

¹³C, ОНТОГЕНЕЗ И ПАРАДОКС ЭВОЛЮЦИИ

© 2018 г. А.Г. Маленков

Российская академия естественных наук, 117105, Москва, Варшавское шоссе, 8

E-mail: barsuk-13@mail.ru

Поступила в редакцию 05.06.17 г.

Точное прочтение двух вариантов генетической информации – необходимое условие реализации онтогенеза высокоорганизованных многоклеточных организмов. Физико-химическое различие разных областей цитоплазмы яйцеклетки для этого недостаточно. А.А. Иванов показал, что формирование различий по изотопу ¹³C в копиях ДНК в ходе раннего эмбриогенеза необходимое условие успешного завершения всего онтогенеза. Принимая во внимание это явление и пятое фундаментальное взаимодействие (взаимодействие спинов макрообъектов), удастся понять огромную задержку «кембрийского взрыва».

Ключевые слова: ранний онтогенез, изотоп ¹³C, кембрийский взрыв, спин, открытие А.А. Иванова.

В естествознании парадокс – то есть противоречие между тем, что есть и тем, что логически следовало бы ожидать – не всегда столь явен, как в математике. В естествознании обычно требуется привлечь значительный объем знаний и провести некоторую логическую работу, чтобы стала очевидной парадоксальность той или иной ситуации или явления. Но выявление парадокса и его осмысление всегда является мощным стимулом развития системы знания.

Парадоксальность ситуации с возникновением многоклеточных организмов назревала постепенно в течение всего XX столетия. Истоки можно усмотреть и ранее, когда А. Мюррей в 1868 г. обнаружил отпечаток многоклеточного организма в песчаниках Ньюфаундленда, относящихся к докембрийскому геологическому периоду [1]. В то время это открытие, конечно, не было признано.

Сейчас общепризнано, что предки всех трех царств, ныне существующих многоклеточных организмов: животных, растений и грибов, появились по геологическим масштабам времени почти одновременно. Тогда же были уже представлены и большинство типов многоклеточных животных (хордовые, моллюски, плеченогие, членистоногие, иглокожие, разные типы червей и т.д.). И произошло это событие, получившее яркое название «кембрийского взрыва», в интервале 540–510 миллионов лет до нашего времени.

Тут обращают на себя внимание два обстоятельства: почти синхронность появления всех основных вариантов разнообразия многоклеточных и то, что появились они только

тогда, когда прошло уже шесть седьмых всего времени развития жизни на Земле – от ее возникновения, где-то 3,5 миллиарда лет тому назад, до нашего времени. Важно и то, что многие из появившихся тогда организмов по сложности своего строения существенно не уступали их современным потомкам. Современные реконструкции позволяют детально ознакомиться с разнообразием мира кембрийских организмов [2].

Открытия последних нескольких десятилетий в палеонтологии выявили, что «кембрийский взрыв» не первая попытка возникновения многоклеточных, а по крайней мере третья.

Первая по времени возникновения попытка появления многоклеточных так называемая Хайнаньская биота. Обнаружена она китайским палеонтологом Сун Вэйго (Song Weiguo) в 1986 г. в породах, имеющих возраст 840–740 миллионов лет. Несколько позже российский ученый М.Б. Гниловская обнаружила отпечатки похожих организмов в породах Тиманского кряжа, имеющими примерно миллиардный возраст [3,4]. От организмов хайнаньской биоты сохранились только отпечатки – они не имели скелетов, были небольших размеров (несколько сантиметров), имели червеобразную форму.

Значительно ранее была открыта эдиакарская биота. Ее открытие происходило в несколько этапов, но стало общепризнанным после того, как австралийские палеонтологи в сланцевых породах из Южной Австралии, относящихся ко времени 740–600 млн лет тому назад, нашли богатейшую коллекцию отпечатков многоклеточных организмов. Отпечатки в

сланцах позволяют выявить гораздо больше деталей древних организмов, чем ранее найденные отпечатки в крупнозернистых песчаниках. Некоторые эдиакарские организмы достигали полутораметрового размера.

Организмы, относящиеся к хайнаньской и эдиакарской биотам, настолько отличаются по планам своего строения от организмов, возникших при «кембрийском взрыве», и настолько уступают им по сложности организации, что палеонтологи не считают возможным видеть в них предков кембрийской биоты. Следовательно, они не являются предшественниками ныне существующих многоклеточных. Таким образом, многоклеточные возникали на Земле по крайней мере трижды, и первые две попытки были не удачны. (Есть мнение, что многоклеточные организмы возникали в различных таксонах до «кембрийского взрыва» более 20 раз [5]. Но для нашего построения вполне достаточен факт возникновения двух биот до появления предшественников современных многоклеточных. Что-то мешало, чего-то кардинально не хватало для возникновения всего разнообразия современных многоклеточных организмов.)

Чтобы осознать степень удивительности столь большой задержки «кембрийского взрыва», факта неудачи на протяжении 500 миллионов лет возникновения многоклеточных организмов, сравнимых по сложности с современными, и появления в короткий период предков всех трех царств живого и основных типов, необходимо принять во внимание несколько основополагающих фактов.

1. По современным представлениям первые эукариоты (клетки с ядром) появились не позднее 1,4 миллиарда лет тому назад. Есть веские основания полагать, что эукариоты возникли значительно раньше – 2,4–2,2 миллиарда лет назад, когда концентрация кислорода впервые превысила «точку Пастера», т.е. 1%. Это сделало возможным и крайне выгодным для клеток получать энергию посредством окислительного фосфорилирования. И именно тогда мог состояться симбиоз, приведший к образованию эукариотической клетки. Временем появления эукариот называют и 2,7 миллиарда лет назад [6]. Уже тогда в органических остатках обнаруживают стероидные соединения, характерные только для мембран эукариот [7]. Если даже учесть, что в последующие 500 миллионов лет произошло падение концентрации кислорода и повторно точка Пастера была достигнута только 1,9–1,7 миллиарда лет назад, то условия, необходимые для симбиотического появления эукариот, возникли существенно раньше 1,4–

1,0 миллиарда лет. Данные об изменении концентрации кислорода во времени получены Р. Фреем на основании анализа изотопов хрома ^{53}Cr и ^{55}Cr в осадочных породах [8].

2. Одноклеточные эукариоты имеют приблизительно такое же количество генов, как и клетки современных животных и растений, что не менее чем в 100–1000 раз превышает число генов у прокариот. При этом у одноклеточных эукариот уже имеются такие же, как и у современных многоклеточных организмов, хромосомы, представляющие собой надмолекулярные комплексы ДНК, гистонов и негистоновых белков.

3. У древних одноклеточных эукариот митоз и мейоз появился не позднее чем 1,4–1,0 миллиард лет назад. [9]. У красных водорослей, появившихся 1,2 миллиарда лет назад, присутствовал уже сложный половой процесс. А митоз и мейоз, безусловно, самые сложные внутриклеточные процессы, требующие большого количества согласованно во времени работающих генов. Например, при мейозе у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* активируются 360, а у мушки *Drosophila melanogaster* – 82 мейоз-специфичных гена [10,11].

4. Объем информации, необходимый для того чтобы обеспечить два основных процесса онтогенеза – дифференцировку клеток и морфогенез, – у любых современных многоклеточных мал по сравнению с объемом, необходимым для таких внутриклеточных ароморфозов, как появление эукариот, митоза и мейоза.

Последнее утверждение может показаться спорным или даже абсурдным. Поэтому рассмотрим этот вопрос подробнее.

Морфогенезы – такие как возникновение пяти палой руки человека, глаза, черепа, плавника рыбы, уха, шляпки гриба, цветка или крыла птицы – представляются столь завораживающе прекрасными и удивительными, что на первый взгляд явно требуют очень большого объема информации. Однако это неверно. С.В. Петухов на многих примерах морфогенезов показал, что любой морфогенез точно описывается системой всего двух итерационных уравнений с двумя переменными и с постоянными коэффициентами [12]. Например, развитие хвостового плавника рыбы *Lumpenus lampetraciformis*, по экспериментальным данным Л.С. Берга, может быть описано в пространстве проективной геометрии по С.В. Петухову следующими итеративными уравнениями:

$$\begin{aligned}x_{k+1} &= (0,83x_k + 1,27y_k - 2,26)/(-0,05y_k + 1), \\y_{k+1} &= (0,14x_k + 0,91y_k - 3,26)/(-0,05y_k + 1).\end{aligned}$$

Совершенно очевидно, что для реализации такого процесса требуется совсем немного информации. Это утверждение приобретает еще большую весомость, если учесть, что двух тканево- и органоспецифических биохимических систем достаточно для самой реализации целостности, механической прочности, метаболического единства, контроля деления клеток и размеров органа, поддержания дифференцированного состояния и адаптации. Это тканеспецифические факторы адгезии (контактыны) и тканево-специфические регуляторы активности митохондрий (комутоны). Существенно, что контактыны и комутоны видово и классово неспецифичны. Это очень древние и консервативные системы. Им-то или прямо от них зависящим характеристикам и могут соответствовать переменные в уравнениях Петухова [13, 14].

Очень красивое экспериментальное доказательство достаточности малого количества генов, необходимых для определения важной морфогенетической характеристики – право- или левозакрученности всего организма улиток, – было получено А. Стёрвантом еще в 1923 г. Он использовал методы классической генетики и с их помощью показал, что право-лево-закрученность раковины у *Limnaea* полностью зависит от генотипа материнского организма (т.е. определяется свойствами цитоплазмы яйцеклетки) и детерминируется всего одним геном [15].

С позиций биохимии дифференцировка соответствует специфическому для каждой ткани органа профилю синтезируемых веществ, прежде всего, конечно, белков. С позиций генетики каждой разновидности дифференцировки соответствует свой паттерн активности генов. Этот паттерн устойчив в череде поколений соматических клеток. Вместе с тем большинство соматических клеток содержат весь объем генетической информации, достаточный для развития целого организма, включая производство половых клеток, соответствующих полу индивида.

Сейчас уже известны основные механизмы, которые регулируют активность генов в онтогенезе животных, растений и грибов. Они несколько отличаются у царств и типов многоклеточных организмов, но принципы регуляции генов в них общие.

Перечислим эти механизмы:

1. Метилирование нуклеотидов в молекуле ДНК (в основном цитозина в паре CpG).

2. Метилирование, ацетилирование, фосфорилирование и другие реакции модификации

гистонов – основных белков нуклеопротейного комплекса, формирующего хромосомы.

3. Механизм «интерференции si-РНК и mi-РНК».

Надо отметить, что механизм метилирования оснований ДНК очень древний, он был уже у прокариот и являлся у них важным элементом защиты от вторжения чужеродной ДНК. Гистоны были у одноклеточных эукариот. Таким образом, основные механизмы регуляции генома в онтогенезе многоклеточных были заготовлены задолго до их даже первого, не слишком удачного появления. Создается впечатление, что знания о принципах биохимической регуляции активности генов в онтогенезе не приближает нас к пониманию причины эволюционного парадокса такой огромной временной задержки появления предков современных многоклеточных.

Таким образом, эволюционный парадокс огромной временной задержки появления предков современных многоклеточных состоит в том, что задолго до «кембрийского взрыва» существовали уже все основные необходимые для него информационно емкие элементы (ядерная клетка, хромосомы, митоз, мейоз, механизмы изменения активности генов – метилирование ДНК, метилирования, ацетилирование, фосфорилирование гистонов и т.д.). И чем дальше вглубь времен новые достижения палеонтологии и геномики отодвигают появление первых многоклеточных, тем удивительней выглядит парадокс. Совершенно не спасают ситуацию находки возможных прямых предков современных многоклеточных в позднем эдиакаре. Конечно, незадолго до очевидного «кембрийского взрыва» такие организмы должны были появиться! Но почему же они не появлялись в течение миллиарда лет! Эволюционный парадокс усугубляется еще и тем, что по данным геномики одноклеточные предки животных растений и грибов разошлись никак не позднее 1,1 миллиарда лет назад, а вероятно, еще раньше: предки растений и животных – 1,6 миллиардов тому назад, предки грибов и животных – 1,5 миллиарда лет [16]. Так что «кембрийский взрыв» происходил независимо у животных, растений и грибов. Но почему около миллиарда лет не возникали многоклеточные организмы, по сложности строения сравнимые с современными!? Ведь основные процессы, определяющие современные многоклеточные организмы – дифференцировка клеток и морфогенезы – не требуют большого объема информации! Что-то в таком рассуждении не учитывается, и над этим «что-то» эволюции пришлось потрудиться около миллиарда лет.

Попробуем докопаться до этого «чего-то»!

В эмбриологии сложилось устойчивое представление, что различия паттернов генной активности, по крайней мере на первых этапах эмбриогенеза, соответствующих моруле, задается физико-химическими различиями участков цитоплазмы яйцеклетки, в которых оказываются ядра бластомеров. Наглядной иллюстрацией этого принципа является раннее развитие асцидии *Styela partita*. У этого организма разные участки цитоплазмы яйцеклетки имеют различные цветовые оттенки. Из бластоцитов, оказавшихся в разных по цвету областях цитоплазмы, формируются в дальнейшем разные ткани. Из клеток, расположенных в наиболее светлых областях, формируется эктодерма, из расположенных в зоне цитоплазмы с голубыми включениями – экзодерма, из зоны желтой цитоплазмы – мезодерма и т.д. [17].

Нетрудно понять, что точность исполнения всего онтогенеза решающим образом зависит от точности детерминации паттернов активности генов в первых двух различных группах бластомеров, соответствующих эндо- и эктодерме. Уже паттерн генной активности клеток третьего зародышевого слоя – мезодермы – является очевидным продуктом взаимодействия двух первоначальных программ. Это совершенно наглядно видно при формировании мезодермы у моллюсков. В раннем онтогенезе *Potella vulgate* прослежена судьба каждой клетки, при этом клеткам присвоены символы: буква и цифра. Так вот, клетки мезодермы образуются из более мелких бластомеров анимального полюса после того, как один из крупных бластомеров вегетативного полюса, а именно 3Д, образует выросты в бластоцель и приходит в контакт с ними. Если такой контакт предотвратить, из бластомеров анимального полюса мезодерма не образуется [18]. Нетрудно себе представить, что далее путем подобного взаимодействия программ, возникших на предыдущем этапе онтогенеза, получается все имеющееся разнообразие дифференцировок.

Следует иметь в виду, что когда говорят о программах применительно к онтогенезу, это понятие далеко не тождественно таковому в математическом программировании. В онтогенезе материальные элементы, соответствующие тем или иным элементам информационных программ, при взаимодействии программ могут различным образом материально влиять друг на друга, возможны также обмены материальными носителями.

Это факты и простые рассуждения позволяют осознать строгость требования к точности определения первых двух паттернов генной ак-

тивности и посеять сомнение в возможности выполнения этого требования за счет различий физико-химических условий цитоплазмы.

Высокая точность исполнения генетической программы требует, по всей видимости, дискретного принципа выбора того, какие гены активировать или инактивировать на первом этапе дифференцировки. Едва ли требуемая точность может быть достигнута при «аналоговом» механизме детерминации генной активности (за счет отличий физико-химических параметров). Дискретный механизм кодирования заложен в самой генетической матрице, но при первой дифференцировке в каждом из двух первых типов клеток матрицы тождественны. Для того чтобы «аналоговый» механизм смог вызвать безошибочные два различных аккорда на основе тождественных экземпляров генетической матрицы, эти экземпляры должны совершенно детерминированно различаться, оставаясь, конечно, тождественными по последовательности нуклеотидов. Более того, эти детерминированные отличия должны существовать только в раннем онтогенезе, каким-то образом «стираясь» при последующем развитии и закономерно возникая вновь на первых делениях дробления! Можно сказать, фантастические требования. Но, забегаая вперед, скажу: природа все-таки создала механизм, полностью удовлетворяющий этим требованиям, а обнаружил его А.А. Иванов. А теперь по порядку.

Возвращаясь к эволюционному парадоксу возникновения многоклеточных, отмечу, что изложенные выше классические представления эмбриологии никак не помогают его разрешить.

Несмотря на наличие этих парадоксов и в палеонтологии и в эмбриологии, все было тихо и мирно. Исследователи, увлеченные решением частных задач, предпочитали не замечать взрывоопасности ситуации. Но взрыв назрел и произошел, и произошел он с весьма неожиданной для большинства стороны!

Андрей Александрович Иванов сделал удивительное открытие: если лишить растение или животное источника изотопа углерода ^{13}C , то их жизнедеятельность и развитие происходит нормально, но потомство они дать не могут – семена не прорастают, яйцеклетки животных не развиваются [19,20].

Следует подчеркнуть, что это грандиозное по своему значению открытие было сделано совсем не случайно. Сам по себе опыт – выращивание растений в атмосфере, лишенной изотопа углерода ^{13}C , и выкармливание животных пищей, не содержащей этого изотопа, – требует очень тщательной и сложной подго-

товки. Чтобы такой опыт поставить, нужно было иметь четко сформулированную идею.

А.А. Иванов шел к своему открытию планомерно. Исходная идея, определяющая интерес к роли изотопии для жизни, была почерпнута, вероятно, из трудов В.И. Вернадского [21]. А.А. Иванов работает в ГЕОХИ РАН непосредственно под руководством директора института академика Э.М. Галимова. Галимов и его школа систематически изучают природные механизмы (и в частности, механизмы биологические) фракционирования изотопов и природу глобальных вариаций изотопного состава различных сред и объектов в геологической истории [22,23].

Еще в 2004 г. была опубликована работа Иванова «The conformational effect of isotopy – a determination factor for cell differentiation» [24]. В названии работы был ясно обозначен вектор исследований.

Далее Ивановым и соавторами было последовательно показано следующее.

1. При синтезе ДНК нуклеотиды, содержащие изотоп ^{13}C , включаются в макромолекулу с заметно меньшей вероятностью по сравнению с нуклеотидами, не содержащими тяжелого изотопа углерода. В результате этого явления пул свободных нуклеотидов в пробирке, в которой проводили последовательный цикл синтеза ДНК, используя полимеразную цепную реакцию, однонаправленно обогащался нуклеотидами с ^{13}C . Следовательно, молекулы ДНК, синтезируемые на поздних циклах, оказывались все более обогащенными нуклеотидами с тяжелым изотопом углерода [25].

2. При исследовании изменений изотопии углерода молекул ДНК в бластомерах лягушки, в ходе онтогенетического развития на ранних стадиях дробления, было обнаружено явление последовательного обогащения цепей ДНК тяжелым изотопом углерода. Автор справедливо отмечает, что этот результат следовало ожидать в свете явления упомянутого в пункте 1 и, что особенно существенно, есть веское соображение, заставляющее полагать всеобщность его для всех многоклеточных организмов [19]. Бластомеры до стадии гастрюлы формируются из материала яйцеклетки, а ДНК бластомеров – из пула нуклеотидов, находящихся в цитоплазме яйцеклетки. При этом очевидно, что суммарное количество ДНК возрастает в сотни раз и цепи ДНК, синтезируемые на последних делениях дробления молекулы ДНК, будут состоять преимущественно из нуклеотидов, содержащих хотя бы один тяжелый изотоп углерода. Один атом изотопа ^{13}C приходится на 100 атомов ^{12}C . В нуклеотиде десять атомов углерода, сле-

довательно, в обычных условиях один из десяти нуклеотидов может содержать тяжелый изотоп углерода.

Но на последних этапах образования морулы пул оставшихся нуклеотидов будет состоять преимущественно из нуклеотидов, содержащих изотоп ^{13}C .

3. Было показано, что есть существенное различие метилирования «легких», «гибридных» и «тяжелых» цепей ДНК [19].

На основании этих данных автор предвидел результаты замечательных экспериментов, о которых было сказано выше, в которых была показана необходимость изотопа ^{13}C для того, чтобы могло произойти развитие растения (*Arabidopsis Thaliana*) или многоклеточного животного (тли). И опыт полностью подтвердил эти предположения.

Кроме того, выяснились интересные подробности.

Насекомые, потреблявшие постоянно листья салата, выращенные в атмосфере, не содержащей изотопа ^{13}C , через некоторое время отказывались от еды и погибали. Если же тлей кормили листьями салата всего четыре часа, а потом предлагали им обычный корм, то насекомые не погибали, но потомства не приносили. Лишь в редких случаях отмечались abortивные выбросы недоразвитых зародышей.

Одноклеточная водоросль хлорелла в среде, не содержащей изотопа ^{13}C , растет и размножается, но при этом отмечается некоторое угнетение фотосинтеза. Если кормить дафний хлореллой без изотопа ^{13}C , то размножение их полностью останавливается, хотя дафнии нормально питались и доживали положенный срок.

А.А. Иванов специально отмечает очень интересный момент: отличие реакции дафний на моноизотопные по ^{12}C и ^{13}C среды. По предложению Э.М. Галимова был поставлен следующий эксперимент. Предварительно вырастили хлореллу в атмосфере, содержащей 99% ^{13}C и 1% ^{12}C . Дафнии на таком корме жили, но не размножались, т.е. наблюдается как бы полная симметрия биологического эффекта изотопов. Но если через три недели у дафний, выращенных на хлорелле без изотопа ^{13}C , сменить кормление на хлореллу с ^{13}C – через двое суток появляется потомство. У дафний, выращенных на хлорелле, содержащей преимущественно изотоп ^{13}C , переключение не восстановило размножения. Только через две недели кормления хлореллой ^{12}C и еще неделю кормления нормальной по изотопному составу хлореллой удалось получить два детеныша дафний. И эти две особи через десять дней принесли

потомство, причем более обильное, чем обычно. В этом опыте видна явная асимметрия биологического действия изотопов ^{12}C и ^{13}C . Для нормального онтогенеза требуется, чтобы изотопа ^{13}C было существенно меньше. «Асимметрию», вероятно, легче понять, полагая, что биологически главным различием изотопов является наличие спина у изотопа ^{13}C .

Открытие такого фундаментального явления – необходимости определенного соотношения изотопов углерода для возможности осуществления онтогенеза, по мнению автора, позволяет следующим образом объяснить эволюционный парадокс огромной задержки появления предков современных многоклеточных и предшествующие этому событию, случившемуся в кембрии, неоднократные неудачные попытки появления многоклеточных со «сложным» строением.

«Многоклеточный уровень жизни на Земле закрепился более чем через 2 миллиарда лет после предбиологического начала. Одной из причин этого феномена могла быть недостаточность буферной стабильности органического и неорганического углерода, так как в этом случае, и это убедительно показывают приведенных экспериментов, нарушается эмбриогенез многоклеточных организмов» [19].

Сразу же необходимо заметить, что такое разъяснение эволюционного парадокса представляется крайне неубедительным. Во-первых, с эволюционной точки зрения для предложенного автором механизма онтогенетической детерминации первого этапа дифференцировки (а я полагаю его по сути правильным) эволюционному процессу не представляет никакой сложности преодолеть в масштабах геологического времени даже значительные колебания отношений $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Для этого достаточно просто увеличить или уменьшить число делений дробления на одно-два деления. А такое явление происходит, например, при изменении плоидности, и оно совершенно заурядно. Так, увеличение плоидности вдвое сокращает на единицу число делений дробления у *Xenopus* [26,27].

Во-вторых, (но это второстепенно) именно на начало кембрия, когда и появились предки современных многоклеточных организмов, происходят резкие колебания изотопии углерода.

А.А. Иванов приводит и второй довод, позволяющий объяснить, по его мнению, эволюционный парадокс:

«Другой причиной, а по значению, как предполагается, возможно и первой – нестабильность гравитации в первые два миллиарда лет, так как Земля и Луна находились гораздо ближе

друг к другу... Сочетание действия изотопии и гравитации создавало высокую нестабильность для работы изотопных эффектов» [27].

Это объяснение эволюционного парадокса еще более несостоятельно. Во-первых, парадокс-то состоит в том, что большая задержка времени возникновения многоклеточных организмов была после возникновения эукариот и появления у них мейоза и митоза. А эти события случились в интервале 1,8–1,4 миллиарда лет назад, когда никакой чрезмерной нестабильности гравитации уже не было. Тем более очевидно, что существенной разницы между вариабельностью гравитационного поля в эдиакаре и в кембрии не существовало.

Во-вторых, отдавая ведущую роль гравитации в проявлении найденных эффектов изотопии, автор полагает, что главное значение имеет разница масс между изотопами ^{12}C и ^{13}C (составляющая всего 8%). В то же время различие спинов (есть у ^{13}C и нет у ^{12}C) представляется гораздо существеннее (подробности см. ниже). А на спиновые эффекты изотопов гравитация, естественно, не влияет.

Таким образом, в интерпретации автора найденное им замечательное явление – решающая роль изотопа ^{13}C для онтогенеза многоклеточных организмов – не только не разрешает эволюционного парадокса, но усугубляет его. Ведь для того чтобы работал механизм обогащения ДНК в ходе делений дробления, достаточно, чтобы яйцеклетка имела оболочку, заключающую в себе делящиеся бластоциты, хотя бы до стадии гастролы. Все остальное происходит автоматически.

Если анализировать логически предлагаемое автором объяснение механизма детерминации двух паттернов генной активности, возникающих в начале эмбриогенеза (а именно на стадии морулы), то возникает явная нестыковка. Ведь должны возникнуть два разных и совершенно определенных точных паттерна. Как же стохастический процесс включения разнотопных нуклеотидов позволяет достичь требуемой точности. Слово «паттерн» так и хочется заменить словом аккорд. Два аккорда должны быть взяты без малейшей фальши. Именно это есть главное условие возможности свершения сложного онтогенеза. И именно над этим, вероятно, трудилась эволюция не одну сотню миллионов лет, пока, наконец, в кембрии (или чуть раньше) как бы вдруг не завершила успешно этот процесс – и сразу все получилось!

Такая постановка вопроса открывает путь для понимания эволюционного парадокса и механизма реализации изотопного эффекта в онтогенезе. Требуется выяснить, как стохастиче-

ский по своей природе процесс включения нуклеотидов с ^{13}C -изотопом приводит к строго детерминированному паттерну активности генов. Наиболее правдоподобный ответ дает такое представление.

В геноме существуют протяженные участки, которые при соответствующей их модификации эпигенетическими механизмами (метилование цитозина в паре цитозин–гуанин, ацетилирование гистонов, «интерференция» РНК) строго детерминируют активность соответствующих генов. А возможность модификации этих участков решающим образом зависит от спиновой концентрации, определяемой изотопом ^{13}C по фундаментальному механизму взаимодействия спиновых полей макроскопических объектов. Вот на создание этих протяженных участков генома и их локализацию в нем эволюция и затратила миллиард с лишним лет! И это удивительно – ведь до завершения работы видимого смысла для одиночной клетки эти участки не имеют.

Сначала уточним время, когда в эмбриогенезе реализуется изотопный эффект.

Рассмотрим этот вопрос на примере развития эмбриона человека. Ведь есть веские основания полагать, что феномен Иванова универсален: обогащение цепей ДНК нуклеотидами с ^{13}C при делениях дробления не может не происходить. Также маловероятно, что эволюция «могла отказаться» от использования со столь большим трудом освоенного явления.

Необходимо существенно уточнить картину изменения соотношения изотопов углерода в ДНК в ходе делений дробления. Иванов экспериментально показал, что пул свободных нуклеотидов по мере деления бластоцитов и синтеза ДНК однонаправленно обогащается нуклеотидами, содержащими тяжелый изотоп углерода. Из этого факта он делает вывод о том, что по мере синтеза ДНК нити макромолекулы будут постоянно обогащаться изотопом ^{13}C . Это, очевидно, не верно. Первые три–четыре–пять делений дробления, когда обогащение пула свободных нуклеотидов изотопом ^{13}C незначительно, синтезируемые молекулы ДНК будут обеднены тяжелым изотопом. Утверждая это, я исхожу из предположения, что пул нуклеотидов яйцеклетки рассчитан на синтез около 200 копий ДНК, т.е. на семь–восемь делений дробления, как, например, у зародыша человека, развитие которого рассматривается далее. Обогащение вновь синтезируемых нитей ДНК тяжелым изотопом углерода будет происходить только тогда, когда избыток ^{13}C в пуле нуклеотидов обеспечит превалирование над процессом дискриминации включения в молекулу

«тяжелых» нуклеотидов. А эта ситуация неизбежно наступает на последних двух делениях дробления (перед растворением мембраны яйцеклетки). В результате значительно более чем в половине клеток содержится ДНК, существенно – в несколько раз – обогащенная нуклеотидами с ^{13}C . В части клеток обогащены обе цепи молекулы ДНК, в части – одна из цепей. Клеток, у которых обе цепи «легкие» – меньшинство. Но после того, как пул нуклеотидов исчерпан и мембрана, окружавшая бластоцит, растворилась, синтезируются только легкие цепи ДНК. И именно тогда через одно–два деления бластоцитов после разрушения мембраны яйцеклетки возникает ситуация, наиболее «удобная» для двух различных и строго детерминированных прочтений генетической программы и образования двух примерно равных по числу клеток зародышевых листков. Потому что именно тогда численности клеток с «легкими» и «тяжелыми» ДНК приблизительно равны, и отличие ДНК по плотности нуклеотидов с ^{13}C – максимально контрастна. Именно в этот период развития следует ожидать образования двух зародышевых слоев – эктодермы и энтодермы.

Проследим теперь, как такое прочтение «феномена Иванова» вписывается в хорошо изученную картину развития зародыша человека.

Через 30 ч после оплодотворения происходит первое деление дробления – образуются две дочерние клетки. Если каждый из бластомеров заключен в свою оболочку – получаются однайцевые близнецы. Экспериментальная эмбриология убедительно свидетельствует, что у лягушек, тритонов и морских ежей каждый из двух бластомеров, будучи разделен, дает начало полноценному организму в два раза меньшего размера [28].

Через 40 ч – четыре бластомера.

Через 48 ч – восемь бластомеров. Экспериментальная эмбриология доказала, что у мыши каждый из восьми бластомеров способен образовать нормальный организм мыши.

Через 72 ч – 16 клеток в общей оболочке формируют морулу.

На четвертые сутки морула в общей плазматической мембране яйцеклетки достигает матки. По истечении 96 ч в моруле 32 клетки. В ее центре образуется полость – бластоциста – и небольшая группа клеток, расположенная внутри (эмбриобласт) дает начало будущему эмбриону, а большая часть из этих 32 клеток формируют внешнюю клеточную оболочку – трофобласт, в будущем обеспечивая питание эмбриона.

144 ч (истекли шесть суток). Блостоциста представлена 128 клетками. Начинается ее имплантация в матку. Только на седьмые сутки общая мембрана блостоцисты разрушается и далее зародыш питается за счет организма матери. Важнейший момент для нашей модели. С этого времени клетки зародыша синтезируют «легкую» ДНК, т.е. с малым количеством изотопа ^{13}C . Очевидно, что тяжелая ДНК была синтезирована на шестом-седьмом делении (на пятые-шестые сутки). Отметим, что у 67% однойцовых близнецов хорион общий, т.е. разделение эмбриобласта произошло после формирования трофобласта (позже 96 ч). Если разделение эмбриобласта происходит после 192 ч (восемь суток), возникнут сиамские близнецы того или иного варианта.

На восьмые сутки начинаются гастрюляции. Число клеток резко возрастает.

На девятые сутки появляются два зародышевых листка – эктодерма (дает начало мозгу, сердцу, органам чувств) и энтодерма (дает начало пищеварительной и дыхательной системам).

Только на третьей неделе формируется третий зародышевый листок – мезодерма. Из нее возникают кости, хрящ, другие типы соединительной ткани.

Интересно, что дальше развитие происходит столь стремительно, что уже на 17-е сутки зародыш достигает размера 1,1 см. Появляются сосуды, позвоночник, мозг, глаза. С этого момента плод видит сны.

14 суток потребовалось, чтобы сформировать всего три зародышевых листка, далее за три дня возникают мозг, глаза, сосуды, позвоночник! В онтогенезе, как и в эволюции, долго и трудно (девять суток) осуществляется реализация двух первых программ, четверо суток уходит на создание «гибрида» двух первых программ, а далее понеслось...

Предсказание времени и условий прочтения двух изотопно различных вариантов генома на основе нашего понимания феномена Иванова полностью оправдалось. Оно началось только через два дня после ликвидации обогащенного ^{13}C изотопом пула нуклеотидов и двух дополнительных циклов клеточного деления в условиях, когда могут синтезироваться только «легкие» молекулы ДНК. До этого момента никакой детерминации прочтения генома не реализуется, о чем свидетельствует появление полноценных однойцевых близнецов.

Что можно сказать о механизме, который обеспечивает различное и строго детерминированное прочтение, различающихся только по

концентрации нуклеотидов с тяжелым изотопом углерода?

Во-первых, вовсе не следует сбрасывать со счета значение различий физико-химических условий, возникающих из-за особенностей областей цитоплазмы яйцеклетки и «градиентов». Изотопный механизм должен только кардинально повысить надежность работы «физико-химического» механизма. И это полезно иметь в виду при постановке модельных экспериментов.

Во-вторых, в реализации изотопного эффекта решающую роль, безусловно, играет отличие изотопов по спине, а не по массе. Авторы работы [29] еще в 2005 г. показали, что изотопы магния, не имеющие спина (^{24}Mg и ^{26}Mg), одинаково влияют на синтез ДНК полимеразой, в то время как имеющий спин изотоп ^{25}Mg подавляет эту реакцию в три-пять раз по сравнению с бесспиновыми изотопами.

В-третьих, изотопный эффект очень сильно зависит от концентрации данного элемента в растворе. Эта зависимость имеет пороговый характер. А.П. Орлов убедительно показал это на примерах влияния изотопов магния и цинка на каталитическую активность фосфотидтрансфераз. При этом ярко выраженную пороговую зависимость от концентрации имеет и магнитный изотопный эффект в слабых магнитных полях. Например, при концентрации хлористого магния 0,6 мМ изотопы ^{24}Mg и ^{25}Mg имеют одинаковый эффект на скорость ДНК-полимеразной реакции, а при концентрации 1,0 и 2,0 мМ наблюдается различие влияния этих изотопов на эту реакцию в 2,3 раза и притом одинаково при обеих концентрациях [30,31]!

Если влияние концентрации элемента для проявления влияния спина изотопа столь значительно в растворе, то следует ожидать значительно более выраженного влияния плотности спинов в цепочке молекулы ДНК на ее взаимодействие с другими молекулами (например, РНК). В этом случае в полной мере должно проявиться пятое фундаментальное взаимодействие – взаимодействие спиновых полей макроскопических объектов [32,33]. А для этого взаимодействия, взаимодействия не локального, в первом приближении важна именно средняя плотность спинов на сравнительно протяженном участке. Протяженность участка ДНК от тысячи пар нуклеотидов для того, чтобы усреднение дало бы строго детерминированный результат, конечно, достаточна. А как раз такова и протяженность CpG-островов.

Метилирование ДНК по цитозину, находящемуся в паре CpG, представляется обоснован-

ным кандидатом на основной механизм определения и поддержания дифференцировки клеток, по крайней мере, у растений, моллюсков и позвоночных [34]. Известны метилазы метилирующие *de novo* и метилазы, с большой точностью воспроизводящие паттерн метилирования. Но между изотопным паттерном Иванова и последующими паттернами метилирования, вероятно, находится промежуточный механизм – РНК-интерференции [35]. Не у всех многоклеточных роль метилирования ДНК столь значительна, как у позвоночных и растений. У насекомых, например, она гораздо скромнее. В общем можно ожидать, что феномен первичной изотопной детерминации генетической матрицы универсален. Универсально, вероятно, и использование пятого фундаментального взаимодействия – взаимодействия спиновых полей – для прочтения различающихся по концентрации изотопов нитей ДНК. А далее вполне следует ожидать значительного разнообразия конкретных биохимических механизмов реализации дифференцировки и различных вариантов их взаимодействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Точность двух различных прочтений генетической информации при формировании эндо- и эктодермы – необходимое условие реализации всего онтогенеза сложно организованных многоклеточных организмов. Физико-химические различия разных областей цитоплазмы яйцеклетки, по-видимому, не могут сами по себе обеспечить необходимую точность. А.А. Ивановым было показано, что неизбежно формирующееся на стадии дробления в замкнутой среде яйцеклетки различие копий ДНК по изотопии углерода необходимо для успешности онтогенеза. Привлечение этого явления и пятого фундаментального взаимодействия – взаимодействия спинов макроскопических объектов – позволяет непротиворечиво объяснить и то, как стохастическое включение нуклеотидов, содержащих изотоп ^{13}C со спином, может строго детерминировать прочтение матриц ДНК, и почему произошла столь значительная задержка «кембрийского взрыва». Сотни миллионов лет потребовались эволюции для создания регуляторных протяженных участков ДНК и должного распределения их по геному. Эти участки (среди них, вероятно, важную роль играют CpG-островки), в детерминации прочтения которых в раннем онтогенезе решающую роль

играет различие концентрации ^{13}C , приобретают смысл только по завершении всего процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. G. Gehling, G. M. Narbonne, and M. M. Anderson, *Paleontology* **43**, 429 (2000).
2. <http://www.core-orsten-research.de>
3. М. Б. Гниловская, Докл. АН СССР **359** (3), 369 (1998).
4. М. Б. Гниловская, А. Ф. Вейсс, Ю. Р. Беккер и В. Г. Оловянишников, Стратиграфия. Геологические корреляции **8** (4), 11 (2000).
5. L. W. Buss, *The evolution of individuality* (Prinst. Univ., 1987).
6. А. В. Марков, Палеонтол. журн. **2**, 3 (2005).
7. J. J. Brooks, G. A. Logan, R. Buick, and R. E. Summons, *Science* **5430** (1999).
8. R. Frei, C. Gaucher, S. W. Paulton, and D. E. Canfield, *Nature* **461** (2009).
9. Ю. Ф. Богданов, Журн. общ. биологии **69**, 2 (2008).
10. Ю. Ф. Богданов, Генетика **36**, 4 (2006).
11. Т. М. Гришаева и Ю. Ф. Богданов. Генетика **36** (10), 1301 (2000).
12. С. В. Петухов, *Геометрия живой природы и алгоритмы самоорганизации* (М., 1988).
13. А. Г. Маленков и Е. А. Модянова, *Биологические основы профилактики и нетоксической терапии рака* (М., 2006).
14. G. M. Elbakidze and A. G. Elbakidze, *Principles of tissue growth intratissue regulation* (2009).
15. А. Н. Стуртуант, *Science* **58**, 269 (1923).
16. М. А. Федонкин, в кн. *Проблемы геологии и минералогии. Сборник статей, посвященный 70-летию акад. Н.П. Юшкина* (Геопринт, Сыктывкар, 2006), сс. 331–350.
17. В. I. Balinski, *Introduction to Embriology* (Saunders, Philadelphia, 1981).
18. J. A. M. Biggelaar and van der Guerrier, *Devel. Biol.* **68**, 462 (1979).
19. А. А. Иванов, *Природа регулярности онтогенеза* (М., 2014).
20. Э. М. Галимов, А. А. Иванов, В. С. Севастьянов и О. В. Кузнецова, в сб. *Матер. 19 симп. по геохимии изотопов им. академика А. П. Виноградова* (2010).
21. В. И. Вернадский, Работы Гос. радиового ин-та **3** (1926).
22. Э. М. Галимов, *Природа биологического фракционирования изотопов* (М., 1981).
23. Э. М. Галимов, *Геохимия* № 8, 787 (1999).
24. А. А. Иванов, in *Proc. Intern. Conf.* (Warsaw, 2004).
25. А. А. Иванов and V. S. Sevastyanov, in *Abstr. Book of the Int. Congr. on Analytical Sciences (ICAS-2006)*, (Moscow, 2006).
26. J. W. Newport and M. W. Kirschner, *Cell* **30**, 675 (1982).

27. J. W. Newport and M. W. Kirschner, *Cell* **30**, 687 (1982).
28. H. Spemann, *Embryonic development and induction* (New Haven, 1938).
29. A. Buchachtnko, D. Kouznetzov, M. Orlova, and A. Markarian, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (31), (2005).
30. А. П. Орлов, Автореферат к.х.н. (М., 2013)
31. А. Л. Бучаченко, *Успехи химии* **83**, 1 (2014).
32. А. В. Бобров, *Журн. формирующихся направлений науки*, № 1 (2013).
33. А. В. Бобров, *Журн. формирующихся направлений науки*, № 2 (2013).
34. Б. Ф. Ванюшин, *Метилирование ДНК у растений. Механизмы и биологическая роль* (Наука, М., 2009).
35. В. А. Галицкий, *Цитология* **50** (4), 277 (2008).

^{13}C , the Ontogenesis and the Paradox of Evolution

A.G. Malenkov

Russian Academy of Natural Sciences, Varshavskoe shosse, 8, Moscow, 117105 Russia

The precise reading of two variants of genetic information is the necessary condition to realize the ontogenesis of highly organized multicellular organisms. To improve the understanding of ontogenesis, it is not enough to know about a physicochemical difference between different regions of the cytoplasm of an egg. A.A. Ivanov showed that the formation of differences in isotopic ^{13}C content of the DNA copies during early ontogenesis is the required condition for a successful termination of the whole ontogenesis. Taking this fact and the fifth fundamental interaction (interaction of the spins of the macroscopic objects) into account, it is possible to understand a great delay of the Cambrian explosion.

Keywords: early ontogenesis, isotope ^{13}C , Cambrian explosion, spin, discovery made by A.A. Ivanov