уменьшается, тогда как количество *фосфатидилэтаноламина*, напротив, возрастает. В ткани мозга активно синтезируются *церебровиды* и *ганглиозиды*.

### 8.2.3. Обмен белков

Общее содержание белков в организме плода составляет менее 10 % массы тела. В фетальном периоде усилен как синтез, так и катаболизм белков, что и определяет высокую скорость их обновления.

К моменту рождения содержание общего белка в плазме крови плода составляет около 60 г/л (у взрослого человека 65–85 г/л). *Альбумины* обнаруживаются в крови эмбриона уже на 8-й неделе внутриутробного развития, тогда как к 13-й неделе в ней выявляется уже до 10 плазменных белков. В плаценте происходит синтез небольших количеств  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -*глобулинов*, *фетопротеина*.

Плацентарный переход белков не зависит от их молекулярной массы, а определяется прежде всего их структурными особенностями. Так, например, через плаценту не проходят такие белки, как *гаптоглобин* и *трансферрин*.

В эмбриональном периоде происходит неоднократная замена типов гемоглобина крови, что определяется преобладанием синтеза Hb сначала в печени, а позже в костном мозге плода.

Плацента способна активно переносить и концентрировать аминокислоты: содержание их в пуповинной крови почти в два раза выше, чем в крови матери. В антенатальном периоде содержание ДНК в тканях плода повышено, что свидетельствует о высокой интенсивности белоксинтезирующих процессов.

### 8.2.4. Водно-минеральный обмен

Ткани плода характеризуются высоким содержанием воды. Количество воды в организме плода составляет в начале беременности 4 %, в конце беременности — 75 %. В последние 5 мес беременности изменяется соотношение внутри- и внеклеточной воды: содержание внутриклеточной воды снижает-

ся с 62 до 43 %; количество внеклеточной воды повышается с 25 до 32 %.

В процессе развития плода в его тканях, плазме, а также амниотической жидкости задерживается до 3,5 л воды, около 400 ммоль натрия и 170 ммоль калия. Обмен воды и электролитов между плодом и материнским организмом происходит с высокой скоростью. *Амниотическая жидкость может рассматриваться как внеклеточное пространство плода.*

Кальций поступает к плоду через плаценту путем активного транспорта. Этот процесс обеспечивает более высокое содержание в крови плода по сравнению с кровью матери как общего кальция, так и его ионизированной формы. Процесс кальцификации костной ткани начинается у плода уже на 3-м месяце внутриутробного развития. Фосфор, так же как и кальций, во внутриутробном периоде активно поступает к плоду против градиента концентрации из организма матери.

Ежесуточное потребление плодом ионов магния достигает 3–4 мг.

К концу беременности плацента играет роль депо различных микроэлементов, в частности магния, меди, железа. Через плаценту в организм плода от матери транспортируются железо, цинк, медь, марганец, селен. Железо наиболее активно депонируется в печени, селезенке, костном мозге плода в последнем триместре беременности. Содержание цинка в организме плода постепенно увеличивается, причем наиболее существенно в последние два месяца беременности, достигая к моменту рождения уровня, характерного для взрослого человека. Наиболее высокое содержание Zn отмечается в головном мозге, поджелудочной железе, костях. Медь депонируется в печени, связываясь с металлотioniном. Но особенно высока концентрация меди в головном мозге плода. Содержание марганца наиболее высоко в поджелудочной железе и нервной ткани плода. Биологическая роль Mn во многом определяется его участием в построении активных центров многих ферментов, таких как супероксиддисмутаза, пируваткарбоксилаза. Селен депонируется в плаценте. Биологическая роль Se определяется его участием в работе антиоксидантной системы организма.

### 8.2.5. Свободно-радикальное окисление и антиоксидантная система

В эмбриональном периоде чрезвычайно важна роль плаценты в функционировании биологической системы «мать — плацента — плод». В силу более высокой концентрации кислорода в плаценте в ней активны окислительные свободно-радикальные процессы. Избыточному усилению интенсивности процессов свободно-радикального окисления в ткани плаценты препятствует многокомпонентная антиоксидантная система, которая обеспечивает связывание и модификацию радикалов, предупреждает образование перекисей и разрушает их. В плаценте обнаружены довольно высокая концентрация небелковых SH-групп, активные ферменты глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, супероксиддисмутаза, каталаза. Глутатион-S-трансфераза плаценты участвует в реакциях детоксикации.

Наряду с активацией свободно-радикальных процессов в течение последних месяцев внутриутробного развития формируется антиоксидантная система тканей плода.

### 8.2.6. Функция эндокринных желез

Плацента играет роль железы внутренней секреции, будучи посредником в создании гормонального комплекса системы «мать — плод». Она синтезирует хорионический гонадотропин, плацентарный лактоген и пролактин,  $\beta$ -эндорфин,  $\alpha$ -меланотропин, проопиомеланокортин (предшественник кортикотропина), гестагены и эстрогены.

Гипофиз начинает функционировать очень рано (на 20–25-й день внутриутробного развития).

Начало секреции *соматотропина* соответствует 7–10-й неделе развития. С 9–10-й недели внутриутробной жизни определяются следы *кортикотропина*, количество которого достигает максимума к 26–27-й неделе внутриутробного развития (рис. 8.1).

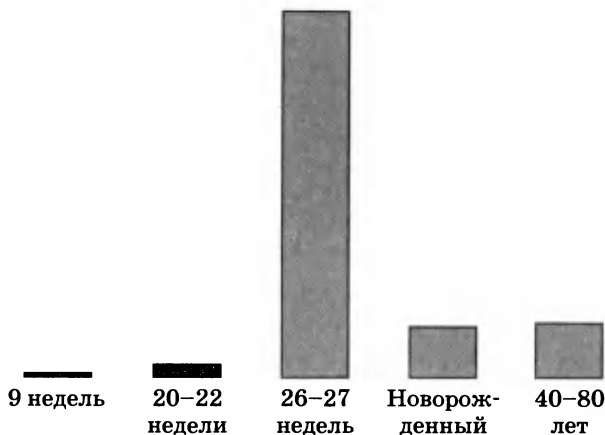


Рис. 8.1. Относительное содержание кортикотропина в онтогенезе человека

Концентрация *тиротропина* в крови плода в 3–5 раз выше, чем во взрослом организме. *Пролактин* обнаруживается в крови плода с 12-й недели внутриутробного развития. Довольно рано, уже в первом триместре беременности, гипофиз плода начинает синтезировать *фоллитропин*.

Щитовидная железа начинает формироваться на 4–5-й неделе внутриутробного развития. К 4-му месяцу внутриутробного развития она уже структурно сформирована и функционально активна. Секреция фетальной щитовидной железой *тироидных гормонов* начинается к середине беременности, хотя способность синтезировать *тироглобулин* может возникнуть рано, уровни тироидных гормонов остаются низкими. Способность щитовидной железы плода к поглощению йода проявляется на 10–12-й неделе внутриутробного развития. Синтез же гормонов в ней происходит постепенно: сначала синтезируется моноидтирозин, затем дийодтирозин, позже — йодтиронины. С увеличением возраста плода в крови нарастает концентрация *тиротропина* (ТТГ) и параллельно-свободного тироксина. В конце внутриутробного периода уровень свободного биологически активного *тироксина* в крови плода даже выше, чем в материнской крови, что свидетельствует о гипер-

функции щитовидной железы, обнаруживаемой у новорожденных. Уровень белково-связанного йода также повышен при рождении. Недостаточность функции щитовидной железы еще до рождения ребенка ведет к задержке умственного развития в постнатальном периоде.

Надпочечники закладываются на 4-й неделе внутриутробного развития, а с 25-й в них начинается активный синтез кортикостероидов. На 3–4-м месяце внутриутробного развития плода отмечается активная пролиферация клеток коркового слоя надпочечников. О первостепенной роли кортикостероидов в обеспечении нормальных условий развития плода свидетельствует тот факт, что на 4-м месяце развития масса надпочечников превышает массу почек. Основной гормон коры надпочечников глюкокортикоидного ряда *кортизол* впервые обнаруживается у плода на 7–8-й неделе внутриутробного развития, количество его значительно возрастает после 30-й недели беременности, что связано с увеличением концентрации кортикотропина. Содержание кортизола в крови плода всегда ниже, чем в крови матери, что объясняется ее более низкой стероидсвязывающей способностью. Особенностью продукции кортикостероидов у плода является синтез значительных количеств *кортикостерона* (основного глюкокортикоида грызунов), так что его концентрация в крови равна концентрации кортизола. В крови плода обнаружены значительные количества *дезоксикортикостерона*. Снижена способность печени синтезировать парные соединения кортикостероидов с глюкуроновой кислотой, что определяется малой активностью *УДФ-глюкуронилтрансферазы*. Возможен трансплацентарный переход кортикостероидов в кровь плода из крови матери.

В пуповинной крови новорожденного *альдостерон* присутствует в тех же концентрациях, что и в венозной крови матери.

Обмен стероидов происходит в единой системе «мать — плацента — плод». *Дегидроэпиандростерон* (ДЭПС) — предшественник стероидных гормонов активно образуется как в надпочечниках, так и в печени плода. Поступая в плаценту, где активны ферменты ароматизации кольца А, он преобразуется

в *эстрогены*. Выведение эстриола с мочой матери отражает функциональное состояние системы «плод — плацента». Организм плода защищен от эстрогенов, образующихся в плаценте, ферментными системами их сульфатирования и гидроксилирования. Клетки Лейдига у эмбриона закладываются на 7–9-й неделе развития. Избыток андрогенов в этот период связан с гиперплазией надпочечников. Собственные эстрогены эмбрионом не синтезируются.

*Адреналин* в надпочечниках плода выявляется на 12-й неделе внутриутробного развития, но его секреция повышается только после рождения.

Поджелудочная железа уже после 10-й недели эмбрионального периода содержит 4 вида клеток:  $\alpha$ -клетки (20 %), вырабатывающие гормон *глюкагон*,  $\beta$ -клетки (60–80 %), продуцирующие *инсулин*,  $\gamma$ -клетки, не содержащие секреторных гранул, и  $\delta$ -клетки, вырабатывающие *соматостатин*. У плода  $\beta$ -клетки появляются раньше, чем  $\alpha$ -клетки. Количество инсулина, вырабатываемое этими клетками, повышается с увеличением срока внутриутробного развития и к его окончанию уровень инсулина превышает показатели у взрослого человека в 5–6 раз. Инсулин и глюкагон обнаруживаются в ткани поджелудочной железы на 8–9-й неделе внутриутробного развития. Во внутриутробном периоде продукция инсулина не играет существенной роли в регуляции обмена глюкозы. В клетках поджелудочной железы выявлено раннее образование соматостатина (у трехнедельного плода).

Активность паращитовидных желез у плода начинает проявляться на 12-й неделе развития. Уровень *паратгормона* у плода низкий, что может свидетельствовать о низкой активности паращитовидных желез. Это может быть обусловлено как усиленным переходом материнского паратгормона через плаценту, так и поступлением через нее ионизированного кальция, который тормозит его синтез паращитовидными железами. Поэтому у новорожденных отмечается относительный гипопаратирозидизм. Содержание *кальцитонина* в крови плода повышено. Кальцитонин секретируется в кровь плода также собственными щитовидными железами. Процесс увели-



чения выработки плодом эндогенного кальцитонина обеспечивает формирование костной ткани в последние 3 мес внутриутробного развития.

До 6-й недели внутриутробного развития плода формирующиеся гонады морфологически одинаковы для обоих полов и состоят из коркового и мозгового слоев. В последующем из коркового слоя образуются яичники, а из мозгового слоя — яички в зависимости от наличия X- и X- или X- и Y-хромосом.

### **8.3. Особенности обмена веществ у новорожденных**

Самым ответственным для адаптации новорожденного является ранний неонатальный период (первые 7 дней жизни), в течение которого происходит переход из состояния невесомости к гравитации, перестраивается гемодинамика, увеличивается теплоотдача, осуществляется переход на энтеральный тип питания, возрастает гемоконцентрация. На фоне перестройки многих физиологических функций происходят существенные изменения в обмене веществ.

Постнатальная биохимическая адаптация проходит в несколько этапов:

- первичные реакции противодействия факторам внешней среды и связанные с этим изменения внутренней среды организма (первые 6 часов после рождения);
- максимальная активация метаболизма — суперкомпенсация (от 6 часов до 4 суток);
- катаболическая стадия, временный спад — последствие (от 6 до 14 суток);
- активация анаболических процессов (от 2 недель до 3 месяцев).

Периоды смены фаз адаптации являются наиболее критическими.

В ранний неонатальный период могут развиваться так называемые транзиторные состояния (транзиторная гипогликемия, гипопроотеинемия, гипербилирубинемия и др.), которые,

как правило, не требуют коррекции, но при неблагоприятных обстоятельствах могут приобретать патологический характер.

После рождения происходит существенная перестройка обмена углеводов, которые у плода являлись основным энергетическим материалом для анаболических процессов в условиях относительной гипоксии (углеводы — единственный класс органических веществ, способные окисляться и служить источником энергии в анаэробных условиях). Несмотря на некоторое улучшение снабжения тканей кислородом, гликолитические процессы у новорожденных протекают все же весьма активно. Интенсивность гликолиза у них на 30–50 % выше, чем у взрослых. В первые дни жизни содержание пирувата у новорожденных превышает содержание пирувата у взрослых более чем в 10 раз, что свидетельствует о выраженной гипоксии.

В период новорожденности начиная с конца первой недели возрастает активность пентозофосфатного пути обмена углеводов. В отличие от взрослых у новорожденных детей этот метаболический процесс не только служит пластическим целям, но и выполняет энергетическую функцию: примерно половина окисляемой по этому пути глюкозы идет на энергетические цели. Это связано с невысокой энергетической эффективностью анаэробного гликолиза и слабо функционирующим у новорожденных аэробным путем окисления глюкозы — основным энергообразующим процессом углеводного обмена у взрослых. Соотношение суммарной активности ферментов гликолиза и пентозофосфатного пути в печени новорожденных составляет 1,2 : 2,1 (у взрослых 1,1 : 2,6). Содержание глюкозы в крови новорожденного в первые сутки составляет 2,22–3,33 ммоль/л, к концу первого месяца — 2,7–4,4 ммоль/л.

Общее содержание жиров в организме новорожденных составляет 8–16 % от массы тела. Жировая ткань новорожденного отличается биохимически от жировой ткани взрослого человека. Особое значение в период новорожденности имеет *бурая жировая ткань* (бурый цвет жировой ткани придает железо цитохромов митохондрий), на долю которой приходится значительная часть от общих жировых запасов. Ее адипоциты

богаты митохондриями, в которых активно функционируют нефосфорилирующие дыхательные цепи. Это позволяет основное количество энергии окислительных процессов трансформировать в тепло, что крайне важно для поддержания теплового баланса новорожденного.

После рождения изменяется не только структура жировой ткани, но и ее химический состав. Так, жировая ткань новорожденных содержит 56,5 % воды, 35,5 % липидов (у взрослых это соотношение изменяется в пользу липидов). Состав жирных кислот триацилглицеролов тканей новорожденных отличается от их состава у матери. Доля пальмитиновой, миристиновой, лауриновой и стеариновой кислот в жировой ткани новорожденных намного выше, уровень линолевой кислоты низок, а арахидоновой — вариабелен. Таким образом, в липидах тканей новорожденных преобладают насыщенные жирные кислоты, поскольку синтез ненасыщенных жирных кислот у них крайне низок. Потребность в эссенциальных полиненасыщенных жирных кислотах пополняется за счет жиров молока.

Потребность в жирах у новорожденного превышает потребность в белках, но она ниже, чем потребность в углеводах. В первом полугодии ребенок должен получать 6–6,5 г жиров на 1 кг массы тела, что полностью обеспечивается жировыми компонентами материнского молока. В переваривании жиров в полости желудка активную роль играет и так называемая *лингвальная липаза*, которая секретируется слизистой оболочкой корня языка и примыкающей к нему области глотки грудного ребенка в ответ на сосательные и глотательные движения при кормлении.

Содержание липидных фракций новорожденных отличается от спектра этих веществ у более старших детей и взрослых тем, что у них значительно увеличено содержание  $\alpha$ -липопротеинов (ЛПВП) и понижено количество  $\beta$ -липопротеинов (ЛПНП).

Общее содержание белков в организме новорожденных ниже, чем у взрослых, и составляет 10–12 % массы тела. Количество белков в плазме крови при рождении находится в пределах 41–63 г/л. К концу беременности в печени плода

довольно активно осуществляется синтез альбуминов, но снижена продукция  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов и крайне ограничен синтез  $\gamma$ -глобулинов.

Содержание аминокислот в крови новорожденных выше, чем в крови матери, и очень вариабельно. Наиболее высокая концентрация цистеина, глутамата, аспартата, фенилаланина. К 8–10-му дню после рождения уровень большинства аминокислот снижается. У всех новорожденных установлена функциональная незрелость обмена фенилаланина, тирозина. Это может проявляться не только в повышении содержания фенилаланина в крови, но и в выведении его в составе мочи. Активно протекает обмен *цистеина* с образованием *таурина* (антиоксидант). В крови и моче новорожденных повышено содержание *гидроксипролина*, что, видимо, отражает усиленный обмен белка коллагена.

В период новорожденности ребенок наиболее уязвим в смысле развития свободно-радикальных повреждений. Дети рождаются в состоянии, близком к окислительному стрессу. У новорожденных отмечаются более высокие показатели *перекисного окисления липидов* (ПОЛ). Интенсификация ПОЛ мембран клеток у них может быть вызвана прежде всего повышенной гипероксией в момент рождения. Активации ПОЛ способствует повышенное содержание в мембранах клеток новорожденных всех классов липидов, включая полиненасыщенные жирные кислоты, являющиеся основным субстратом для ПОЛ. Увеличивается количество продуктов окислительной модификации белков.

Данные об активности *антиоксидантной системы* (АОС) неоднозначны. АОС новорожденных имеет те же звенья, что и у взрослых, однако относительная доля различных компонентов иная. Для новорожденных детей характерен более низкий уровень большинства антиоксидантов в крови (витамины Е, С,  $\beta$ -каротины, трансферрин, церулоплазмин).

Активность обмена воды и солей у новорожденных детей весьма высока, что определяется их быстрым ростом и состоянием нейроэндокринной регуляции. Общее содержание воды в организме новорожденного составляет 75–80 % от массы тела.

В крови новорожденных детей преобладает *фетальный тип гемоглобина* (HbF), на долю которого приходится 50–80 % его общего содержания. Количество же гемоглобина HbA<sub>1</sub>, характерного для большинства взрослых людей и постепенно заменяющего фетальный гемоглобин, к моменту рождения плода редко превышает 40–50 %. Как уже отмечалось, фетальный гемоглобин оптимально адаптирован к условиям транспорта кислорода от плаценты к тканям развивающегося плода благодаря более высокому сродству к этому газу по сравнению с гемоглобином А. В связи с этим чем выше процентное содержание фетального гемоглобина в крови новорожденного, тем хуже оксигенируются ткани ребенка. Вместе с тем гемоглобин F обладает более высокой чувствительностью к действию других окислителей, способных приводить к образованию метгемоглобина. Содержание метгемоглобина в крови новорожденного значительно выше, чем у взрослых, и может достигать 2 % от общего его содержания.

Пусковым моментом в стимулировании адаптационных процессов новорожденного является резкая активация сразу после рождения гипофизарно-надпочечниковой, гипофизарно-тироидной систем и соматотропной функции гипофиза. Это создает оптимальный фон для проявления компенсаторно-приспособительных реакций. К моменту рождения функции гипофиза по выработке тропных гормонов сформированы.

Быстрое повышение уровня тиротропина после рождения влечет за собой увеличение уровней T<sub>4</sub> и T<sub>3</sub>. Повышение общей и свободной фракций T<sub>4</sub> до максимальных значений наблюдается через 24–48 ч, но увеличение концентрации менее выражено, чем повышение концентрации T<sub>3</sub>, уровень которого возрастает в 3–4 раза по сравнению с уровнем в пуповинной крови уже через 4 ч после рождения. На протяжении последующих 4–6 недель уровень T<sub>4</sub> постепенно снижается. Уровень T<sub>3</sub> продолжает повышаться в течение 2–3 недель, после чего (на 3–12-й неделе) начинается постепенное снижение до показателей, характерных для младенчества.

К моменту рождения система «гипофиз — надпочечники» функционально активна. У новорожденных относительная

масса надпочечников увеличена и составляет  $1/3$  от массы почек (у взрослого  $1/30$ ). В первые дни жизни новорожденный выводит с мочой преимущественно метаболиты материнских гормонов, к 4-му дню жизни экскреция и продукция стероидов существенно снижается, а активация синтеза отмечается к 10-му дню.

Во время родов резко повышается концентрация кортизола как в крови матери, так и в крови ребенка. При этом высок уровень свободного, т. е. не связанного с белками, гормона. Активация выработки кортикостероидов в процессе родов направлена на активацию липолиза, глюконеогенеза, катаболизма белков с целью обеспечения резко возрастающих тканевых энергозатрат. В первые часы и дни жизни количество кортизола у новорожденных снижается вследствие угасания стрессорной реакции, выведения кортизола материнского происхождения, экскреции свободных форм кортизола.

Секреция адреналина мозговым слоем надпочечников резко повышается в первые дни после рождения. Так называемый всплеск катехоламинов, отмечаемый после рождения ребенка, связывают с перенесенным родовым стрессом.

Выработка инсулина  $\beta$ -клетками островковой части поджелудочной железы новорожденных снижена и не связана с уровнем глюкозы в их крови. Инсулин может выводиться с мочой, и его экскреция в первые 5 дней жизни возрастает в 5–6 раз. Глюкагон активно синтезируется тканью поджелудочной железы, и поэтому его содержание в крови сопоставимо с концентрацией у взрослых.

Уже с первых суток жизни система регуляции уровня кальция начинает работать в новом режиме. Уровень паратгормона нарастает с параллельным снижением концентрации кальция, достигая к 48–72-му часу постнатальной жизни нормального или несколько повышенного уровня. Концентрация *кальцитонина* после 1–2 часов жизни начинает расти, достигая максимума к 12 часам. Уровень гормона в этот период новорожденности в крови в 10 раз выше, чем у взрослого человека. Однако чувствительность рецепторов костной ткани к па-

ратгормону у них снижена, что приводит к развитию в период новорожденности переходящей гипокальциемии.

Восстановление нормальной концентрации кальция в крови на 3–4-й день жизни свидетельствует об активном включении нейроэндокринного звена в регуляцию кальциевого обмена.

## **8.4. Особенности обмена веществ у детей грудного возраста**

Чрезвычайно ответственным периодом постнатального развития ребенка является первый год его жизни, в течение которого происходит постепенное становление функции основных физиологических систем и метаболических процессов. Для периода грудного возраста характерно значительное усиление обменных процессов при функциональной незрелости отдельных органов и систем, таких как система пищеварения, дыхания, нервная система. В грудном возрасте необходимо соблюдение строгого соответствия между потребностями развивающегося организма ребенка и реальным потреблением питательных веществ и кислорода.

Распад углеводов в тканях имеет выраженную возрастную динамику. В тканях новорожденного и ребенка первых месяцев жизни сохраняется высокая активность анаэробного окисления глюкозы. С 3–4-го месяца начинает активироваться энергетически эффективный аэробный путь окисления глюкозы. Из путей обмена глюкозы ранее других (с конца первой недели) существенно активизируется пентозофосфатный путь.

С увеличением возраста ребенка изменяется состав тканевых жиров. В течение первого года жизни в составе триацилглицеролов постепенно уменьшается содержание пальмитиновой и пальмитоолеиновой кислот, повышенное в период новорожденности. Одновременно нарастает доля олеиновой и линолевой кислот.

Для грудного возраста характерна чрезвычайно высокая интенсивность белкового обмена. Процессы синтеза белков преобладают над процессами их распада. В связи с этим в растущем организме всегда сохраняется положительный

азотистый баланс — один из важнейших показателей обмена белков. Чем меньше возраст ребенка, тем значительно задержка азота в его организме. Так, до трехмесячного возраста задержка азота составляет около половины от его количества, введенного с пищей, к полугодию снижается до 35 %, а к 9 месяцам — до 33 %.

Существенно изменяются с возрастом энергетические затраты на основной обмен. В грудном возрасте они в 2,5 раза выше, чем у взрослых. В связи с этим для обеспечения энергетических потребностей грудного ребенка на основной обмен необходимы затраты значительно большего количества АТФ в расчете на 1 кг массы тела.

Абсолютная потребность в минеральных веществах с ростом ребенка увеличивается, а относительная (на 1 кг массы тела) уменьшается. Грудные дети, находящиеся на естественном вскармливании, с молоком матери получают весь необходимый набор макро- и микроэлементов.

В период роста детей особо важными являются кальций и фосфор. Суточная потребность в кальции у грудных детей равна 0,36–0,60 г.

Гормоны в грудном возрасте определяют высокую интенсивность роста и развития организма: быстрое нарастание массы и размеров тела, высокую скорость энергетических и анаболических процессов, все повышающуюся двигательную активность.

Созревание и формирование желез внутренней секреции происходит в детском возрасте неравномерно в течение довольно продолжительного времени. Это создает у детей совершенно иной гормональный фон, чем у взрослых.

Из гормональных функций гипофиза в грудном возрасте наиболее активна продукция *соматотропина*.

В период грудного вскармливания у детей начинает интенсивно функционировать щитовидная железа, оказывая большое влияние на развитие организма ребенка, усиливая процессы синтеза нуклеиновых кислот и белков.

Кора надпочечников претерпевает значительные изменения на протяжении первых месяцев жизни ребенка. В ней



постепенно формируются клубочковая, пучковая и сетчатая зоны.

Выявлено, что содержание инсулина в поджелудочной железе в расчете на 1 кг ее массы достигает максимума в шестимесячном возрасте.

## 8.5. Возраст и обмен веществ

На протяжении индивидуального развития наиболее существенные изменения испытывает анаболическая фаза метаболизма и в меньшей степени — катаболическая фаза. По функциональному значению в анаболической фазе метаболизма различают следующие процессы:

- обеспечение роста — увеличение белковой массы органов в период усиленного деления клеток (пролиферации), рост организма в целом;
- формирование функций тканей и защитных механизмов — образование белков для других органов и систем, например синтез белков плазмы крови в печени, синтез иммуноглобулинов, образование ферментов пищеварительного тракта, выделение гормонов в кровеносное русло;
- обеспечение регенерационных (восстановительных) процессов — синтез белков в регенерирующих тканях после травм или неполноценного питания;
- поддержка гомеостаза организма — постоянное восполнение компонентов внутренней среды, разрушающихся в ходе катаболизма.

Все эти процессы ослабевают, хотя и неравномерно, на протяжении индивидуального развития. При этом особенно значительные изменения наблюдаются в обеспечении роста. Наиболее высокими темпами роста отличается внутриутробный период. Например, масса зародыша человека по сравнению с массой зиготы увеличивается в 1 млрд 20 млн раз, а за 20 лет прогрессивного роста человека — не более чем в 20 раз. На протяжении постнатальной жизни происходит дальнейшее падение уровня анаболизма.

На рис. 8.2 показана зависимость скорости роста от возраста. По оси ординат отложена константа роста  $KW$ . Под константой роста понимают интенсивность роста организма в каждый данный естественный период, и изменение константы указывает на изменение условий роста, т. е. качественные изменения активности метаболизма ( $KW = CWt$ , где  $CW$  — относительные скорости роста,  $t$  — возраст). Как видно из рисунка, наиболее резкое увеличение роста наблюдается в течение первого года жизни, от  $KW = 2,14$  до  $KW = 4,28$ . Затем в период от года до четырех лет это значение уменьшается, с девяти лет до подросткового периода темпы роста увеличиваются до  $KW = 1,0-1,5$ . К 18 годам рост практически прекращается, константа падает до 0,48.

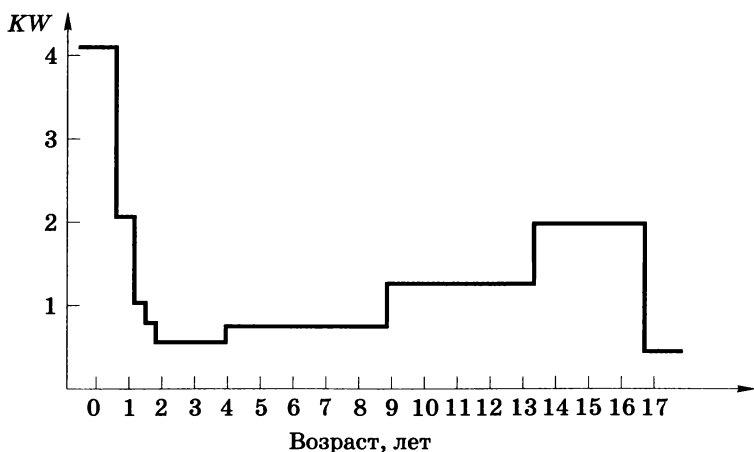


Рис. 8.2. Константы роста в постнатальной жизни человека

Прогрессивная фаза развития характеризуется интенсивным белковым обменом и положительным азотистым балансом. Чем моложе организм, тем выше значение положительного баланса и значительнее способность задерживать азот пищи. С понижением темпов роста снижается и способность к ретенции белкового обмена (рис. 8.3).

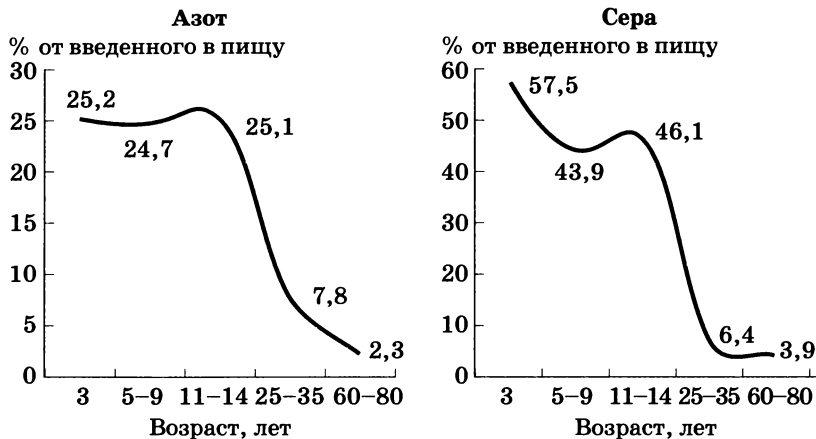


Рис. 8.3. Возрастные особенности удержания азота и серы в организме

Как видно из рис. 8.3, способность удерживать азот и серу у детей высокая, подвержена значительным индивидуальным колебаниям и сохраняется на протяжении всего периода прогрессивного роста. С прекращением роста наблюдается резкое снижение ретенции из пищи азота и серы, что отмечается у взрослых и пожилых людей.

Как правило, взрослым людям не свойственна способность к задержке азота пищи, их метаболизм находится в состоянии азотистого равновесия. Это свидетельствует о том, что потенциальные возможности к белковому синтезу сохраняются длительное время — под влиянием физической нагрузки происходит нарастание массы мышц (положительный азотистый баланс).

В периоды стабильного и регрессивного развития, по достижении максимальной массы тела и прекращении роста, основную роль начинают играть процессы самообновления, происходящие в течение всей жизни и к старости затухающие гораздо медленнее, чем другие виды синтеза. Об интенсивности самообновления можно судить по коэффициенту изнашивания Рубнера, характеризующему те минимальные траты, которые связаны с основными процессами жизнедеятельности при отсутствии белков в пище. Этот показатель рассчитывается по минимальному количеству азота, выделяемого с мочой, при достаточной по калорийности, но безбелковой диете, т.е. по уровню «эндо-

генного» азота мочи. Количество азота мочи при этих условиях снижается с возрастом, причем у мужчин он несколько выше, чем у женщин, но к старости половые различия сглаживаются.

Количество белка в плазме крови новорожденных находится в пределах 41–63 г/л. С возрастом это количество увеличивается, особенно интенсивно нарастая в первые три года, и достигает уровня, характерного для взрослых людей. Следует обратить внимание на более широкие пределы индивидуального колебания уровня белка у детей раннего возраста (от 43 до 83 г/л) по сравнению со взрослыми людьми, у которых эти значения составили 65–85 г/л. Более низкий уровень белка в плазме крови у детей первых месяцев жизни объясняется недостаточной белковосинтезирующей функцией организма. Данные о возрастных особенностях содержания белков и альбуминов в крови лиц, проживающих в Республике Беларусь, представлены в табл. 8.2.

Таблица 8.2

**Зависимость содержания общего белка и альбуминов сыворотки крови мужчин и женщин от возраста**

Возраст, лет	Количество обследованных	Общий белок, г/л	$\pm \sigma/CV, \%$	Альбумины, г/л	$\pm \sigma/CV, \%$
<b>Мужчины</b>					
< 20	245	74,4 ± 0,34*	5,32/7,15	45,1 ± 0,20	3,12/6,92
20–29	247	76,3 ± 0,38*	6,03/7,90	45,7 ± 0,23	3,64/7,96
30–39	757	75,3 ± 0,23	6,20/8,23	45,3 ± 0,12	3,28/7,24
40–49	1856	75,5 ± 0,14	5,89/7,80	44,7 ± 0,08*	3,39/7,58
50–59	1727	75,2 ± 0,15	6,14/8,16	44,1 ± 0,09*	3,61/8,18
60–69	960	74,3 ± 0,21*	6,53/8,79	43,1 ± 0,12*	3,86/8,95
> 70	211	73,6 ± 0,49*	7,07/9,60	41,8 ± 0,29*	4,14/9,90
<b>Женщины</b>					
< 20	256	74,7 ± 0,33	5,24/7,01	45,0 ± 0,20*	3,19/7,09
20–29	235	74,7 ± 0,37	5,65/7,56	44,6 ± 0,21	3,33/7,47
30–39	593	75,0 ± 0,25	6,02/8,03	44,2 ± 0,13	3,07/6,94
40–49	1368	74,2 ± 0,15*	5,67/7,64	43,7 ± 0,09*	3,41/7,80
50–59	2037	74,9 ± 0,13	5,78/7,72	43,7 ± 0,07*	3,37/7,71
60–69	1415	74,4 ± 0,15*	5,70/7,66	43,1 ± 0,09*	3,48/8,07
> 70	395	73,8 ± 0,33*	6,57/8,90	41,8 ± 0,21*	4,17/9,98

\*  $P < 0,05$  при сравнении с группой 30–39 лет.

Установлено, что содержание общего белка уменьшается у мужчин в возрастных группах менее 20 лет и более 60 лет по сравнению с принятой за стандарт возрастной группой 30–39 лет. Следует отметить повышенную вариабельность изученных показателей, хотя количество определений в каждой возрастной группе довольно большое.

У женщин возрастная динамика содержания общего белка и альбуминов аналогична таковой у мужчин. Некоторые различия касаются лишь первых двух возрастных групп. Значения коэффициента вариабельности для изученных показателей сыворотки крови женщин также несколько превышают рекомендуемые границы. Содержание общего белка и альбуминов соответствует среднеевропейским нормам.

Содержание альбуминов в сыворотке крови мужчин и женщин уменьшается начиная с 40 лет (рис. 8.4). Содержание альбуминов в крови новорожденных составляет 38–42 г/л, к трем годам приближается к норме взрослого человека.

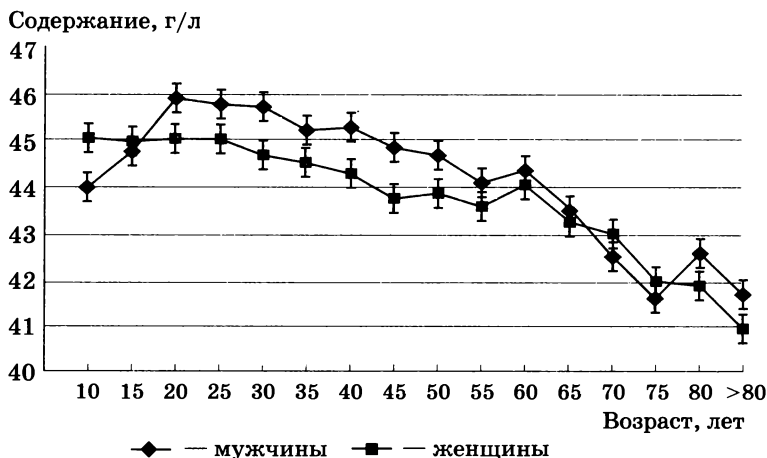


Рис. 8.4. Возрастная и половая динамика количественного содержания альбумина в сыворотке крови

Содержание  $\beta$ -глобулинов достигает уровня, характерного для взрослых, после семи лет. Начиная с подросткового периода содержание  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулинов имеет тенденцию к повышению (рис. 8.5 и 8.6).

Количество  $\gamma$ -глобулинов, высокое в первые дни после рождения за счет глобулинов материнской плазмы, постепенно снижается, а затем к трем годам достигает нормы взрослого человека (17,4 г/л).

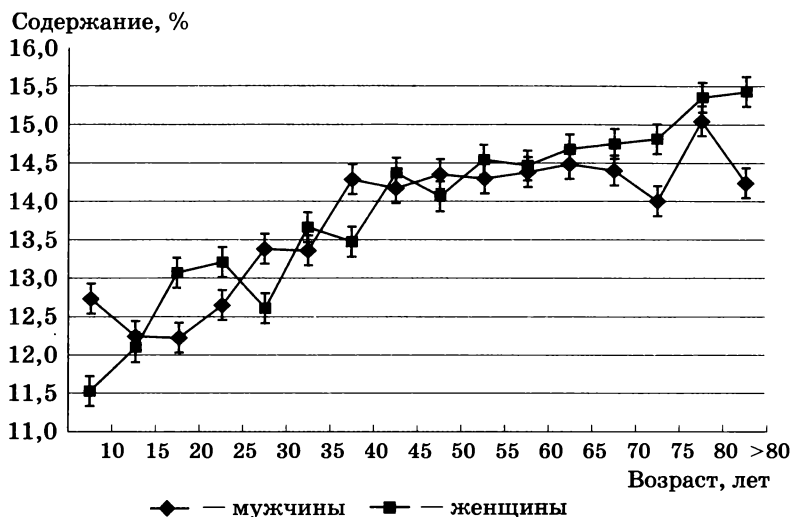


Рис. 8.5. Возрастная и половая динамика содержания  $\beta$ -глобулинов в сыворотке крови

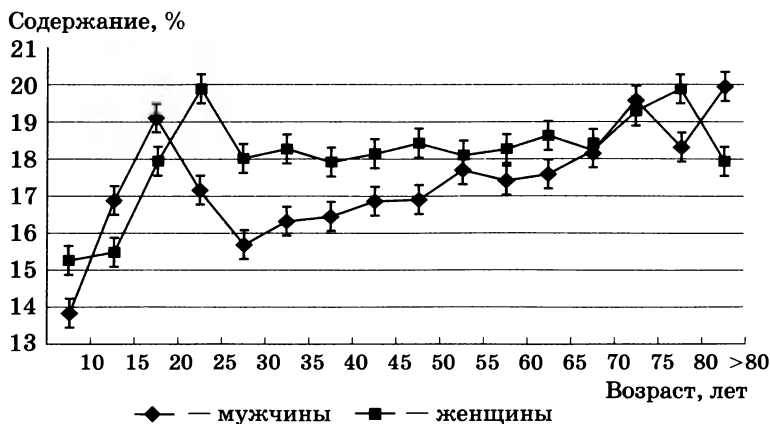


Рис. 8.6. Возрастная и половая динамика относительного содержания  $\gamma$ -глобулинов в сыворотке крови

Содержание  $\alpha 1$ -глобулинов у детей до года повышено, к трем годам уровень их в крови нормализуется. Несколько иначе протекает установление концентрации  $\alpha 2$ -глобулинов. В первые полгода уровень их повышен, к семи годам он постепенно снижается, а затем достигает уровня, характерного для взрослых.

Если для белковых фракций  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -глобулинов характерно небольшое увеличение относительного содержания у людей старших возрастных групп, то этот эффект для  $\beta$ -глобулинов совершенно очевиден (см. рис. 8.5). Имеется очевидная отрицательная корреляционная зависимость между динамикой относительного содержания альбуминов и  $\beta$ -глобулинов. Увеличение концентрации  $\beta$ -глобулинов связано, вероятно, с необходимостью транспорта гидрофобных липидов, накапливающихся с возрастом в тканях и крови. Содержание  $\gamma$ -глобулинов увеличено в возрасте 15–25 лет и затем увеличивается у пожилых людей.

Таким образом, белковый состав крови в течение онтогенеза претерпевает ряд изменений: от момента рождения до зрелости происходит увеличение содержания белков в крови, устанавливаются определенные соотношения в белковых фракциях. Функциональные возможности синтезирующих белки плазмы органов, прежде всего печени, относительно низки в момент рождения и постепенно усиливаются, что приводит к нормализации состава крови.

К 14 годам показатели содержания фракций липопротеинов в сыворотке крови приближаются к нормам взрослого человека, а концентрация глюкозы соответствует концентрации, характерной для взрослого человека, к 5–6 годам.

На рис. 8.7 показано, что в интервале 15–80 лет относительное содержание  $\alpha$ -липопротеинов (ЛЛВП) выше в сыворотке крови женщин по сравнению с мужчинами. Исключением являются возрастные периоды 20–25 и 60–65 лет.

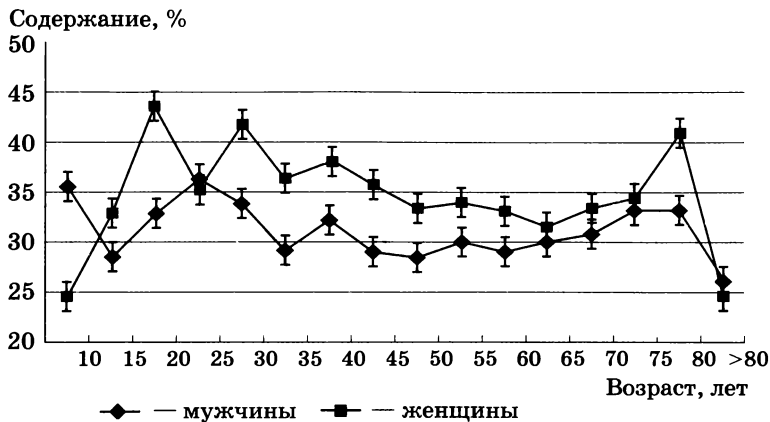


Рис. 8.7. Относительное содержание α-липопротеинов в зависимости от возраста

Поскольку α-липопротеины обеспечивают антиатерогенный потенциал сыворотки крови, можно полагать, что женщины северо-восточного региона Республики Беларусь должны в меньшей степени, чем мужчины, страдать от заболеваний атерогенной природы. Этот вывод подтверждается исследованием относительного содержания пре-β-липопротеинов (рис. 8.8).

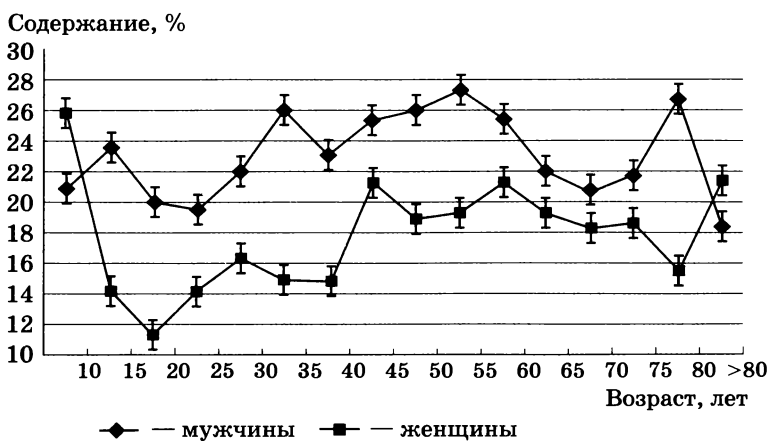


Рис. 8.8. Относительное содержание пре-β-липопротеинов в зависимости от возраста



Оказалось, что в интервале 15–80 лет относительное содержание пре- $\beta$ -липопротеинов (ЛПОНП) в сыворотке крови мужчин существенно выше, чем у женщин.

Наиболее атерогенными являются  $\beta$ -липопротеины (ЛПНП). На рис. 8.9 представлены данные, показывающие, что изменения относительного содержания этого класса липопротеинов не подчиняются общей закономерности.

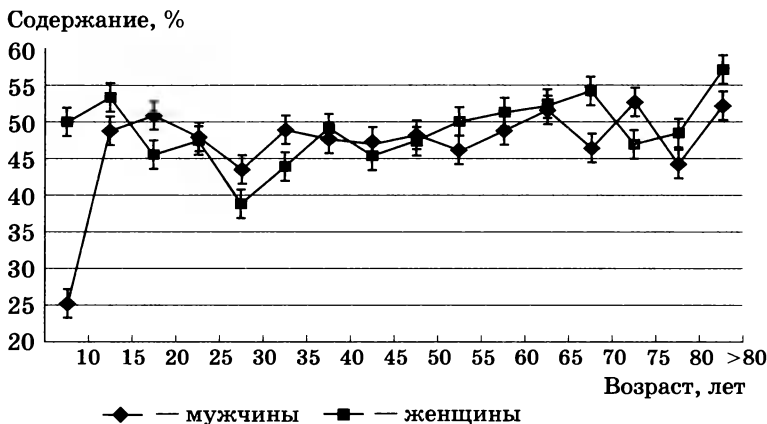


Рис. 8.9. Относительное содержание  $\beta$ -липопротеинов в сыворотке крови в зависимости от возраста

Можно лишь отметить, что относительное содержание  $\beta$ -липопротеинов в сыворотке крови выше у мужчин, чем у женщин, в возрастных интервалах 15–20, 25–35 и 70–75 лет, а для женщин аналогичный эффект характерен в более старших возрастных группах — 50–60, 65–70 и старше 75 лет. Такие изменения могут объяснять причину большей заболеваемости атеросклеротическими болезнями мужчин до 35 лет по сравнению с женщинами и уравниванием риска заболеть между мужчинами и женщинами старше 50 лет [14].

С возрастом изменяется жировой и углеводный обмен. В процессах роста и дифференцировки жиры играют существенную роль. Особенно важны жироподобные вещества: они необходимы для морфологического и функционального созревания нервной системы, образования всех видов клеточных мембран.

Поэтому потребность в них в детском возрасте велика. На рис. 8.10 показана потребность в жире на 1 кг массы тела.

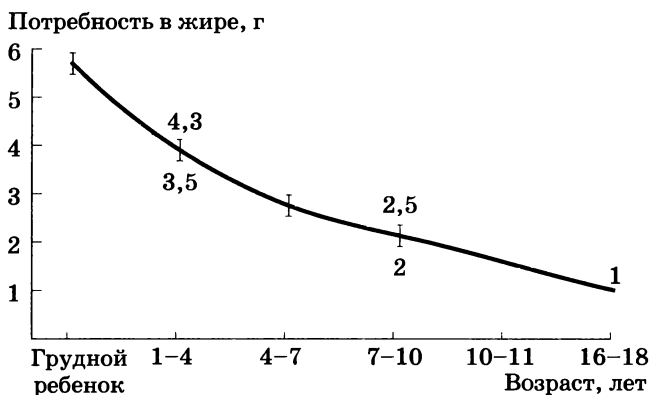


Рис. 8.10. Потребность в жире на килограмм массы тела в зависимости от возраста

Оказывается, потребность в жире тем выше, чем меньше возраст ребенка. С возрастом также увеличивается абсолютное количество жира, необходимое для нормального развития ребенка. От года до трех лет необходимо 32,7 г, 4-7 лет — 39,2 г, 8-13 лет — 38,4 г в сутки.

При высокой интенсивности окисления жирных кислот и их утилизации в пластических процессах в теле детей отложение жира невелико: жировые депо у них быстро истощаются при недостатке углеводов в пище. Интенсивность синтеза в значительной мере зависит от характера питания. Так, скорость синтеза жирных кислот микросомами печени у крысят после рождения постепенно увеличивалось на протяжении всего периода кормления материнским молоком, после отъема от матери скорость снижалась и вновь повышалась уже до уровня, характерного для взрослых животных, после перевода крысят на обычный корм.

Фазы стабильного и регрессивного развития характеризуются своеобразной переориентацией анаболических процессов: переключением анаболизма с синтеза белков на синтез жиров, что составляет одну из характерных черт возрастных изменений метаболизма при старении.

В основе возрастной переориентации анаболизма в сторону накопления жира в ряде органов лежат:

- фундаментальная особенность метаболизма, согласно которой аминокислоты и глюкоза легко превращаются в жирные кислоты, а обратный процесс либо затруднен, либо практически невозможен;
- понижение способности тканей к окислению жира, вследствие чего при неизменной и даже пониженной скорости синтеза жирных кислот организм обогащается жирами (так, наблюдалось развитие ожирения даже при 1–2-разовом питании).

В переориентации процессов синтеза помимо факторов питания и нервной регуляции большое значение имеет изменение гормонального спектра, в частности изменения в скорости образования соматотропного гормона, кортикотропина, гормонов щитовидной железы, инсулина, стероидных гормонов.

На рис. 8.11 приведены данные об изменениях содержания общего холестерина сыворотки (ОХС) крови в зависимости от возраста и пола.

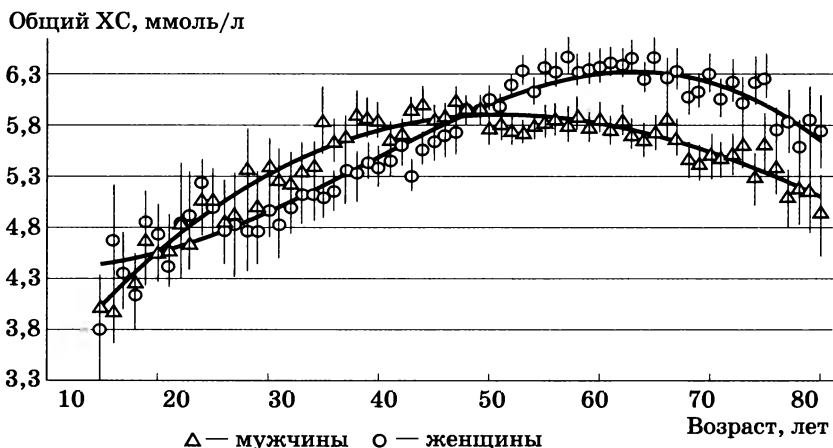


Рис. 8.11. Зависимость изменений общего холестерина от возраста и пола

Установлено, что содержание холестерина у мужчин изменяется по близкой к гиперболе зависимости, а у женщин — по S-образной зависимости. Такие изменения формируют два воз-

растных интервала с достоверными различиями в содержании ОХС в сыворотке крови мужчин и женщин: в 20–50 лет уровень ОХС выше у мужчин, старше 50 лет — у женщин. Таким образом, на фоне общего возрастного накопления холестерина в кровеносном русле имеются половые различия, что, очевидно, и определяет вероятность для мужчин заболеть холестеринзависимыми заболеваниями на 20 лет раньше, чем для женщин.

Первым по значимости классом липопротеинов, определяющим противоатеросклеротическое действие, являются липопротеины высокой плотности. Сведения о зависимости содержания холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) от возраста и пола представлены на рис. 8.12.

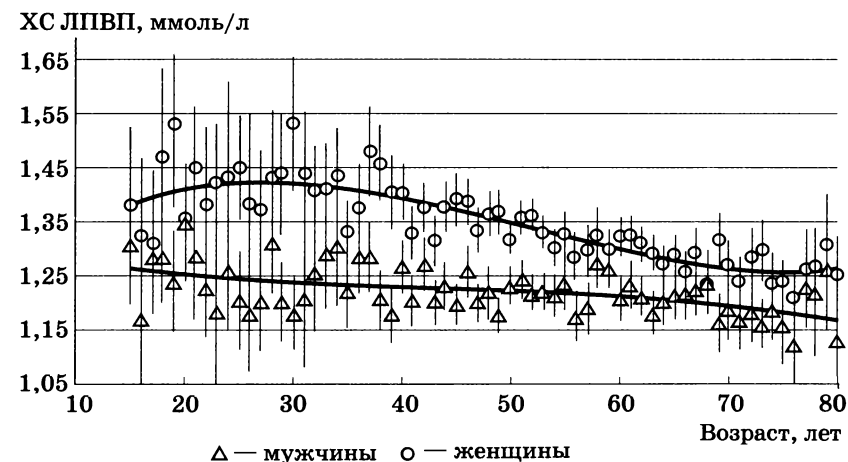


Рис. 8.12. Зависимость концентрации холестерина ЛПВП от возраста и пола

Анализ данных, приведенных на рис. 8.12, показал:

- тренд ХС ЛПВП у женщин лежит выше тренда ХС ЛПВП у мужчин в среднем на 1 ммоль/л;
- общая динамика трендов — снижение концентрации ХС ЛПВП с возрастом, что соответствует данным, полученным методом электрофореза (см. рис. 8.7 в интервале 20–65 лет);
- у женщин в оптимальном детородном возрасте (20–45 лет) концентрация ХС ЛПВП превышает исходные значения (де-

вочки 15 лет). Очевидно, что этот эффект связан с функционированием эстрогенов, одного из ведущих компонентов биохимического фона повышенной неспецифической резистентности организма женщин, способных рожать.

На рис. 8.13 приведены данные о возрастных и половых различиях в концентрации триацилглицеролов (ТГ). Из анализа этого рисунка следует, что возрастная динамика изменений содержания ТГ у мужчин и женщин напоминает таковые изменения концентрации ОХС. Однако существуют количественные отличия:

- имеются две точки пересечения трендов ТГ мужчин и женщин — 16 и 60 лет;
- только в интервале от 55 до 60 лет содержание ТГ совпадает у мужчин и женщин;
- до 55 лет концентрация ТГ выше у мужчин, а после 65 лет — у женщин.

Обращает на себя внимание тот факт, что половые различия в концентрации ТГ достоверны.

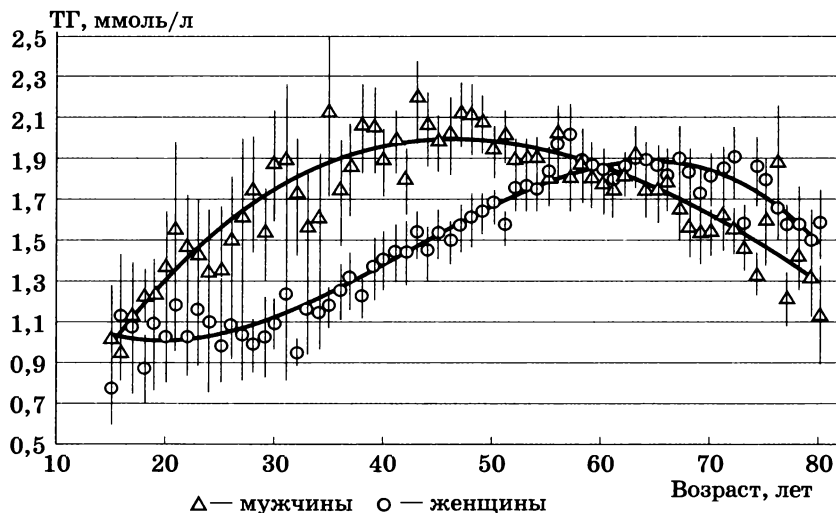


Рис. 8.13. Зависимость содержания ТГ от возраста и пола

Установлено, что возрастная и половая динамика нормальных значений содержания общего холестерина и ТГ близка у

пациентов липидных клиник США (ЛК США) и Республики Беларусь (РЛЛДЦ) (рис. 8.14 и 8.15). Это позволяет утверждать, что в онтогенезе человека происходит перманентное накопление липидов в организме на протяжении 15–55 лет.

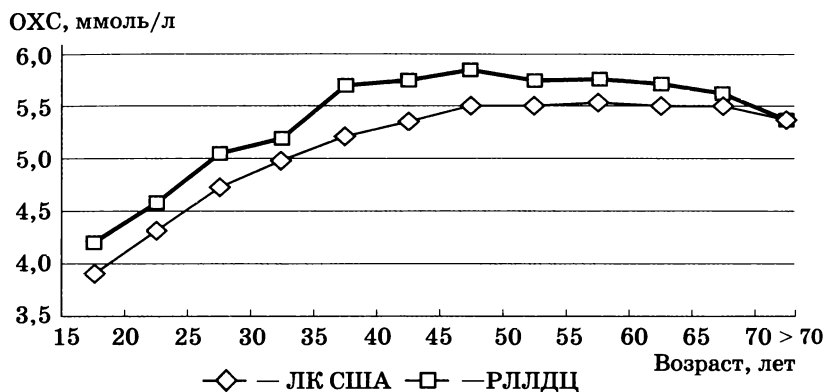


Рис. 8.14. Сравнительный анализ концентраций ОХС у мужчин

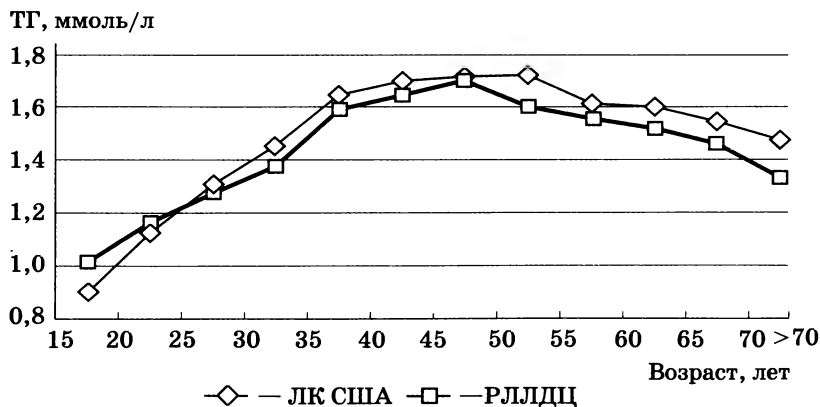


Рис. 8.15. Сравнительный анализ концентраций ТГ у мужчин

При анализе базы данных (20052 человека) произведено исследование зависимости индекса атерогенности (ИА) А.Н. Климова от возраста и пола (рис. 8.16). Индекс атерогенности рассчитывается по формуле

## ОХС — ХС ЛПВП

## ХС ЛПВП

и позволяет характеризовать степень риска развития атеросклероза за счет накопления атерогенных ЛПНП и уменьшения антиатерогенных ЛПВП.

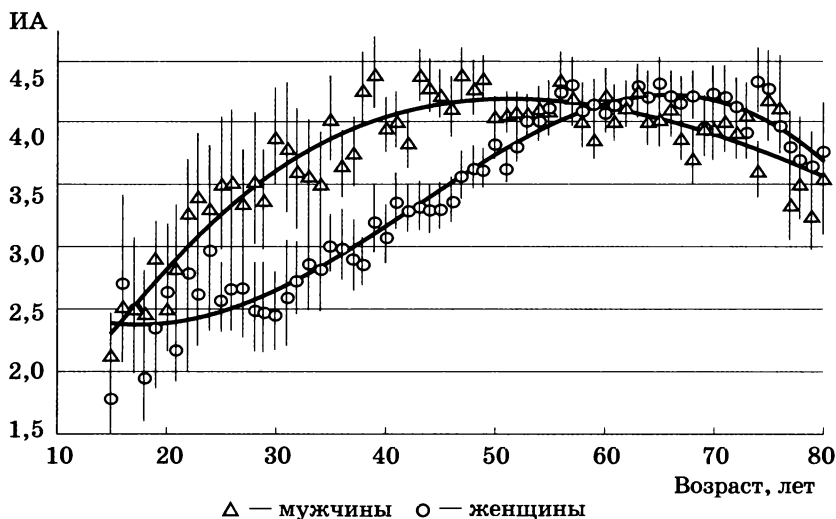


Рис. 8.16. Зависимость индекса атерогенности от возраста

Установлено, что с возрастом ИА нарастает, но после максимума у мужчин в 53 года, у женщин в 67 лет показатель снижается. У мужчин прирост ИА достоверно превышает увеличение показателя у женщин в интервале 25–50 лет. В возрасте 60 лет тренды показателя у мужчин и женщин перекрещиваются, и затем в интервале 65–75 лет наблюдается более выраженное уменьшение ИА у мужчин. Такая картина характерна для людей современного общества. Однако, выявленная закономерность онтогенеза транспорта липидов в крови демонстрирует эволюционно отобранную и биологически целесообразную большую защищенность женского организма в детородном периоде по сравнению с мужским в связи с необходимостью воспроизведения себе подобного.

С возрастом перестраивается углеводный обмен. У детей обмен углеводов происходит с большей интенсивностью, что

объясняется высоким уровнем обмена веществ. В детском возрасте углеводы выполняют не только энергетическую, но и пластическую функцию, формируя вещества соединительной ткани и гликокаликс мембран. Суточная потребность в углеводах у детей высокая и составляет в грудном возрасте 10–12 г на 1 кг массы тела. В возрасте 8–9 лет она возрастает до 12–15 г на 1 кг массы тела. С года до трех лет ребенку в сутки необходимо получать с пищей около 193 г углеводов, в 4–7 лет — 287 г, в 9–13 лет — 370 г, в 14–17 лет — 470 г и взрослым — 500 г.

Углеводы усваиваются детским организмом лучше, чем организмом взрослого. Одним из существенных показателей возрастных изменений углеводного обмена является нарушение толерантности к глюкозе. Например, у взрослых глюкоза появляется в моче, если она поступает в количестве 2,5–3 г на 1 кг массы тела, в то время как у детей это происходит лишь при поступлении 8–12 г глюкозы на 1 кг веса.

В фазе прогрессивного роста вода участвует в процессах формирования массы тела. Известно, например, что из суточной прибавки массы тела в 25 г на долю  $H_2O$  приходится 18 г, белка — 3 г, жира — 3 г и минеральных солей — 1 г. Чем моложе организм, тем больше суточная потребность в  $H_2O$ . В первые полгода жизни потребность ребенка в  $H_2O$  достигает 110–125 г на 1 кг веса, к 2 годам она снижается до 115–136 г, в 6 лет — 90–100 г, 18 лет — 40–50 г. Дети способны быстро терять и так же быстро депонировать воду.

Общей закономерностью индивидуального развития является возрастная дегидратация организма, уменьшение воды во всех тканях. С возрастом происходит перераспределение воды в тканях — увеличивается объем воды в межклеточных пространствах и уменьшается объем внутриклеточной воды.

Баланс многих минеральных веществ зависит от возраста. В молодости содержание большинства неорганических солей меньше, чем в старшем возрасте. Особое значение имеет обмен Са и Р. Повышенные требования к поступлению этих элементов у детей до года объясняются усиленным образованием костной ткани. В скелете взрослого человека ежегодно обменивается до 18 % общего содержания кальция. В костях скеле-



та ежедневно обменивается 0,5 мг кальция. Скорость потери массы кости зависит от возраста и пола. Для женщин после 35 лет она составляет 0,75–2,5 % в год, после менопаузы — 3–4 % в год. После 80 лет женщина может потерять 30 % кортикальной кости и 50 % трабекулярной. У мужчин потери костной ткани начинаются с 50 лет и составляют 0,4–1,2 % в год. После 80 лет у мужчин компактная костная ткань уменьшается до 20 %, а губчатая — до 35 %. При старческом остеопорозе кость содержит много незаполненных гаверсовых систем, где не обнаруживается активность остеобластов.

В онтогенезе эндокринной регуляции с возрастом могут изменяться:

- уровень и качество инкреторной функции желез как следствие их собственного старения;
- коррелятивные соотношения между отдельными железами;
- нервная регуляция функции эндокринных желез;
- восприимчивость тканей, их чувствительность и реактивность.

Секреция кортикостероидов корковым слоем надпочечников возникает в эмбриогенезе сравнительно рано — на 7–8-й неделе внутриутробного развития. Общий уровень выработки кортикостероидов нарастает сначала медленно, затем быстро, достигая максимума в 20 лет, а затем падает к старости. При этом быстрее всего к старости уменьшается выработка минералокортикоидов, несколько медленнее — андростероидов и еще медленнее — глюкокортикоидов. Адреналин и норадреналин появляются в мозговом веществе надпочечников очень рано. Уже при рождении уровень инкреции адреналина в надпочечниках сопоставим с уровнем, характерным для взрослого человека.

Инсулиновый аппарат поджелудочной железы развивается очень рано. С возрастом увеличивается общее количество островков Лангерганса, но при пересчете на единицу массы их количество, наоборот, значительно снижается по мере старения. Было также отмечено возрастное уменьшение гормона в эндокринной железе.

На рис. 8.17 показан средний уровень содержания в крови инсулина и глюкозы.

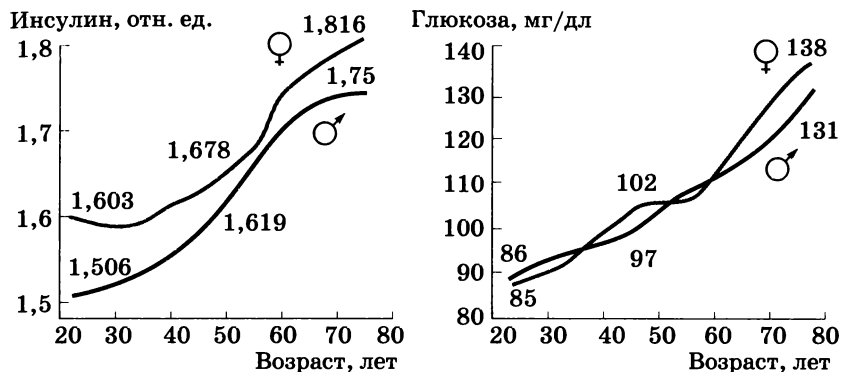


Рис. 8.17. Средний уровень содержания в крови человека инсулина и глюкозы

Как видно из рисунка, содержание инсулина с возрастом несколько повышается, но недостаточно для снижения уровня сахара в крови, что говорит о подавлении инсулиновой функции в позднем онтогенезе (развитие инсулинорезистентности рецепторов). Это подтверждается и в опытах на животных.

О некоторой инсулиновой недостаточности в старости свидетельствуют и данные исследований при одинарной и двойной сахарной нагрузке, установивших высокую толерантность молодых и зрелых индивидуумов (в пределах от 5- до 50-летнего возраста). На рис. 8.18 показана выраженность гипергликемии и скорость ее устранения при двойной глюкозной нагрузке у людей разного возраста.

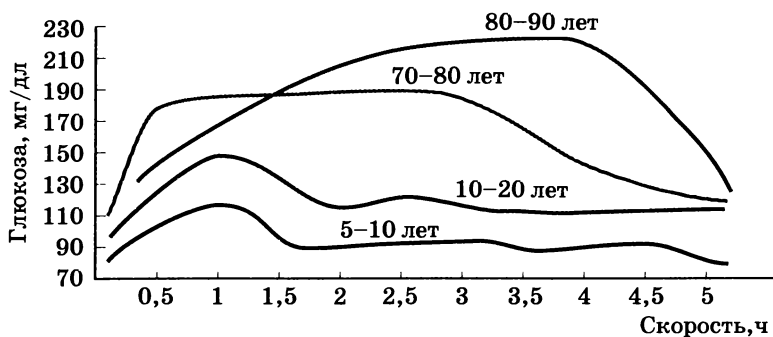


Рис. 8.18. Выраженность гипергликемии и скорость ее устранения при двойной глюкозной нагрузке у людей разного возраста

Очевидна высокая толерантность к сахарным нагрузкам детей и юношей, которая несколько снижается в зрелом возрасте и очень существенно — в старости.

Количество половых гормонов, обнаруживаемых в крови, очень низкое в первые дни жизни, и постепенно увеличивается, ускоряя темпы развития, особенно в период второго периода детства (8–12 лет у мальчиков и 8–11 лет у девочек), подростковом (13–16 лет — мальчики, 12–15 лет — девочки) и юношеском (17–21 год — юноши, 16–20 лет — девушки). В данных возрастных периодах деятельность половых желез имеет важное значение для темпов роста, формообразования и интенсивности протекания обмена веществ, т. е. может выступать в роли ведущего фактора развития.

У человека химический состав крови отличается значительным постоянством. Наибольшие отклонения, если за норму принять содержание веществ в крови взрослых людей, можно отметить в период новорожденности и в старческом возрасте.

Большой интерес представляет зависимость метаболических показателей от массы тела в процессе онтогенеза. База данных, включающая сведения о 20 052 пациентах, была проанализирована путем поиска парных взаимозависимых изменений каждого из изученных показателей от возраста, пола и индекса массы тела (индекса Кетле). В качестве примера исследована активность  $\gamma$ -глутамилтрансферазы (ГГТ) в плазме крови (рис. 8.19).

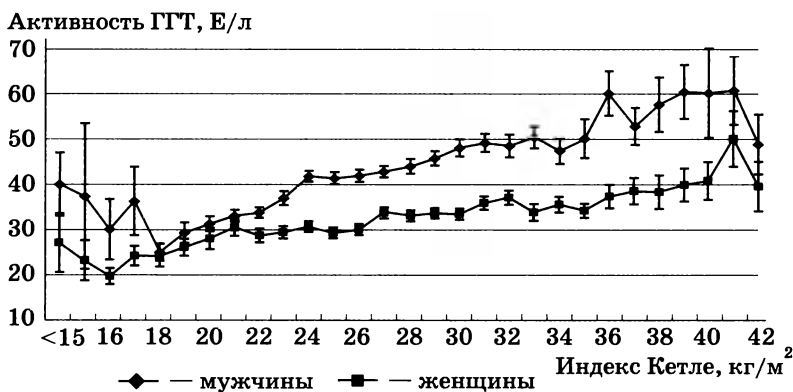


Рис. 8.19. Активность ГГТ в зависимости от индекса массы тела

Начиная с индекса массы тела  $23 \text{ кг/м}^2$ , активность ГГТ в сыворотке крови у мужчин выше, чем у женщин. Во всех возрастных периодах активность ГГТ в сыворотке крови ниже у женщин, чем у мужчин. У мужчин максимальная активность фермента обнаружена в возрасте 40–49 лет (предклимактерический период), у женщин — в возрасте 50–69 лет (постклимактерический период). Имеется прямая пропорциональная зависимость между массой тела и не только активностью ГГТ, но и активностью аланин-аминотрансферазы и аспартат-аминотрансферазы.

## 8.6. Биохимия старения

Старческие изменения становятся очевидными и нарастают в пострепродуктивном периоде онтогенеза. Различают хронологический и биологический (физиологический) возраст. Согласно современной классификации, основанной на оценке многих средних показателей состояния организма людей, хронологический возраст которых достиг 60–74 лет, называют пожилыми, 75–89 лет, — старыми, свыше 90 лет, — долгожителями. Точное определение биологического возраста затруднено тем, что отдельные признаки старости проявляются в разном хронологическом возрасте и характеризуются различной скоростью нарастания.

Состояние старости достигается по причине изменений, составляющих содержание процесса старения. Этот процесс захватывает все уровни структурной организации особи: молекулярный, субклеточный, клеточный, тканевый, органный. Суммарный результат многочисленных частных проявлений старения на уровне целостного организма заключается в нарастающем с возрастом снижении жизнеспособности особи, уменьшении эффективности приспособительных, гомеостатических механизмов. Показано, например, что молодые крысы после погружения в ледяную воду на 3 мин восстанавливают температуру тела примерно за час. Животным среднего возраста на это требуется 1,5 ч, а старым — около 2 ч.

Изменение гормонального профиля людей в связи с угасанием репродуктивной функции носит сложный характер.

С возрастом снижается концентрация у мужчин *тестостерона*, а у женщин — *эстрадиола* и *прогестерона*. Эти сдвиги сопровождаются повышением секреции эстрадиола и прогестерона у мужчин и тестостерона — у женщин. Вместе с тем содержание *фолликулостимулирующего гормона* у 80–90-летних женщин выше в 14 раз, а *лютеинизирующего гормона* — в 5 раз, чем у 20–30-летних. Резко нарушено у старых людей соотношение названных гормонов гипофиза, что является важной причиной нарушения репродуктивной функции в целом. Картина усложняется тем, что в процессе старения изменяется ответ ткани на половые гормоны в связи с сокращением количества клеточных рецепторов к ним, а также с возрастным прогрессированием нарушений пострецепторного сигналинга.

Обнаружено, что к старости падает содержание в крови *трийодтиронина* и *тироксина*. В связи с изменением белков плазмы крови ухудшается перенос гормонов к тканям, в клетках уменьшается количество рецепторов, узнающих гормоны, а чувствительность рецепторов повышается. Вместе с тем в крови сохраняется довольно высокая концентрация *тиротропина*, чувствительность к нему клеток щитовидной железы возрастает. Из данной картины видно, что в отдельных звеньях цепи регуляции жизненно важных функций гормонами щитовидной железы возрастные изменения не одинаковы по масштабу, а иногда и разнонаправленны. В таком случае важен общий результат, степень выраженности которого подвержена индивидуальным колебаниям.

Одна из черт процесса старения заключается в снижении надежности механизмов регуляции, направленных на поддержание постоянства жизненно важных параметров внутренней среды организма — *гомеостаза*. Причину этого видят в функциональных изменениях стареющего гипоталамуса, с которым связывают действие своеобразных биологических часов старения всего организма. К гипоталамической области головного мозга человека относятся 32 пары ядер, участвующих в регуляции важнейших вегетативных функций. В целом процесс старения гипоталамических структур характеризуется нерав-

номерностью и разнонаправленностью, что типично и для других областей нервной системы.

В старости наблюдается снижение функций практически всех органов чувств. Заметно изменяются также функции иммунной системы.

## 8.7. Проявление старения на молекулярном, субклеточном и клеточном уровнях

Молекулярные и клеточные проявления старения многообразны. Они заключаются в изменении показателей потоков информации и энергии и состояния ультраструктур дифференцированных клеток, а также в снижении интенсивности клеточной пролиферации.

### 8.7.1. Возраст и частота мутаций

Среди современных теорий старения первое место занимает теория *соматических мутаций*, согласно которой старение является результатом взаимодействия различных эндогенных и экзогенных повреждающих агентов с генетическим материалом клетки и постепенного накопления случайных мутаций в геноме соматических клеток. Повреждения ядерной и митохондриальной ДНК соматических клеток (точечные мутации, делеции и транслокации) приводят к активации или инактивации специфических генов, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла и контроль роста. Известно, что в течение суток на одну клетку приходится 12000–14000 депуринизаций, 600–700 депиримидинизаций, 55000 однонитевых разрывов ДНК, 9 двунитевых разрывов ДНК, 8 межнитевых перекрестных сшивок в молекуле ДНК. Накопление с возрастом таких мутаций в различных органах и тканях является основным фактором, определяющим развитие возрастной патологии, включая рак.

Ежесекундно в геноме возникает как минимум одно повреждение. Поэтому важной является *система репарации* таких повреждений, интенсивность деятельности которой могла бы с возрастом уменьшаться. Однако такое предположение подтвердилось лишь частично: уровень репарации поврежде-

ния ДНК ультрафиолетовым облучением эмбриональных фибробластов трех линий мышей оказался пропорциональным средней продолжительности их жизни (900, 600 и 300 суток). Исследование функциональных особенностей хромосом при старении показало, что снижение интенсивности репарации ДНК и повышение частоты мутаций в глубокой старости являются вторичными по отношению к гетерохроматинизации (конденсации эухроматических и гетерохроматических районов хромосом). Частота мутаций увеличивается с возрастом во многих тканях, однако степень этого увеличения существенно изменяется. Наибольшая частота мутаций отмечена в клетках тонкой кишки и мочевого пузыря старых мышей. Важно отметить, что степень возрастного увеличения частоты спонтанных мутаций не коррелирует с пролиферативной активностью тканей. Так, относительно мало мутаций накапливается в коже и яичках, которые содержат быстропролиферирующие клетки, тогда как в сердце и печени, состоящих из непролиферирующих или малопролиферирующих клеток, скорость их накопления довольно значительна. Наибольшая интенсивность возникновения спонтанных хромосомных повреждений наблюдается в молодом возрасте, а по мере старения темп спонтанного мутагенеза снижается. Было установлено, что в нормальных тканях человека накапливаются клонально распространяющиеся мутации митохондриальной ДНК (мтДНК) [11], [15], [16].

### 8.7.2. Изменение структуры и функции генов при старении

Вторым по значимости процессом может быть выраженность *транскрипционной активности*. При старении могут изменяться не только структура генов, но и направление их функционирования. С возрастом в соматических клетках накапливаются не только мутации, но и хромосомные перестройки. Полагают, что изменения хроматина могут играть главную роль в связанных с возрастом изменениях регуляции экспрессии генов. Не отмечено изменений с увеличением возраста стехиометрии большинства гистонов, однако имеются сообщения об изме-

нениях подвида гистона H1. Ацетилирование гистонов, которое, предположительно, изменяет взаимодействие «гистон — ДНК» и делает ДНК более доступной, снижается по мере старения на 30–70 %. Важную роль в увеличении продолжительности жизни, как это показано в опытах на дрожжах и *C. elegans*, играют деацетилазы гистонов, в частности SIR2 и RPD3.

Транскрипционная активность клетки при старении организма снижается. Однако уровень общей РНК остается постоянным за счет снижения скорости обновления РНК. В большинстве исследований была найдена хорошая корреляция между связанными с возрастом изменениями уровней видов мРНК и уровнем белка (или энзиматической активностью), обусловленным различными видами мРНК. Это было показано на печени крыс в отношении альбумина,  $\alpha$ 2-глобулина, супероксиддисмутазы и каталазы. Связанное с возрастом уменьшение индукции митогенами мРНК интерлейкина 2 (ИЛ-2) в лимфоцитах грызунов и человека соответствует возрастному снижению биологической активности этого цитокина. Так, у мышей интенсивность синтеза РНК в ядрах печеночных и нервных клеток между 12-м и 30-м месяцами жизни уменьшается на 50 %. В стареющем организме действительно наблюдается исчезновение в клетках определенных типов мРНК, но в то же время регистрируется появление некоторых типов мРНК, не образывавшихся ранее. Было показано, что с изменением скорости снижения транскрипции сокращается максимально достигаемая животными продолжительность жизни. С возрастом отмечается снижение содержания в хроматине негистоновых белков, что может влиять на механизмы транскрипции ДНК.

Результаты гено- и фенотипического анализа свидетельствуют о том, что хроническое голодание увеличивает продолжительность жизни червей, мух-дрозофил и мышей посредством подавления синтеза фактора транскрипции TOR. Посредуемый TOR механизм регулирует процессы аутофагии и трансляции. Фактор транскрипции РНА-4 необходим для аутофагии и влияет на экспрессию генов стресс-реакции в условиях голодания. Его влияние на трансляцию не изучено. У дрозофил снижение активности TOR улучшает клеточное



дыхание за счет предотвращения трансляционного ингибирования компонентов цепи переноса электронов. Посредством активации фактора транскрипции SKN-1 в нейронах хроническое голодание также стимулирует клеточное дыхание у *C. elegans* и, соответственно, продлевает им жизнь. Хроническое голодание продлевает жизнь дрозофил и мышей (по крайней мере, частично) и за счет подавления активности опосредуемого инсулином и IGF-1 сигнального механизма. Белки *сиртуины* также участвуют в реализации эффекта голодания, однако их роль в сигнальных механизмах, опосредуемых TOR, инсулином и IGF-1, не изучена.

Изменение трансляции в процессе старения изучают по содержанию рРНК (показатель общей белокобразующей способности клетки), мРНК (набор образуемых белков) и активности аминоксил-тРНК-синтетаз (ферменты активации аминокислот). Оказалось, что в возрасте от 12 до 70 лет у людей *утрачивается до половины генов рРНК*, относящихся к умеренно часто повторяющимся нуклеотидным последовательностям, которые продублированы в геноме более 300 раз. Сохраняющееся число генов, по-видимому, способно обеспечить образование требуемого количества рРНК. Интенсивность белкового синтеза в зрелом возрасте в целом снижается [11], [15], [16].

### 8.7.3. Гликозилирование белков и ДНК

Нуклеиновые кислоты и белки могут быть модифицированы с помощью добавления сахаров к их свободным аминогруппам, что ведет к структурной и функциональной перестройке молекул. Интерес к реакции между глюкозой и белками, известной как реакция Мейяра [1], [11], значительно вырос после того, как стало очевидно, что глюкоза способна ковалентно, без участия ферментов, модифицировать белки в условиях *in vivo*. Процесс неферментативного гликозилирования включает несколько этапов: связывание глюкозы со свободными аминогруппами с образованием оснований Шиффа, их превращение в более стабильные продукты Амадори и затем в конечные продукты глубокого гликозилирования (advanced glycosylation endproducts (AGE)). Конечные продукты реакции Мейяра

труднорастворимы, устойчивы к протеолитическому расщеплению, весьма активны химически, способны образовывать внутримолекулярные сшивки (например, в коллагене) и ковалентно связывать белки (например, ЛПНП, IgG), а также некоторые другие вещества, имеющие свободные аминогруппы (ДНК, некоторые липиды), химически инактивировать оксид азота (NO).

Была выявлена группа мембранных белков, принадлежащих к суперсемейству иммуноглобулинов, которые выполняют функцию рецепторов для глубокогликозилированных молекул. AGE-рецепторы обнаружены на фибробластах, Т-лимфоцитах, в почках (мезангиальные клетки), стенках сосудов (эндотелий и гладкомышечные клетки), мозге, а также печени и селезенке, где они выявляются в наибольшем количестве, т. е. в тканях, богатых макрофагами. В макрофагах наиболее интенсивно разрушаются продукты реакции Мейяра, при этом происходят активация эндоцитоза и синтез многих регуляторных молекул, в частности инсулинподобного фактора роста (IGF-1) и тромбоцитарного фактора роста (PDGF), являющихся стимуляторами деления фибробластов, гладкомышечных и мезангиальных клеток. Накопление маркера AGE пентозидина ускорено при диабете и рассматривается как адекватный маркер старения. Было показано, что в коллагене кожи коротко- и долгоживущих видов животных уровень маркера гликозилирования пентозидина был обратно пропорционален видовой максимальной продолжительности жизни.

Гипергликемия способствует образованию конечных продуктов гликозилирования и активных метаболитов кислорода. Определяющим негативный эффект гликозилирования является не собственно присоединение глюкозы к долгоживущим белкам, а происходящее вследствие этого обусловленное свободными радикалами их окислительное повреждение.

Было установлено, что гипергликемия способствует накоплению делеций в митохондриальной ДНК и других мутаций в клетках мышечной оболочки сосудов.

Ключевая роль механизма передачи сигнала инсулина как фактора, определяющего долголетие, убедительно показана на

различных моделях беспозвоночных. Одним из эффективных способов предупреждения старения является снижение калорийности пищи. Возможным механизмом влияния такой диеты является снижение концентрации глюкозы в крови и уменьшение неэнзиматического присоединения глюкозы к долгоживущим белкам, например гемоглобину. Снижение концентрации глюкозы приводит к снижению как гликозилирования белков, так и перекисного окисления липидов. Нуклеотиды и ДНК также подвергаются неэнзиматическому гликозилированию, что приводит к мутациям из-за прямого повреждения ДНК и инактивации систем репарации ошибок рекомбинации.

#### 8.7.4. Метилирование ДНК и старение

Молекулярные события, определяющие транскрипцию, имеют решающий интерес для геронтологов, поскольку регуляция экспрессии генов коренным образом влияет на старение и старческие изменения в организме. Факторы, влияющие на экспрессию гена, но не прямо вызывающие изменения в генетическом коде, могут играть важную роль в старении. Одним из них является метилирование ДНК [1], [11]. До 5 % остатков цитозина в ДНК млекопитающих метилировано по 5'-позиции с образованием 5-метилцитозина (5мЦ). Это единственное постоянно модифицированное основание в ДНК высших эукариот. Метилирование происходит в обеих нитях ДНК симметрично, и остатки 5мЦ всегда фланкируются остатками гуанина со стороны 3'-конца. Метилированные остатки цитозина выполняют различные функции, но что еще более важно, метилирование ДНК вовлечено в регуляцию активности генов. Изменения в метилировании, в частности деметилирование динуклеотидов у позвоночных, связано с изменением уровня транскрипции. Возрастное деметилирование ДНК впервые описано в 1973 г. Б.Ф. Ванюшиным. Было высказано предположение, что возрастное деметилирование предрасполагает клетки к опухолевой трансформации. Аберрантные участки метилирования ДНК размером от 0,5 до нескольких тысяч пар оснований являются существенным механизмом инактивации активности генов и часто наблюдаются при раке. Эти участки

располагаются вблизи генов, часто они обнаруживаются около промоторных областей широко экспрессирующихся генов. Возрастное гиперметилирование наблюдали в нормальной слизистой оболочке толстой кишки и в ряде других органов, причем хронические воспалительные процессы, например хронический язвенный колит или инфицирование *Helicobacter pylori*, ассоциированы с избыточным метилированием. Отмечают, что возрастное метилирование увеличивается с возрастом линейно, хотя степень его нарастания может варьироваться.

### 8.7.5. Окислительный стресс и старение

Одной из наиболее плодотворно развивающихся в последние годы фундаментальных теорий является свободнорадикальная теория старения [1], [11], [15], практически одновременно выдвинутая в 1956 г. Д. Харманом и в 1958 г. Н.М. Эмануэлем. Согласно этой теории, продуцируемые главным образом в митохондриях клеток молекулы супероксидного анион-радикала,  $H_2O_2$ , гидроксильного радикала ( $HO^\bullet$ ) и, возможно, синглетного кислорода ( $^1O_2$ ) повреждают клеточные макромолекулы (ДНК, белки, липиды). Полагают, что активные формы кислорода вызывают повреждения мембран и макромолекул. Подсчитано, что за 70 лет жизни человека организм производит около тонны радикалов кислорода, хотя только 2–5 % вдыхаемого с воздухом кислорода превращается в его токсические радикалы. В клетке крысы может возникать до  $10^4$  вызванных активными формами кислорода повреждений ДНК в день и при постоянных условиях до 10 % молекул белка могут иметь карбонильные модификации. Подавляющее большинство из них нейтрализуется еще до того, как успеют повредить те или иные компоненты клетки. Так, из каждого миллиона образующихся супероксидных анион-радикалов от ферментной защиты ускользает не более четырех.

Видовая продолжительность жизни прямо коррелирует с активностью антиоксидантной системы: супероксиддисмутазы (СОД), содержанием  $\beta$ -каротина,  $\alpha$ -токоферола и мочевой кислоты в сыворотке крови. Более того, у долгоживущих линий *D. melanogaster* экспрессия СОД, каталазы, глутатионредук-

тазы и ксантиндегидрогеназы была достоверно большей, чем у короткоживущих линий мух. Выявлена положительная корреляция между продолжительностью жизни млекопитающих и резистентностью их клеток к окислительному стрессу, вызываемому различными агентами. Установлена высокая корреляция между активностью основного обмена, активностью СОД и максимальной продолжительностью жизни у животных 14 видов, включая человека. Было показано, что у последнего с возрастом происходит снижение общей антиокислительной и антирадикальной активности крови. У людей старческого возраста (83–85 лет) и долгожителей (90–105 лет) выявлено повышение уровня продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в ЛПНП по сравнению со здоровыми людьми в возрасте 36–59 лет. Витамин Е, мелатонин, хелатные агенты и некоторые синтетические антиоксиданты способны увеличивать продолжительность жизни не только дрозофил, но и лабораторных мышей и крыс.

В последние годы получила развитие так называемая митохондриальная гипотеза старения, в основе которой лежат два допущения. *Во-первых*, предполагается, что мутации митохондриальной ДНК (мтДНК) накапливаются с возрастом и могут достигать значительной частоты. *Во-вторых*, считается, что мутации мтДНК распределяются таким образом, что каждая клетка содержит одну мутацию или главным образом один тип мутаций. При этом мутация может полностью реализовать свою потенциальную возможность нарушить физиологию клетки и тем самым быть активно вовлеченной в процесс старения. В пользу такой точки зрения свидетельствуют следующие данные:

- накопление в митохондриальной ДНК тканей пожилых индивидуумов больших делеций и точковых мутаций и уменьшение количества копий;
- снижение с возрастом активности ферментов, обеспечивающих перенос электронов в дыхательной цепи, лимфоцитах, скелетных мышцах и кардиомиоцитах;
- как следствие этих процессов — увеличение продукции активных метаболитов кислорода и прогрессивное перекисное окисление липидов и белков мембран;

- изменение морфологической структуры митохондрий и снижение их мембранного потенциала, обеспечивающего энергию для синтеза АТФ;
- клетки молодых крыс быстро стареют и подвергаются дегенерации, если в них с помощью микроинъекции вводят митохондрии из фибробластов старых крыс;
- существование обратной корреляции между продукцией перекиси водорода, митохондриями и максимальной продолжительностью жизни вида.

Наследуемая по материнской линии мтДНК реплицируется в течение всей жизни организма как в пролиферирующих, так и в постмитотических клетках, что в конечном счете приводит к тому, что частота мутаций мтДНК во много раз превышает таковую в ядерной ДНК. Имеются данные об ассоциации апоптоза с фрагментацией мтДНК. Наследуемый полиморфизм митохондриальной ДНК ассоциирован со старением и долголетием: например, в северной Италии гаплотип J гораздо чаще встречается у столетних мужчин, чем у молодых.

### 8.7.6. Старение и репаративный синтез ДНК

Одной из причин накопления повреждений ДНК с возрастом может быть снижение эффективности систем ее репарации [1], [11], [15]. В ряде работ установлена положительная корреляция между продолжительностью жизни вида и скоростью репарации ДНК, поврежденной ультрафиолетовым светом или ионизирующей радиацией. Большой интерес представляют данные о видовых различиях в специфической репарации ДНК, поврежденной алкилирующими агентами, в частности о различиях в скорости удаления из ДНК промутагенного основания  $O^6$ -метилгуанина. Оказалось, что печень человека примерно в 10 раз быстрее удаляет  $O^6$ -метилгуанин, чем печень крысы. Значительно быстрее  $O^6$ -метилгуанин элиминировался также из лимфоцитов и фибробластов человека, чем из аналогичных тканей мыши. Эти наблюдения позволяют предполагать меньшую чувствительность человека к канцерогенному действию нитрозосоединений. Другой причиной отличий в продолжительности жизни животных разных видов могли бы быть особенности то-

лерантности к молекулярным повреждениям. Ж.А. Медведев в 1972 г. предположил, что повторность генов (множественность копий) может быть важным фактором долголетия, поскольку повреждения уникальных генов более вероятно будут способствовать их суммации и преждевременному старению. У долгоживущих видов механизмы, защищающие генетический аппарат клетки от повреждений, по-видимому, более совершенны, чем у короткоживущих видов. Большой интерес представляют данные о возрастных изменениях репарации различных типов повреждений ДНК. Было показано, что радиационная повреждаемость ДНК стволовых клеток кишечного эпителия мышей разных линий и возраста примерно одинакова, однако скорость репарации этих повреждений с возрастом снижается. Способность диплоидных фибробластов человека к репарации индуцированных ионизирующим излучением однонитевых разрывов ДНК достоверно снижается с увеличением возраста донора.

Репарируются большинство, но не все повреждения ДНК. Так, у крыс происходит  $10^5$  окислительных повреждений ДНК в день в расчете на клетку. Когда скорость репарации не достигает скорости индукции повреждений, происходит увеличение спонтанных повреждений ДНК с возрастом. Точная оценка способности организма восстанавливать специфические повреждения затруднена и часто бывает ошибочной. При старении, вероятно, репарационные системы ДНК сильнее подвержены ошибкам, приводящим к усилению индукции мутаций. В любом случае определенная степень несовершенства является главной чертой системы репарации ДНК, на что указывало как фактическое накопление повреждений ДНК, так и изменение последовательности ДНК.

### 8.7.7. Старение и обмен веществ

Уже давно выявлена обратная связь между продолжительностью жизни животных различных видов и удельной скоростью обмена веществ. Существует особое понятие энергетического жизненного потенциала, отражающего общее количество расходуемой за жизнь энергии. Его значение для млекопитающих (кроме приматов) составляет примерно 924 кДж/г, боль-

шинства приматов — 1924 кДж/г, лемура, обезьяны-капуцина и человека — 3280 кДж/г массы тела. Изменения потока энергии в процессе старения состоят в снижении количества митохондрий в клетках, а также падении эффективности их функционирования. Так, у взрослых крыс количество кислорода, потребляемое на 1 мг белка митохондрий, более чем в 1,5 раза выше, чем у старых животных, что ведет к повышению роли анаэробных гликолитических превращений у последних.

Не существует определенной закономерности в возрастных изменениях функционирования ферментов. Можно лишь отметить, что активность ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции, снижается. Возможно, это связано с уменьшением количества белков-ферментов.

Хорошо изучены возрастные структурно-молекулярные изменения в нервной ткани. В отростках мотонейронов старых крыс скорость транспорта составляет примерно 200 мм/сут, тогда как у зрелых животных — 320 мм/сут. Наблюдается также снижение интенсивности синтеза белка и РНК. Отмечается замедление проведения нервного импульса, а в некоторых типах нервных клеток — уменьшение количества образуемого медиатора. Наиболее типичной чертой старения нервных клеток млекопитающих и человека является нарастающее накопление с возрастом в цитоплазме пигмента *липофусцина*. У 60-летних людей из-за увеличения содержания пигмента доля цитоплазмы снижается в 1,3, а у 80-летних — в 2 раза по сравнению с 40-летними. Липофусцин часто называют пигментом изнашивания, т. е. балластом. Противоположная точка зрения приписывает липофусцину роль внутриклеточного депо кислорода.

Возрастное накопление липофусцина распространяется кроме нервной системы на сердечную и скелетную мускулатуру. Сдерживание роста содержания пигмента в клетках плодовых мух путем ограничения летательной активности сочеталось с двукратным увеличением средней продолжительности жизни.

Одной из причин старения является снижение интенсивности функционирования ферментативных и неферментативных антиоксидантных систем, что вызывает негативное действие



активных метаболитов кислорода и азота (проявление оксидативного и нитросативного стресса) [1], [11], [15].

Сохраняют свое значение классические представления, уходящие корнями в XIX ст., утверждающие, что старение и естественное его следствие — смерть являются своеобразной платой за явление клеточной дифференцировки. Выход клеток в дифференцировку для многих их типов означает старение и гибель в связи с утратой возможности возвращения в митотический цикл (нервные, мышечные клетки).

На основании биохимических исследований были сформулированы гипотезы, согласно которым начало старения организма связано с изменениями строения и, следовательно, физико-химических и биологических свойств макромолекул: ДНК, РНК, белков хроматина, цитоплазматических и ядерных белков, ферментов. Особо выделяют также липиды клеточных мембран, часто являющиеся мишенью для свободных радикалов. Сбои в работе рецепторов, в частности клеточных оболочек, нарушают эффективность регуляторных механизмов, что приводит к расстройству процессов жизнедеятельности. Эти гипотезы входят в 500 гипотез, объясняющих и первопричину, и механизмы старения организма. А это значит, что проблемы разработки теоретических основ геронтологии далеки от решения.

### 8.7.8. Теломеры, теломераза и старение

Теломеры являются терминальными концами хромосом и состоят из повторяющихся последовательностей TTAGGG. Хромосомы теряют небольшое количество ДНК после каждого клеточного деления. Гипотетическая функция теломерной ДНК состоит в разрешении только конечного числа клеточных делений без потери функциональных генов. Вторая функция теломерной ДНК — это предотвращение нежелательных взаимодействий между концами хромосом и клеточными ферментами репарации. В клетках, сохраняющих способность к пролиферации, таких как стволовые клетки и раковые клетки, длина теломеров поддерживается обратной транскриптазой, теломеразой. В 1971 г. А.М. Олейников связал онтогенез и его конечную стадию — старение с процессами укорочения тело-

мер в хромосомном аппарате клеток. В частности, было показано, что дифференцированные соматические клетки вообще лишены теломеразной активности, в то время как в иммортальных и половых клетках она есть и укорачивания теломер в последних в течение любого времени не происходит. Теломераза содержит собственную РНК-матрицу, поэтому может быть отнесена к обратным транскриптазам: ингибиторы обратных транскриптаз вызывают появление клеток, лишенных теломеразной активности; при отмене ингибиторов обратных транскриптаз в культуре возобновляется синтез ДНК.

В действительности же, как установлено некоторыми исследованиями, соотношение длины теломер и скорости их укорочения не является фактором, определяющим пролиферативный потенциал популяций нетрансформированных клеток и не ограничивает продолжительность жизни многоклеточных организмов; функции теломеразы вне клеток терминальных рядов либо не являются необходимыми, либо неизвестны. Укорочение теломер происходит при репликативном старении некоторых одноклеточных и многоклеточных, и поэтому теория старения как следствие укорочения теломер требует серьезной модификации. Хотя введение теломеразы (или ее активация) предотвращает наступление стадии старения клеточной культуры, однако существует, как это подтверждают новейшие исследования, отдельный путь старения клеток, независимый от теломеразы. Теломераза экспрессируется лишь в клетках полового пути, стволовых клетках и большинстве опухолевых клеток, большинство же соматических клеток человека не обладают теломеразной активностью, что ведет к концевой недорепликации хромосом и, как следствие, к пролиферативному старению клеток. В большинстве соматических клеток человека экспрессия теломеразы оказалась чрезвычайно надежно заблокирована.

Подытоживая рассуждения о теломеразной теории старения, более правильно связать старение не с уменьшением длины теломер в онтогенезе, а со снижением активности обратных транскриптаз (теломераз) во время дифференцировки, что можно рассматривать как проявление общего увядания, снижения суммарной транскрипционной и трансляционной активности генетического аппарата в онтогенезе [11].

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Академик Л.П. Татаринов в концептуальной статье «Современные тенденции в развитии филогенетических исследований» (2004) сделал ряд важных обобщений.

- Палеонтология показала биологам, что многие группы организмов имеют более древнее происхождение, чем считалось ранее.

- Успехи молекулярной биологии открыли возможность изучения филогенеза организмов на генотипическом уровне, что привело к появлению геносистематики. Однако развитие геносистематики затруднено тем, что геном эукариот перенасыщен не кодирующими белки последовательностями, смысл которых пока во многом не ясен. Речь идет не только об интронах (внутригенных некодирующих последовательностях), но и о многочисленных повторах, появляющихся в результате дупликации генов, «бессмысленных» последовательностях, делециях и некоторых других особенностях генома высших организмов.

- Далеко не всегда понятен смысл даже простых мутаций в последовательностях, кодирующих белки. Иногда полагают даже, что такие мутации функционально бессмысленны. Именно на такой основе базировалась неоклассическая гипотеза естественного отбора, а затем и теория нейтральности. Однако нужно отметить, что многие мутации с внешне не выраженным морфологическим эффектом могут играть большую роль в генезисе заболеваний, что отчетливо проявляется только на биохимическом уровне.

- Изучение мутационного процесса и сравнение организмов с разным положением в системе наводит на мысль о том, что в масштабах геологического времени гены изменяются примерно с одинаковой скоростью. На этом основан принцип молекулярных часов Э. Цукеркандла и Л. Полинга, позволяющих приближенно определять время дивергенции геномов сравниваемых групп по степени расхождений между ними или между отдельными генами.

- Молекулярные часы адекватно работают лишь при условии нейтральности большинства мутаций, по-видимому, в зна-

чительной мере за счет мутаций в мусорной ДНК — так обозначают многочисленные повторы в геноме эукариот, а также псевдогены, не кодирующие непосредственно протеины. Например, независимая эволюция предков мыши и человека, длившаяся не менее 70 млн лет, привела к накоплению различий только в 30 % генов. В то же время известно, что гомеотические гены (точнее, входящие в их состав ключевые группы — гомеобоксы), играющие первостепенную роль в определении планов строения основных типов многоклеточных животных, остаются почти неизмененными в течение полумиллиарда лет.

• Многие факты и открытия молекулярной систематики еще нуждаются в переосмыслении. Упомянем хотя бы, что у некоторых протистов и бактерий обнаружены гены, кодирующие инсулин, релаксин и коллаген, а из некоторых протистов выделены адренкортикотропный гормон и соматостатин. По строению релаксина, например, свинья и крыса отличаются друг от друга, возможно, не меньше, чем от акулы. Биохимические функции такого рода мутаций обычно остаются неясными.

• Остается вечный и до конца не разрешимый вопрос: насколько детерминирована эволюция и в какой мере ее ход может изменяться вследствие случайных причин? Единственный явно действующий детерминирующий фактор эволюции — естественный отбор. Однако многие процессы, вызывающие наследственные изменения, имеют случайный характер, что привносит в эволюцию черты физического хаоса; некоторые же процессы на молекулярном уровне отмечены признаками самоорганизации.

• Рамки теории эволюции настолько расширились, что охватить все ее уровни от молекулярного до экосистемного и биосферного, и создать на этой основе целостную теорию, по-видимому, уже невозможно. Такая теория, помимо данных молекулярной биологии о механизмах мутагенеза и морфогенеза, должна была бы включать и закономерности экосистемной эволюции, а также существенные аспекты эволюции биосферы, неразрывно связанной с планетарными процессами эволюции Земли.

Эти мысли известного ученого приведены в заключении данной книги для того, чтобы показать возможные пути на-

учных исследований с применением методологии биохимии в изучении проблемы филогенеза.

Биохимические аспекты онтогенеза изучены более детально, хотя остается много дискуссионных вопросов и противоречивых данных. Тем не менее в биохимии онтогенеза существует значительная область практического применения теоретических знаний в ряде специальностей биологического, медицинского и ветеринарного направлений: биохимия внутриутробного развития, наследуемые заболевания, биохимия детского возраста, физиология и патологическая физиология человека и животных, геронтология и др. Так, например, междисциплинарное значение имеют возрастные биохимические параметры, при сравнении с которыми производится разграничение состояний нормы и развивающихся патологических процессов.

Авторы глубоко убеждены в том, что надлежащая фундаментальная подготовка является важным условием успешности биолога или медика как специалиста. Поэтому они надеются, что их труд на стыке биологии развития и биохимии будет полезен студентам и магистрантам биологических и медицинских специальностей.

# ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Альбертс Б.* Молекулярная биология клетки. 2-е изд. перераб. и доп.: В 3-х т. Т. 2. / Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис и др.; пер. с англ. — М.: Мир, 1993. — 539 с.
2. *Бутвиловский А.В.* Базисные методы молекулярной эволюции / А.В. Бутвиловский, Е.В. Барковский, В.Э. Бутвиловский. — Минск: БДМУ, 2006. — 35 с.
3. *Бутвиловский А.В.* Алкогольдегидрогеназы хордовых животных: монография / А.В. Бутвиловский, Е.В. Барковский, В.Э. Бутвиловский; под ред. Е.В. Барковского. — Минск: БДМУ, 2007. — 144 с.
4. *Бутвиловский А.В.* Молекулярная эволюция: Материалы к факультативному курсу / А.В. Бутвиловский, В.Э. Бутвиловский, Е.А. Черноус. — Минск: БДМУ, 2009. — 72 с.
5. *Бутвиловский А.В.* Основные методы молекулярной эволюции: монография / А.В. Бутвиловский, Е.В. Барковский, В.Э. Бутвиловский и др.; под ред. Е.В. Барковского. — Минск: Белпринт, 2009. — 216 с.
6. *Корочкин Л.И.* Стволовые клетки как генетическая проблема / Л.И. Корочкин // Вестн. ВОГиС. — 2004. Т. 8. № 2. — С. 73–80.
7. *Репин В.С.* Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина / В.С. Репин, А.А. Ржанинова, Д.А. Шаменков. — М.: РеМетекс, 2002. — 160 с.
8. *Смирнов А.Н.* Элементы эндокринной регуляции: научн. изд. / под ред. акад. РАМН В.А. Ткачука. — М.: Гэотар-Медиа, 2006. — 352 с.
9. *Спирин А.С.* Фундаментальная наука и проблемы биологической безопасности // Вестн. Рос. акад. наук. — 2004. Т. 74. № 11. — С. 963–972.
10. *Фриденштейн А.Я.* Клеточные основы кроветворного микроокружения / А.Я. Фриденштейн, Е.А. Лурия — М.: Медицина, 1980. — 216 с.
11. *Ханжин Б.М.* Проблема практического бессмертия человека: системный подход к вопросам онто- и геронтогенеза при решении проблемы пролонгирования жизни за видо-

- вой предел / Б.М. Ханжин, Г.Д. Бердышев, Т.Ф. Ханжина. — М., 2004. — 94 с.
12. *Чиркин А.А.* Биохимия с основами генной инженерии / А.А. Чиркин. — Витебск: ВГУ им. П.М. Машерова, 2010. — 181 с.
  13. *Чиркин А.А.* Биохимия: учеб. руководство / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. — М.: Мед. лит., 2010. — 624 с.
  14. *Чиркин А.А.* Физиологические значения лабораторных тестов у населения Республики Беларусь / А.А. Чиркин, Э.А. Доценко, В.С. Камышников и др.; под ред. В.С. Улащика. — Минск: Адукацыя і выхаванне, 2010. — 88 с.
  15. *Ярыгин В.Н.* Биология : учеб. для медиц. спец. вузов: В 2 кн. / В.Н. Ярыгин, В.И. Васильева, И.Н. Волков, В.В. Синельщикова; под ред. В.Н. Ярыгина. — М.: Высш. шк., 2003. — 432 с.
  16. *Anderson P.A.* Comparative Biochemistry and Physiology / P.A. Anderson, R.M. Greenberg // 2001. Part B. Vol. 129. — P. 17–28.
  17. *Berg J.M.* Biochemistry / J.M. Berg, J.L. Tymoszko, L. Stryer. — New York: W.H. Freeman and Company, 2002. — 1514 p.
  18. *Bertini I.* Handbook on Metalloproteins / I. Bertini, A. Sigel, H. Sigel // New York — Basel, 2001. P. 1182.
  19. *Bonamore A.* Escherichia coli flavohemoglobin is an efficient alkylhydroperoxide reductase / A. Bonamore, P. Gentili, A. Ilari, M. Schininà, A. Boffi // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278. — P. 22272–22277.
  20. *Ganten D.* Encyclopedic reference of genomics and proteomics in molecular medicine / D. Ganten, K. Ruckpaul. — Vol. 1–2. — Berlin: Springer-Verlag, 2006. — 4180 p.
  21. *Jaenicke E.* Tyrosinases from crustaceans form hexamers / E. Jaenicke, H. Decker // Biochem. J. — 2003. — Vol. 371. — P. 515–523.
  22. *Karp G.* Cell and molecular biology. Concepts and experiments. — John Wiley and Sons, 2005. — 780 p.
  23. *Knoll A.H.* The early evolution of eukaryotes: a geological perspective // Science. — 1992. — Vol. 256. — P. 622–627.

24. *Lily Y.J.* Potassium channels and their evolving gates / Y.J. Lily, N.J. Yun // *Nature*. — 1994. — Vol. 371. — № 8. — P. 119–122.
25. *Markl J.* Molecular structure of the arthropod hemocyanins. Blood and Tissue Oxygen Carriers / J. Markl, H. Decker. — Vol. 13. Heidelberg: Springer Verlag. — 1992. — P. 325–376.
26. *Poole R.K.* New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress / R.K. Poole, M.N. Hughes // *Mol. Microbiol.* — 2000. — Vol. 36. — P. 775–783.
27. *Rees D.C.* Great metalloclusters in enzymology // *Annu. Rev. Biochem.* — 2002. — Vol. 71. — P. 221–246.
28. *Rees D.C.* The interface between the biological and inorganic worlds: ironsulfur metalloclusters / D.C. Rees, J.B. Howard // *Science*. — 2003. — Vol. 300. — P. 929–931.
29. *Wittenberg J.B.* Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants / J.B. Wittenberg, M. Bolognesi, B.A. Wittenberg, M. Guertin // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — P. 871–874.



# СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение</b> .....	<b>3</b>
<b>Глава 1. Введение в биохимию филогенеза и онтогенеза</b> .....	<b>5</b>
1.1. Признаки живой материи и происхождение жизни ....	5
1.2. Возникновение жизни на Земле .....	6
1.2.1. Узловые моменты развития жизни .....	8
1.2.2. Количественная характеристика биоразнообразия.....	10
1.3. Метаболизм и живая материя.....	13
1.3.1. Функции метаболизма.....	13
1.3.2. Регуляция метаболизма.....	18
1.3.3. Фазы метаболизма .....	20
1.4. Биоэнергетика и живая материя .....	22
1.5. Биологическая информация и живая материя .....	27
1.6. Современная (синтетическая) теория эволюции и молекулярная филогения .....	29
<b>Глава 2. Биохимические подходы к исследованию эволюции</b> .....	<b>31</b>
2.1. Принципы биохимической эволюции .....	31
2.1.1. Термины молекулярной эволюции .....	33
2.1.2. Методы молекулярной эволюции .....	35
2.1.3. Теория нейтральной молекулярной эволюции ...	46
2.1.4. Мутационное давление .....	47
2.2. Биохимическая эволюция «в пробирке» .....	48
2.2.1. Рибозимы .....	49
2.2.2. Феномен РНК-интерференции .....	57
2.2.3. Аминокислоты и пептиды .....	63
2.3. Матричные синтезы и эволюция .....	65
2.4. Структура белков и эволюция.....	66
2.5. Молекулярные механизмы возникновения многоклеточности .....	79
<b>Глава 3. Биохимия прокариот и эукариот</b> .....	<b>83</b>
3.1. Прокариоты.....	83
3.1.1. Форма и функция .....	83
3.1.2. Строение прокариот .....	84
3.1.3. Источники метаболической энергии для прокариот .....	85

3.1.4. Классификация прокариот.....	87
3.2. Эукариоты.....	89
3.2.1. Классификация эукариот.....	90
3.2.2. Особенности организации наследственного материала у прокариот и эукариот .....	90
3.2.3. Эволюция прокариотического генома .....	94
3.2.4. Эволюция эукариотического генома .....	95
3.3. Перенос генетической информации.....	99
3.3.1. Подвижные генетические элементы .....	99
3.3.2. Роль горизонтального переноса генетического материала в эволюции генома.....	100
3.4. Сравнительная характеристика синтеза белков у прокариот и эукариот .....	101
<b>Глава 4. Филогенез гемоглобина .....</b>	<b>103</b>
4.1. Филогенез, структура и функции металлопротеидов ...	103
4.2. Многообразие кислородпереносящих белков .....	110
4.3. Филогенез гемсодержащих белков .....	119
4.4. Филогенез гемоглобина позвоночных .....	123
<b>Глава 5. Онтогенез — процесс реализации наследственной программы развития организма. Связь между онтогенезом и филогенезом.....</b>	<b>130</b>
5.1. Онтогенетический уровень организации живого ....	130
5.1.1. Определение онтогенеза.....	131
5.1.2. Основные атрибуты онтогенеза .....	134
5.1.3. Основные типы онтогенеза .....	134
5.2. Основные понятия онтогенеза .....	135
5.2.1. Автономизация онтогенеза.....	135
5.2.2. Эмбрионизация онтогенеза.....	137
5.2.3. Онтогенез животных .....	137
5.2.4. Онтогенез растений .....	139
5.2.5. Биогенетический закон .....	140
5.3. Дифференцировка .....	141
5.4. Молекулярные основы онтогенеза.....	143
5.4.1. Роль гистонов.....	143
5.4.2. Реализация одного из ведущих механизмов онтогенеза .....	148
5.5. Метаморфоз .....	149
5.6. Филогенез .....	152

5.7. Связь между онтогенезом и филогенезом .....	153
5.8. Эмбриональные адаптации. Модусы филэмбриогенеза. Автономизация и эмбрионизация онтогенеза .....	156
5.8.1. Эмбриональные (эмбрионально-личиночные) адаптации .....	156
5.8.2. Филэмбриогенезы .....	157
5.9. Филогенетические преобразования органов и функций.....	159
5.9.1. Качественные функциональные изменения органов .....	160
5.9.2. Субституция .....	161

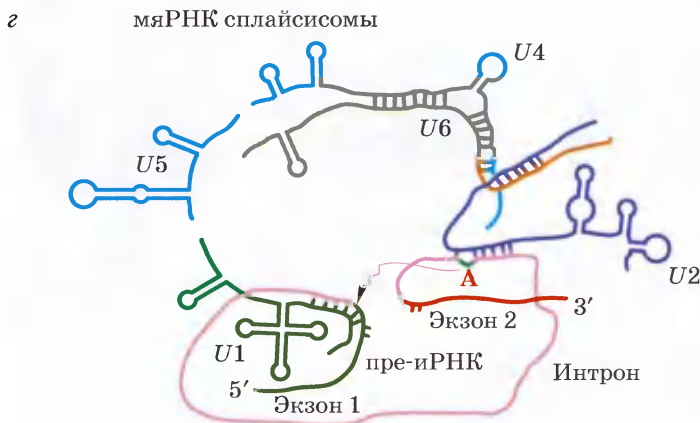
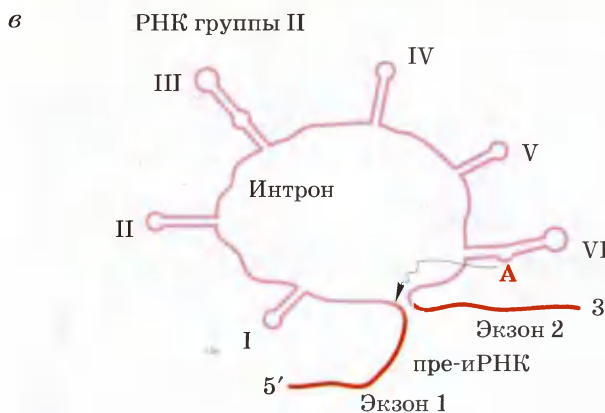
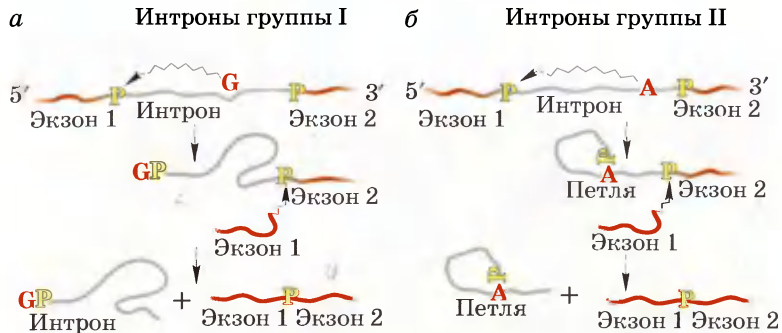
## **Глава 6. Молекулярные и молекулярно-генетические основы**

<b>эмбрионального развития.....</b>	<b>162</b>
6.1. Этапы раннего онтогенеза .....	162
6.2. Органогенезы .....	166
6.3. Генотип.....	172
6.4. Пути приобретения организмами биологической информации .....	176
6.5. Реализация наследственной информации в индиви- дуальном развитии. Мультигенные семейства .....	177
6.6. Некоторые концепции индивидуального развития... ..	186
6.6.1. Деление клеток .....	186
6.6.2. Миграция клеток .....	187
6.6.3. Сортировка клеток.....	188
6.6.4. Гибель клеток .....	191
6.6.5. Дифференциальная экспрессия генов .....	193
6.6.6. Генетический контроль развития .....	198
6.7. Стволовые клетки и ранний эмбриогенез .....	199
6.7.1. Фенотип эмбриональных стволовых клеток... ..	199
6.7.2. Эмбриональные стволовые клетки — модель изучения раннего эмбриогенеза и органогенеза.....	203
6.8. Последствия молекулярных нарушений в эмбриогенезе .....	207

## **Глава 7. Дифференциальная активность генов — основа**

<b>дифференцировки .....</b>	<b>212</b>
7.1. Функциональная характеристика гена .....	212

7.2. Дифференциация .....	215
7.3. Объяснение процесса клеточной дифференцировки с точки зрения дифференциальной активности генов .....	216
7.4. Тканеспецифические гены .....	221
7.5. Молекулярные данные о генетической регуляции специфических синтезов в клетке .....	222
7.6. Стволовые клетки и дифференцировка .....	223
<b>Глава 8. Метаболизм человека в онтогенезе.....</b>	<b>226</b>
8.1. Периодизация онтогенеза человека .....	226
8.2. Обмен веществ в антенатальном периоде .....	227
8.2.1. Обмен углеводов .....	227
8.2.2. Обмен липидов .....	228
8.2.3. Обмен белков.....	230
8.2.4. Водно-минеральный обмен .....	230
8.2.5. Свободно-радикальное окисление и антиоксидантная система .....	232
8.2.6. Функция эндокринных желез.....	232
8.3. Особенности обмена веществ у новорожденных .....	236
8.4. Особенности обмена веществ у детей грудного возраста .....	242
8.5. Возраст и обмен веществ .....	244
8.6. Биохимия старения .....	263
8.7. Проявление старения на молекулярном, субклеточном и клеточном уровнях .....	265
8.7.1. Возраст и частота мутаций .....	265
8.7.2. Изменение структуры и функции генов при старении.....	266
8.7.3. Гликозилирование белков и ДНК .....	268
8.7.4. Метилирование ДНК и старение .....	270
8.7.5. Окислительный стресс и старение .....	271
8.7.6. Старение и репаративный синтез ДНК .....	273
8.7.7. Старение и обмен веществ .....	274
8.7.8. Теломеры, теломеразы и старение .....	276
<b>Заключение .....</b>	<b>278</b>
<b>Использованная литература.....</b>	<b>281</b>



**Рис. 2.5.** Четыре варианта сплайсинга, осуществляемого РНК-рибозимами

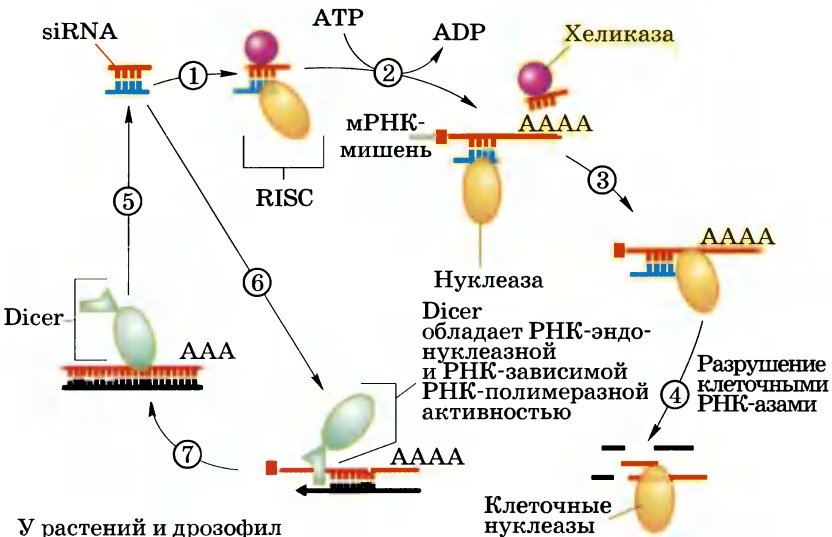


Рис. 2.7. Роль siRNA



Рис. 2.8. Структуры рибонуклеазы коровы, человека и ангиогенина [17]

Гемоглобин → Гемоглобин

Миоглобин

Миоглобин

VLSPADKTNVKAAGKVGAGHAGEYGAELERMFLSFPTTKT  
GLSEGEWQLVLNVWGKVEADIPQHGGQEEILRFKGHPEETLE

VLSPADKTNVKAAGKVGAGHAGEYGAELERMFLS  
GLSEGEWQLVLNVWGKVEADIPQHGGQEEILRFKGHPEETLE

YFPHFDLSHGSAAKGGKVVADALTNAAHVDDMPNALSALSA  
KFDKFKHLKSEDEMKASEDLKKGATVTLALGGILKKGHN

FPTTKTYFPHFDLSHGSAAQVKGHGKVVADALTNAAHVDDM  
KFDKFKHLKSEDEMKASEDLKKGATVTLALGGILKKGHN

LSDLHANKLRVDPVNFKLLSHCLLVTAAHLPAEFTPAVNA  
EAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLEFISFCIQVLQSKHPPGDF

PNALSALSDLHANKLRVDPVNFKLLSHCLLVTAAHLPAEF  
EAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLEFISFCIQVQSKHPPGDF

SLDKFLASVSTVLTSKYR  
GADAQQAMNKALELFRKDMASNYKELGFQG

TPAVNASLDKFLASVSTVLTSKYR  
GADAQQAMNKALELFRKDMASNYKELGFQG

22 совпадения

23 совпадения



Рис. 2.11. Сравнение аминокислотных последовательностей  $\alpha$ -цепи гемоглобина и миоглобина [17]

VLSPADKTNVKAAWGKVGAHAGEYGAELERMFLSFPTTKTYFPIHF  
 DGLSEGEWQLVLNVWGKVEADIPQHGQEELIRLFKGGHPETLEKFDKFKHLKSED

LSHGSAAQVKGHGKKVADALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHKLRVDPVNKKL  
 EMKASEDLKKHGATVLTALGGILKKKGHNEAEIKPLAQS  
 HATKHKIPVKYLEF

LSHCLLVTLAAHLPAEFTFAVHASLDKFLASVSTVLT  
 SKYRISFCIIQVLIQSKHPGDFGADAQGGAMNKAELFRKDMASNYKELGFGG

Рис. 2.12. Выравнивание  $\alpha$ -цепи гемоглобина и миоглобина после вставки пробела в  $\alpha$ -последовательность гемоглобина [17]

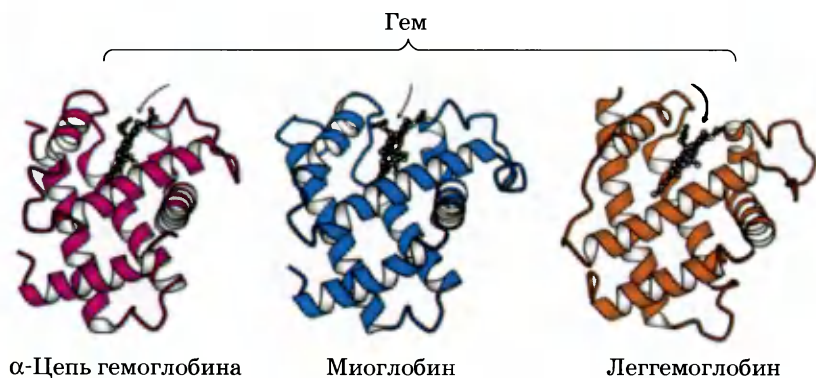


Рис. 2.13. Консерватизм трехмерной структуры [17]



Рис. 2.14. Структуры актина и большого фрагмента Hsp-70 [17]



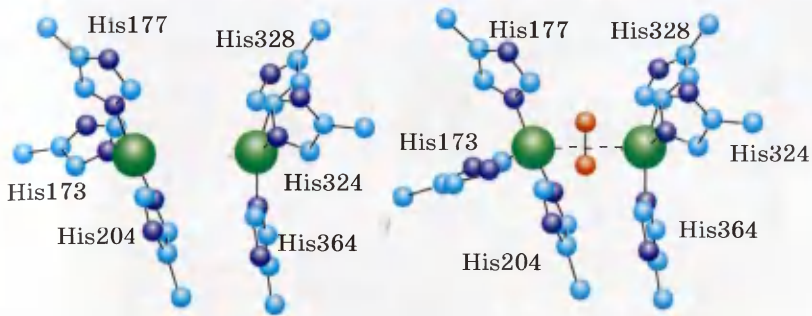


Рис. 4.5. Схематическое изображение активного центра гемоцианина в дезокси- (слева) и окси- (справа) состояниях: 4 зеленых шара в центре молекул — атомы меди, а красная гантелеобразная структура в области пунктира — молекула кислорода

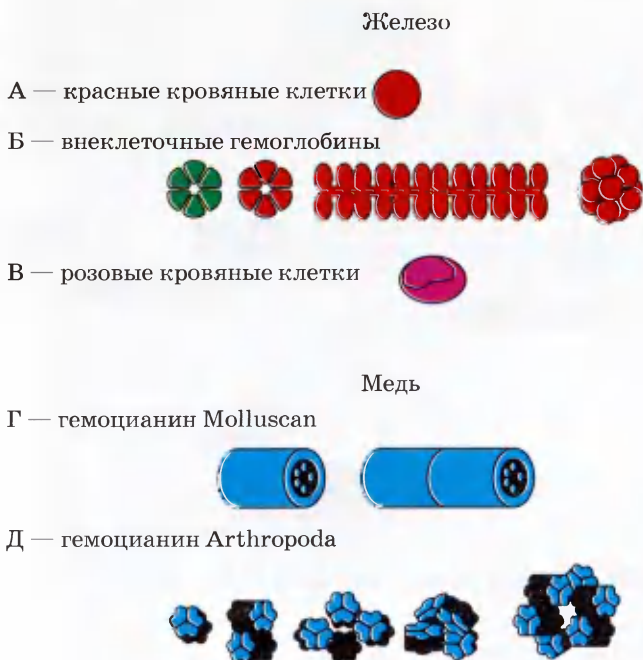


Рис. 4.9. Схематическое изображение кислородпереносящих белков

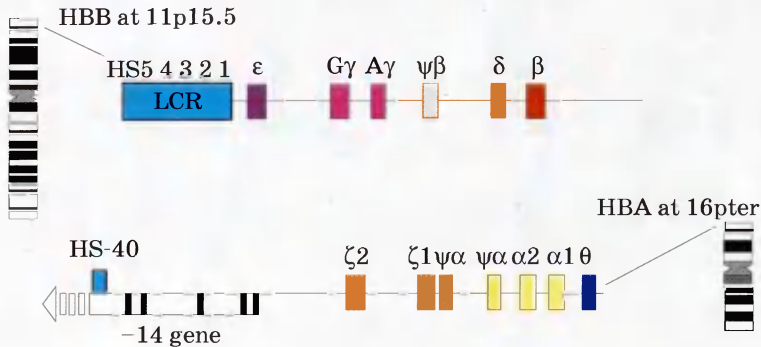


Рис. 4.11. Кластеры  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов

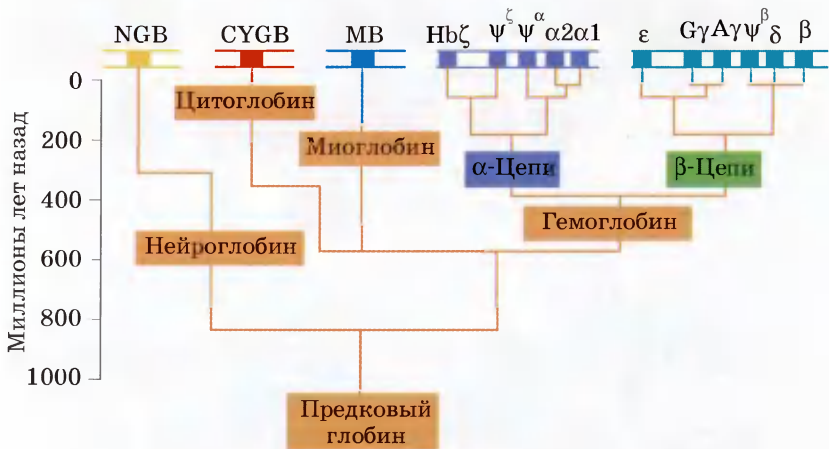
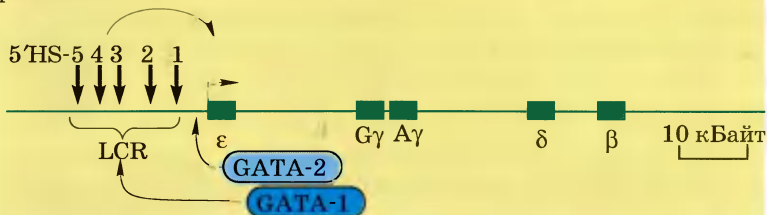
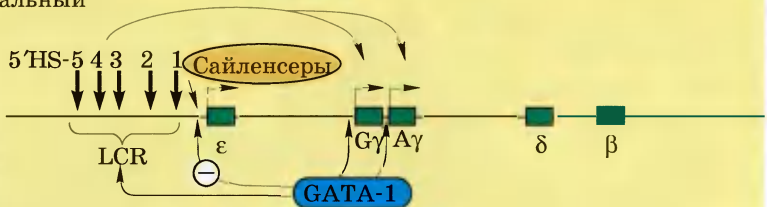


Рис.4.13. Филогенетическое дерево глобиновых белков человека

Эмбриональный



Фетальный



Постнатальный

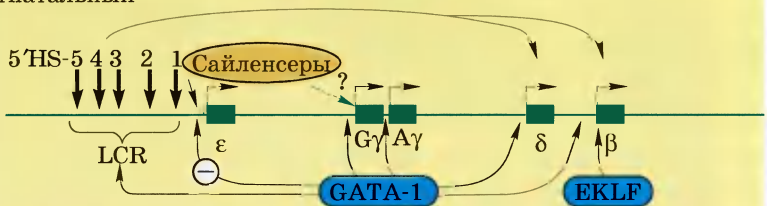


Рис. 6.2. Упрощенная схема регуляции экспрессии  $\beta$ -глобиновых генов

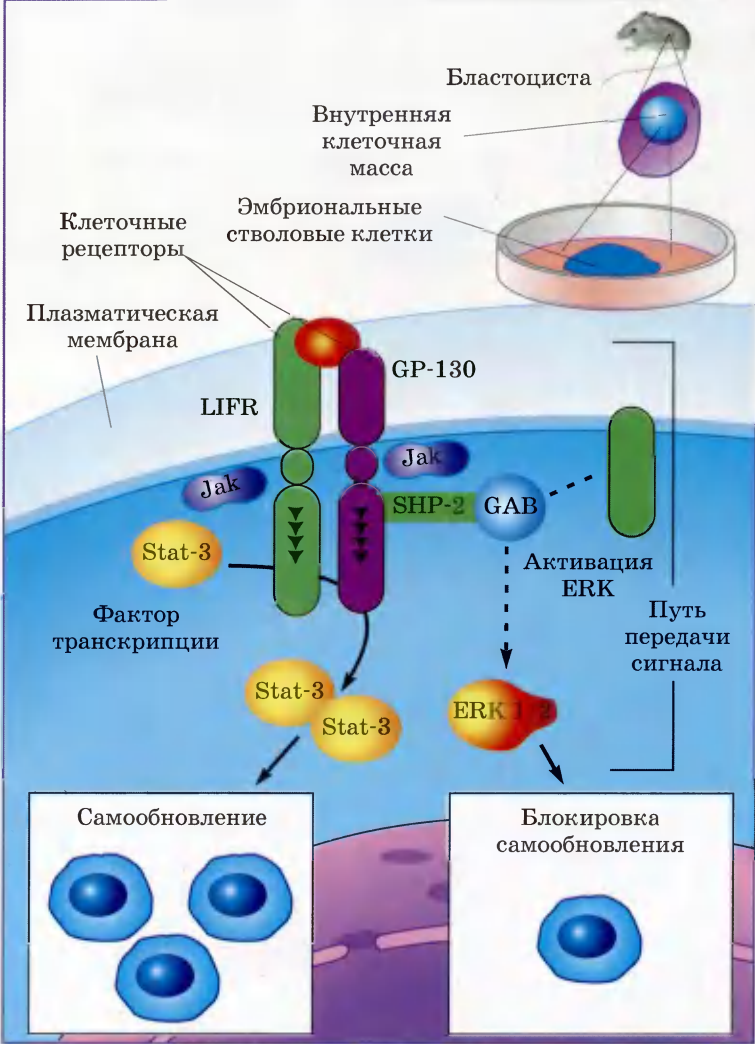


Рис. 6.3. Система сигнализации LIF-рецептора в клеточное ядро