

^{13}C , онтогенез и парадокс ЭВОЛЮЦИИ

А.Г. Маленков¹

Аннотация—Открытие А.А. Иванова - установление необходимости ^{13}C для успешного завершения ранних стадий онтогенеза животных и растений - даёт возможность по-новому посмотреть на феномен 'Кембрийского взрыва' и 'неудач' появления многоклеточных сложных организмов на протяжении более 0,5 млрд. лет (Хайнаньская и Эдиакарские биоты). Пятое фундаментальное взаимодействие - взаимодействие спиновых полей макрообъектов позволяет объяснить, как ^{13}C может обеспечить строгую детерминацию прочтения изотопно различных копий ДНК в раннем онтогенезе и почему эволюции потребовались сотни миллионов лет, чтобы реализовать возможности этого механизма.

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 объём 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.

I. ДАННЫЕ ПАЛЕОНТОЛОГИИ О ВОЗНИКНОВЕНИИ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ

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, р. 429]. В то время это открытие, конечно, не было признано.

Сейчас общепризнано, что предки всех трёх 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 её возникновения, где-то 3,5 миллиарда лет тому назад, до нашего времени. Важно и то, что многие из появившиеся тогда организмов по сложности своего строения существенно не уступали их современным потомкам [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 - т.н. Хайнаньская биота. Обнаружена она китайским палеонтологом Сун Вэйго (Song Weiguo) в 1986 г. в породах, имеющих возраст 840-740 миллионов лет. Несколько позже российский учёный М.Б. Гниловская обнаружила отпечатки похожих организмов в породах Тиманского кряжа, имеющих примерно миллиардный возраст [3, с.369-372], [4, с.11-39]. От организмов хайнаньской биоты сохранились только отпечатки - они не имели скелетов, были небольших размеров (несколько сантиметров) и имели червеобразную форму.

Значительно ранее была открыта эдиакарская биота. Её открытие происходило в несколько этапов, но стало общепризнанным после того, как австралийские палеонтологи в сланцевых породах из Южной Австралии, относящихся ко времени 740,6 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. См. рис. 1, 2, 3.

Организмы, относящиеся к хайнаньской и к эдиакарской биотам, настолько отличаются по планам своего строения от организмов, возникших при 'кембрийском взрыве' (рис. 4, 5), и настолько уступают им по сложности организации, что палеонтологи не считают возможным видеть в них предков кембрийской биоты, и, следовательно, они не являются предшественниками ныне существующих многоклеточных. Таким образом, многоклеточные возникали на Земле, по крайней мере, трижды, и первые две попытки были неудачны. (Есть мнение, что многоклеточные организмы возникали в различных таксонах до 'кембрийского взрыва' более 20 раз [5]). Но для нашего построения вполне достаточен факт возникновения дву-

¹ Д.б.н., профессор, акад. РАЕН, barsuk-13@mail.ru.

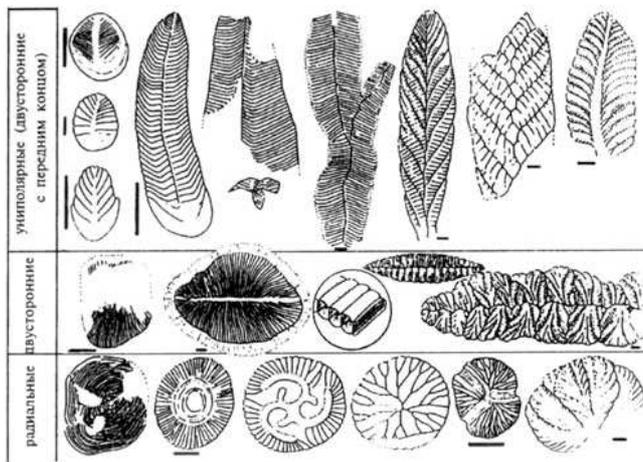


Рис. 1. Различные варианты симметрии многоклеточных организмов Эдиакара (источник: http://wsyachina.narod.ru/earth_sciences/vendobionty_2.html).

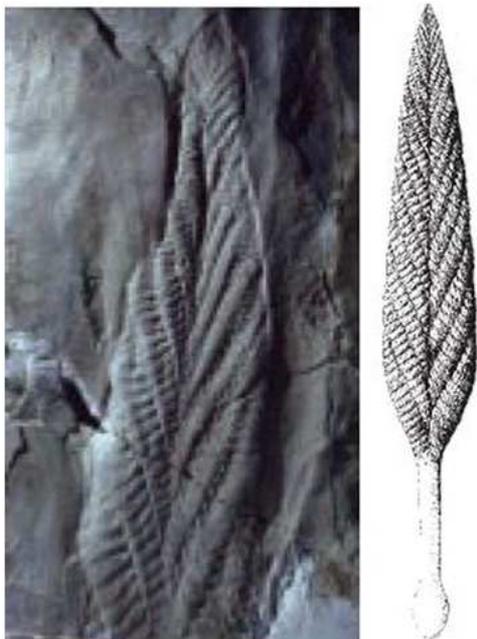


Рис. 2. Чарния (поздний венд, Архангельская обл., Зимние горы). Реконструкция чарнии. Источник: http://www.paleontology.ru/himiya_i_jizn.php.

биот до появления предшественников современных многоклеточных. *Что-то мешало, чего-то кардинально не хватало для возникновения всего разнообразия современных многоклеточных организмов.*

II. ЧТО УЖЕ БЫЛО У ЭУКАРИОТ ДО ВОЗНИКНОВЕНИЯ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ И ЧЕГО ИМ НЕ ХВАТАЛО

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



Рис. 3. Уникальный экземпляр диккинсии с отпечатком пищеварительной системы (поздний венд, Архангельская обл., Зимние горы). Источник: http://www.paleontology.ru/himiya_i_jizn.php.



Рис. 4. Кембрий: трилобит с деталями строения. Источник: <http://dic.academic.ru/pictures/wiki/files/65/Asaphiscuswheelerii.jpg>.



Рис. 5. Кембрий: аномалокарис. Гигантский паук, как думали, "пожиратель трилобитов" (но сейчас выяснилось - он был вовсе не хищник). Источник: http://paleoimperia.ru/?page_id=2354.

всех трёх 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. Называют 2,7 миллиардов лет назад, как время появления эукариот [6]. Уже тогда в органических остатках обнаруживают стероидные соединения, характерные для мембран только 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 миллиардов 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 Робертом Фреем на основании анализа соотношения изотопов хрома ⁵³Cr и ⁵⁵Cr в осадочных породах [8, p.250-253].

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. Причём у одноклеточных эукариот уже имеются такие же, как и у современных многоклеточных организмов хромосомы, представляющие собой надмолекулярные комплексы ДНК, гистонов и не гистоновых белков.

3. У древних одноклеточных эукариот митоз и мейоз появился не позднее, чем 1,4-1,0 миллиард лет назад [9, с.102-117]. У красных водорослей, появившихся 1,2 миллиарда лет назад, был уже сложный половой процесс. А митоз и мейоз - безусловно, самые сложные внутриклеточные процессы, требующие большого количества работающих согласованно во времени генов. Например, при мейозе у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* активируется 360 мейоз-специфичных генов, у мушки *Drosophila melanogaster* на начало 2000 года было открыто 82 таких гена [10, с.585-590], [11, с.1301-1321].

По общему мнению специалистов, число генов, контролирующих мейоз, должно быть приблизительно одинаково у разных организмов: мейоз - система весьма консервативная. Значительно меньшее число генов, контролирующих мейоз у дрозофилы, взятое из цитируемой литературы, является, по мнению автора обзора, следствием недостаточной изученности и большей трудности определения этих генов у дрозофилы. По личному сообщению Ю.Ф. Богданова, в 2014 у дрозофилы уже стало известно примерно в два раза больше генов, контролирующих мейоз, чем в цитируемой статье [12], опубликованной в 2000 году. Для всего

нашего рассуждения эти детали не слишком важны - существенно только то, что генов, контролирующих мейоз, много, из чего следует, что процесс этот и его регуляция сложны. А то, что вся система консервативна, очень хорошо подкрепляет всю логику рассуждения.

4. Объём информации, необходимый для того, чтобы обеспечить два основных процесса онтогенеза - дифференцировку клеток и морфогенезы любых современных многоклеточных, мал по сравнению с объёмом, 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 пятипалой 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 объёма 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 [13]. Например, развитие хвостового плавника рыбы *Lumpenus lampetraciformis*, по экспериментальным данным Л.С. Берга, может быть описано в пространстве проективной геометрии по С.В. Петухову итеративными уравнениями:

$$x_{k+1} = (0,83x_k + 1,27y_k - 2,26)/(-0,05y_k + 1)$$

$$y_{k+1} = (0,14x_k + 0,91y_k - 3,26)/(-0,05y_k + 1)$$

Совершенно очевидно, что для реализации такого процесса требуется совсем немного информации. Это утверждение приобретает ещё большую весомость, если учесть, что двух тканево специфических 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 тканево специфические факторы адгезии (контактыны) и тканево специфические регуляторы активности митохондрий (комутоны). Существенно, что контактыны и комутоны видо- и классово не специфичны. Это очень древние и консервативные системы. Им-то и могут соответствовать переменные в уравнениях Петухова [12], [14].

Очень красивое экспериментальное доказательство малого количества генов, необходимых для определения важной морфогенетической характеристики - право- или лево-скрученности всего организма улиток, было получено А. Стёртвантом ещё в 1923 г. Он использовал методы классической генетики и с их помощью показал, что право-лево-скрученность раковины у *Limnaea* полностью зависит от генотипа материнского организма (т.е. определяется свойствами цитоплазмы

яйцеклетки) и детерминируются 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 объём 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. Эти механизмы у царств и типов многоклеточных организмов несколько отличаются, но принципы регуляции генов общие.

Перечислим эти механизмы:

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

2. Метилирование и ацетилирование гистонов - основных белков нуклеопротеидного 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. Так что 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 приближают нас к пониманию причины эволюционного парадокса - такой огромной временной задержки появления предков современных многоклеточных.

Эволюционный парадокс огромной временной задержки появления предков современных многоклеточных, таким образом, состоит в следующем.

III. БОЛЕЕ СТРОГАЯ ФОРМУЛИРОВКА 'ЭВОЛЮЦИОННОГО ПАРАДОКСА'

Задолго до кембрийского взрыва существовали уже все основные информационно-ёмкие элементы необходимые для него (ядерная клетка, хромосомы, митоз, мейоз, механизмы изменения активности генов - метилирование ДНК, метилирование, ацетилирование, фосфорилирование гистонов и т.д.). И чем дальше вглубь времён 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 миллиард лет они не появлялись? Эволюционный

парадокс усугубляется ещё тем, что, по данным геномики, одноклеточные предки животных, растений и грибов разошлись никак не позднее 1,1 миллиарда лет назад. А, вероятно, ещё 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, по сложности строения сравнимые с современными? Ведь основные процессы, определяющие современные многоклеточные организмы - дифференцировка клеток и морфогенезы - не требуют большого объёма информации! *Что-то в таком рассуждении не учитывается, и над этим 'что-то' эволюции пришлось потрудиться около миллиарда лет.*

Попробуем докопаться до этого 'что-то'.

IV. ДАННЫЕ ЭМБРИОЛОГИИ О РАННИХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА

В эмбриологии сложилось устойчивое представление, что различия паттернов генной активности, по крайней мере, на первых этапах эмбриогенеза, соответствующих моруле, задаётся физико-химическими различиями участков цитоплазмы яйцеклетки, в которых оказываются ядра бластомеров. Наглядной иллюстрацией этого принципа является раннее развитие асидии *Styela partita*. У этого организма разные участки цитоплазмы яйцеклетки имеют различные цветовые оттенки. И 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 жёлтой 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 мезодермы не образуется [18, p. 462-471]. Нетрудно себе представить, что далее путём подобного взаимодействия программ, возникших на предыдущем этапе онтогенеза, получается всё 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.

Эти факты и простое рассуждение позволяют осознать строгость требования к точности определения первых двух паттернов генной активности и *посеять сомнение в возможности выполнения этого требования за счёт 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 счёт 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 вперёд, скажу: природа таки создала механизм, полностью удовлетворяющий этим требованиям, а А.А. Иванов его обнаружил. 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 всё было тихо-мирно. Исследователи, увлечённые решением частных задач, предпочитали не замечать взрывоопасности ситуации. Но взрыв назрел и произошёл, и произошёл он с весьма неожиданной для большинства стороны!

V. ОТКРЫТИЕ А.А. ИВАНОВА - НЕОБХОДИМОСТЬ ИЗОТОПА ¹³C ДЛЯ РАННЕГО ОНТОГЕНЕЗА

Андрей Александрович Иванов сделал удивительное открытие: если лишить растение или животное источника изотопа углерода ¹³C, то жизнедеятельность и развитие их происходит нормально, но потомство они дать не могут. Семена не прорастают. Яйцеклетки животных не развиваются [19, с.46], [20, с. 72-74].

Следует подчеркнуть, что это грандиозное по своему значению открытие было сделано совсем не случайно. Сам по себе опыт - выращивание растений в атмосфере, лишённой изотопа углерода ¹³C, и выкармливание животных пищей, не содержащей этого изотопа - требует очень тщательной и сложной подготовки. Чтобы такой опыт поставить, нужно было иметь чётко сформулированную идею.

А.А. Иванов шёл 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, 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].

Уже в 2004 г. была опубликована работа Иванова: 'The conformational effect of isotopy - a determination factor for cell differentiation' [24, p.72]. В названии работы ясно обозначен вектор исследований.

Далее Ивановым и соавторами было последовательно показано, что:

1. При синтезе ДНК нуклеотиды, содержащие изотоп ¹³C, включаются в макромолекулу с заметно меньшей вероятностью по сравнению с нуклеотидами, не содержащими тяжёлого 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 ¹³C. И, следовательно, молекулы ДНК, синтезируемые на поздних циклах, оказывались всё более обогащёнными нуклеотидами с тяжёлым 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 тяжёлым изотопом углерода. А.А. Иванов 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, с.43-45]. 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 тяжёлый изотоп углерода. Один атом изотопа ¹³C приходится на 100 атомов ¹²C. В нуклеотиде 10 атомов углерода, следовательно, в обычных условиях один из 10 нуклеотидов может содержать тяжёлый 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 'лёгких', 'гибридных' и 'тяжёлых' цепей ДНК [19, с.46].

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 4 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 , растёт и размножается, но некоторое угнетение фотосинтеза отмечается. 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 такой эксперимент. Предварительно вырастили хлореллу в атмосфере, содержащей 99% ^{13}C и 1% ^{12}C . Дафнии на таком корме жили, но не размножались. Как бы полная симметрия биологического эффекта изотопов. Но если через три недели у дафний, выращенных на хлорелле без изотопа ^{13}C , сменить корм на хлореллу с ^{13}C , то 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 ещё неделю кормления нормальной по изотопному составу хлореллой удалось получить два детёныша дафний. И эти две особи через десять дней принесли потомство, причём 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 ^{13}C .

VI. ОБЪЯСНЕНИЕ ИВАНОВЫМ ЭВОЛЮЦИОННОГО ПАРАДОКСА И КРИТИКА ЭТОГО ОБЪЯСНЕНИЯ

Открытие такого фундаментального явления - необходимости определённого соотношения изотопов углерода для возможности осуществления онтогенеза, поз-

воляет, по мнению автора открытия - А.А. Иванова, 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 результаты приведённых экспериментов - нарушается эмбриогенез многоклеточных организмов' [19, с.64].

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) не представляет никакой сложности преодолеть 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 пloidности и оно совершенно заурядно. Увеличение пloidности вдвое сокращает на одно деление дробления у *Xenopus* [26], [27].

Во-вторых, (но это второстепенно) именно на начало Кембрия, когда и появились предки современных многоклеточных организмов, приходится 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 ещё более несостоятельно. Во-первых, парадокс-то состоит в том, что большая задержка 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 (разница всего на 8%). Тогда как различие спинов (есть у ^{13}C и нет у ^{12}C) представляется гораздо существеннее (подробнее ниже). А на

спиновые эффекты изотопов гравитация, естественно, не влияет.

VII. ГИПОТЕЗА: КАК ФЕНОМЕН ИВАНОВА МОЖЕТ ОБЪЯСНИТЬ ЭВОЛЮЦИОННЫЙ ПАРАДОКС

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, которая заключала бы в себе делящиеся бластоциты, хотя бы до стадии гастролы. Всё 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 определённых точных паттерна. Как же стохастический процесс включения разноизотопных 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 всё получилось!

Такая постановка вопроса открывает путь для понимания эволюционный парадокс и механизма реализации изотопного эффекта в онтогенезе. Требуется выяснить, как стохастический по своей природе процесс включения нуклеотидов с ^{13}C изотопом приводит к строго детерминированному паттерну активности генов. Наиболее правдоподобный ответ даёт такое представление.

В геноме существуют протяженные участки, которые при соответствующей их модификации эпигенетическими механизмами (метилирование 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 нём эволюция и затратила миллиард с лишним лет! И это не удивительно - ведь до завершения работы видимого смысла для одиночной клетки эти участки не имеют.*

VIII. УТОЧНЕНИЕ ВРЕМЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ 'РАБОТЫ ИЗОТОПА ^{13}C ' НА ПРИМЕРЕ РАННЕГО РАЗВИТИЯ ЗАРОДЫША ЧЕЛОВЕКА

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. Так же маловероятно, что эволюция 'могла отказаться' от использования с таким 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 тяжёлый изотоп углерода. Из этого факта он делает вывод о том, что по мере синтеза ДНК нити макромолекулы будут постоянно обогащаться ^{13}C . Это, очевидно, неверно. Первые три-четыре-пять делений дробления, когда обогащение пула свободных нуклеотидов изотопом ^{13}C незначительно, синтезируемые молекулы ДНК будут обеднены тяжёлым изотопом. Утверждая это, я исхожу из предположения, что пул нуклеотидов яйцеклетки рассчитан на синтез около 200 копий ДНК, т.е. на 7-8 делений дробления, как, на пример, у зародыша человека, развитие которого рассматривается далее. Обогащение вновь синтезируемых нитей ДНК тяжёлым изотопом углерода будет происходить только тогда, когда избыток ^{13}C в пуле нуклеотидов обеспечит превалирование над процессом дискриминации включения в молекулу 'тяжёлых' 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 обогащённая нуклеотидами с ^{13}C . В части клеток обогащены обе цепи молекулы ДНК, в части - одна из цепей. Клеток, у которых обе цепи 'лёгкие' - меньшинство. Но после того как пул нуклеотидов исчерпан, и мембрана, окружавшая бластоцит, растворилась, синтезируются только лёгкие 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 'лёгкими' и 'тяжёлыми' ДНК приблизительно равны, и отличие ДНК по плотности нуклеотидов с ^{13}C максимально контрастно. Именно в этот период развития следует ожидать образования двух зародышевых слоёв - эктодермы и энтодермы.

Проследим теперь, как такое прочтение 'феномена Иванова' вписывается в хорошо изученную картину

развития зародыша человека.

Через 30 часов после оплодотворения происходит первое деление дробления - образуются две дочерние клетки. Если каждый из бластомеров заключён в свою оболочку - получаютс я однойцевые близнецы. Экспериментальная эмбриология убедительно свидетельствует, что у лягушек, тритонов и морских ежей каждый из двух бластомеров, будучи разделён, даёт начало полноценному организму в два раза меньшего размера [28].

Через 40 часов - 4 бластомера.

Через 48 часов - 8 бластомеров. Экспериментальная эмбриология доказала, что у мыши каждый из 8 бластомеров способен образовать нормальный организм мыши.

Через 72 часа - 16 клеток в общей оболочке, образуемой мембраной яйцеклетки, формируют морулу.

На 4-ые сутки морула в общей плазматической мембране яйцеклетки достигает матки. По истечении 96 часов в моруле 32 клетки. В её центре образуется полость - бластоциста и небольшая группа клеток, расположенная внутри (эмбриобласт), даёт начало будущему эмбриону, а большая часть из этих 32 клеток формируют внешнюю клеточную оболочку - трофобласт, в будущем обеспечивая питание эмбриона.

144 часа (истекли 6 суток). Бластоциста представлена 128 клетками. Начинается её имплантация в матку. *Только на 7 сутки общая мембрана бластоцисты разрушается и далее зародыш питается за счёт организма матери. Важнейший момент для нашей модели. С этого времени клетки зародыша синтезируют 'лёгкую' ДНК, т.е. с малым количеством изотопа ^{13}C . Очевидно, что тяжёлая ДНК была синтезирована на 6-7 делении, на 5-6 сутки.* Отметим, что у 67% однойцевых близнецов хорион общий, т.е. разделение эмбриобласта произошло после формирования трофобласта (позже 96 часов). Если разделение эмбриобласта происходит после 192 часов (8 суток), возникнут сиамские близнецы того или иного варианта.

На 8 сутки начинается гастрულიция. Число клеток резко возрастает.

На 9 сутки появляется два зародышевых листка: эктодерма (даёт начало мозгу, сердцу, органам чувств) и энтодерма (даёт начало пищеварительной и дыхательной системам).

Только на третьей неделе формируется третий зародышевый листок - мезодерма. (Из неё возникают кости, хрящ, другие типы соединительной ткани).

Интересно, что дальше развитие происходит столь стремительно, что уже на 17 день зародыш достигает размера 1,1 сантиметр. Появляются сосуды, позвоночник, мозг, глаза. *С этого момента плод видит сны.*

14 дней потребовалось, чтобы сформировать всего 3 зародышевых листка, далее за три дня возникают мозг, глаза, сосуды, позвоночник! В онтогенезе, как и в эволюции долго и трудно осуществляется реализация двух

первых программ - 9 дней; 4 дня 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 обогащённого ^{13}C изотопом пула нуклеотидов и двух дополнительных циклов клеточного деления, в условиях, когда могут синтезироваться только 'лёгкие' молекулы ДНК. До этого момента никакой детерминации прочтения генома не реализуется, о чём свидетельствует появление полноценных однойцевых близнецов.

IX. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СПИНОВЫХ ПОЛЕЙ МАКРООБЪЕКТОВ МОЖЕТ ОБЪЯСНИТЬ РОЛЬ ^{13}C В ОНТОГЕНЕЗЕ

Что можно сказать о механизме, который обеспечивает различное и строго детерминированное прочтение нуклеотидов, различающихся только концентрацией тяжёлого изотопа углерода?

Во-первых, вовсе не следует сбрасывать со счёта значения различий физико-химических условий, возникающих из-за особенностей областей цитоплазмы яйцеклетки и 'градиентов'. Изотопный механизм должен только кардинально повысить надёжность работы механизма 'физико-химического'. 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. Бучаченко и соавторы ещё в 2005 году 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 3-5 раз по сравнению с бесспиновыми изотопами [29].

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 0,6 мМ хлористого магния изотопы ^{24}Mg и ^{25}Mg имеют одинаковый эффект на скорость ДНК полимеразной реакции, а при концентрации 1,0 и 2,0 мМ влияния этих изотопов на эту реакцию - в 2,3 раза, и притом одинаково изменяется при обеих концентрациях! [30], [31]. Если влияние концентрации элемента на проявление влияния спина изотопа столь значительно в растворе, то следует ожидать значительно более выраженного влияния плотности спинов в цепочке молекулы ДНК на её взаимодействие с другими молекулами (например, РНК). В этом случае в полной мере должно проявиться пятое фундаментальное взаимодействие - взаимодействие спиновых полей макроскопических объектов. (По А.В. Боброву [32], [33]). А

для этого нелокального взаимодействия, в первом приближении, важна именно средняя плотность спинов на сравнительно протяжённом участке. Протяжённость участка ДНК от тысячи пар нуклеотидов для того, чтобы усреднение дало бы строго детерминированный результат, конечно, достаточна. А как раз такова и протяжённость CpG островков.

Метилирование ДНК по цитозину, находящемуся в паре CpG, представляется обоснованным 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 изотопно различающихся нитей ДНК. А далее вполне следует ожидать значительного разнообразия конкретных биохимических механизмов реализации и поддержания дифференцировки.

Х. 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 ¹³C со спином, может строго детерминировать прочтение матриц ДНК, и почему произошла столь значительная задержка 'Кембрийского взрыва'. Сотни миллионов лет потребовались эволюции для создания регуляторных протяжённых 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 ¹³C, приобретают смысл только по завершении всего процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Gehling James G., Guy M., Narbonne and Michael Anderson. The first named Ediacarian Body Fossil, *Aspidella Terranova*. *Paleontology*, 43(3):427-456, 2000.
- [2] Е. Наймарк. www.Are-orsten-research.de.
- [3] Гниловская М.Б. Древнейшие аннелидоморфы из верхнего Рифея Тимана. *ДАН*, 359(3):369-372, 1998.
- [4] Гниловская М.Б., Вейсс А.Ф., Беккер Ю.Р., Оловянишников В.Г. Доэдиакарская фауна Тимана. (Аннелидоморфы верхнего рифея. Стратиграфия. Геологические корреляции). *ДАН*, 8(4):11-39, 2000.
- [5] Buss L.W. *The evolution of individuality*. Princet. Univ., 1987.
- [6] Марков А.В. Проблема происхождения эукариот. *Палеонтологический журнал*, (2):3-12, 2005.
- [7] Brooks J.J., Logan G.A., Buick R., Summons R.E. Archean molecular fossils and early rise of eucaryotes. *Science*, 5430:1025-1027, 1999.
- [8] Frei R., Claudio Gaucher, Simon W. Paulton, Don E. Canfield. Fluctuation in precambrian atmospheric oxygenation recorded by chromium isotopes. *Nature*, 461(7261):250-253, 2009.
- [9] Богданов Ю.Ф. Эволюция мейоза у одноклеточных и многоклеточных эукариот. Ароморфоз на клеточном уровне. *ЖОБ*, 69(2):102-117, 2008.
- [10] Богданов Ю.Ф. Молекулярная концепция мейоза выдерживает испытание. Итоги 4-ой Европейской конференции по мейозу. *Генетика*, 36(4):585-590, 2000.
- [11] Гришаева Т.М. и Богданов Ю.Ф. Генетический контроль мейоза у Дрозофилы. *Генетика*, 36(10):1301-1321, 2000.
- [12] Маленков А.Г., Модянова Е.А. *Биологические основы профилактики и нетоксической терапии рака*. М., 2006.
- [13] Петухов С.В. Геометрия живой природы и алгоритмы самоорганизации. Новое в жизни, науке и технике. М., 1988.
- [14] Elbakidze G.M., Elbakidze A.G. *Principles of tissue growth intratissue regulation*. Instant Publisher. Com. F division of fundcraft Publishing Company, 2009.
- [15] Sturtevant A.H. Inheritance of direction of coiling in *Lymnaea*. *Science*, 58:269-270, 1923.
- [16] Федонкин М.А. Две летописи жизни: опыт сопоставления палеонтологии и геномики о ранних этапах эволюции биосферы. Проблемы геологии и минералогии. Сборник статей посвященных 70-летию акад. Н.П. Юшкина. Стр. 331-350, 2006.
- [17] Balinski V.I. *Introduction to Embriology*. 5th ed. Saunders, Philadelphia, 1981.
- [18] Biggelaar J.A.M. and van der Guerrier. Dorsoventral polarity and metzblast determination as concomitant results of cellular interaction in the mollusc *Potella vulgate*. *Devel. Biol.*, 68:462-471, 1979.
- [19] Иванов А.А. *Природа регулярности онтогенеза*. М., 2014.
- [20] Галимов Э.М., Иванов А.А., Севастьянов В.С., Кузнецова О.В. Генетические последствия отсутствия ¹³C в среде метаболизма растений. 19 симпозиум по геохимии изотопов им. академика А.П. Виноградова, 16-18 ноября 2010.
- [21] Вернадский В.И. Изотопы и живое вещество. Из ДАН дек, 1926. Работы Гос. Радиевого ин-та 3.
- [22] Галимов Э.М. *Природа биологического фракционирования изотопов*. М., 1981.
- [23] Галимов Э.М. Природа глобальных изменений изотопного состава углерода в биосфере. *Геохимия*, (8):787-803, 1999.
- [24] Ivanov A.A. The conformational effect of isotopy - a determination factor for cell differentiation. Proc. Intern. Conf. Febs-2004, Warsaw, Poland. P. 72.
- [25] Ivanov A.A., Sevastyanov V.S. Study the free nucleotides pool ¹³C changes in polymerase chain reactions. Moscow, Russia, 25-30 June 2006, Abstracts, 2-P100.
- [26] Newport J.W., Kirschner M.W. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos Characterization and timing of cellular changes at mid blastula stage. *Cell*, 30:675-686, 1982.
- [27] Newport J.W. Kirschner M.W. Следующая статья в том же номере журнала 1982, *Cell* v. 30. P. 687-696.
- [28] Hans Spemann. *Embryonic development and induction*. New haven, 1938.
- [29] A. Buchachenko, D. Kouznetzov, N. Breslavskaya. *PNAS*, 102(10):93, 2005.

- [30] Орлов А.П. Магнитные изотопные эффекты ^{25}Mg и ^{67}Zn в регуляции каталитической активности фосфатидилтрансфераз. Автореферат к.х.н. биохимия М. (2013).
- [31] Бучаченко А.Л. Магнитно-зависимые молекулярные и химические реакции в биохимии, генетике и медицине. *Успехи химии*, 83(1):1–12, 2014.
- [32] Бобров А.В. Взаимодействие спиновых полей – пятое фундаментальное взаимодействие. Часть 1. *ЖФНН*, 1(1):48–57, 2013. <http://www.unconv-science.org/n1/bobrov>.
- [33] Бобров А.В. Взаимодействие спиновых полей – пятое фундаментальное взаимодействие. Часть 2. *ЖФНН*, 1(2):8–23, 2013. <http://www.unconv-science.org/n2/bobrov>.
- [34] Ванюшин Б.Ф. *Метилирование ДНК у растений. Механизмы и биологическая роль*. Наука, М., 2009.
- [35] Галицкий В.А. Гипотеза о механизме инициации малыми РНК метилирования ДНК *de novo* и аллельного исключения. *Цитология*, 50(4):277–286, 2008.