



УДК 591.33/577.34

Физико-химические аспекты эпигеномной регуляции эмбриогенеза низших позвоночных

О. П. Мелехова

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва
E-mail: muffs2013@gmail.com

Аннотация. Исследованы физико-химические механизмы, участвующие в пространственно-временной регуляции раннего развития (эмбриогенеза) низших позвоночных. На основе экспериментальных данных представлено обоснование ведущей роли энергетических стимулов – развития свободнорадикальных реакций – в качественных изменениях эмбрионального организма как сложной самоорганизующейся системы.

Ключевые слова: эмбриогенез, свободные радикалы, чувствительность эмбриональных клеток, аномалии развития.

Введение

Эмбриогенез представляет собой первый этап развития различных многоклеточных организмов. Отличительная черта этого периода индивидуальной жизни в том, что все первичные процессы становления клеточного разнообразия и начальный морфогенез осуществляются в соответствии с единой генетической программой оплодотворённой яйцеклетки и на основе энергетического потенциала и регуляторных макромолекул, содержащихся в её цитоплазме. Разномасштабные процессы морфогенеза и специализации (дифференцировки) клеток в зародыше должны быть объединены системой регуляции на уровне целого организма, обеспечивающей закономерность смены фаз развития, интеграцию процессов формирования органов. Такая система регуляции обеспечивает целостность развития зародыша и его реакции на внешние воздействия.

Дифференцировка начинается с латентного периода – *детерминации*, когда судьба клетки предопределяется на генном уровне. При этом потенциал развития уменьшается, хотя не выявляются ни биохимические, ни морфологические изменения. Для начального периода эмбриогенеза характерен заблаговременный синтез матричных информационных молекул, необходимых для наступающей фазы развития. Эти матрицы, способные к быстрой активации, до нужного момента сохраняются в неактивном состоянии. Предвестником детерминации является состояние *компетенции*. В этом состоянии клетки чувствительны к слабым стимулам и готовы реа-

гировать на них переходом к дифференцировке. В состоянии компетенции клетки обладают широкими потенциями развития. При этом судьба отдельной клетки неопределённая и может меняться под влиянием ближайшей микросреды. Если эти информационные процессы нарушаются внешними воздействиями, появляются аномалии развития (уродства). Состояние компетенции является эндогенным свойством, возникает или угасает в прямой связи с возрастом клеток. В настоящее время неясна природа процессов, которые делают клетки компетентными. Выяснение этого вопроса имеет фундаментальное значение для разработки биотехнологии ранней диагностики и возможного предупреждения эмбриональной патологии.

Материалы и методы

Материалом для исследований послужили зародыши амфибий и костистых рыб; основной объект – эмбрионы и ранние личинки бесхвостых земноводных (лягушек *Rana temporaria* Linnaeus, 1758 и *Xenopus laevis* Daudin, 1802). В экспериментальном исследовании механизмов регуляции эмбриогенеза принципиальным является выборизмеряемого показателя. Развитие зародыша приводит не только к изменению специфических особенностей клеточных популяций, но и к регуляции их энергетического состояния. Нами был выбран один из показателей клеточного метаболизма: уровень свободнорадикальных (СР) процессов. Можно считать, что этот показатель отражает скорость энергетического потока в клетке. Окислительно-восстановительные процессы, протекающие в организме с участием свободных радикалов (СР) – активных форм кислорода (АФК) – привлекают в последние годы большой интерес. Предполагают, что АФК могут играть сигнальную роль, определяя реакцию клетки на средовые воздействия. Свободные радикалы закономерно образуются в нормальном метаболизме, представляя часть системы окислительно-восстановительного гомеостаза клеток, а также характеризуют ранние этапы повреждения клеток при любых патологиях («окислительный стресс») [1].

Для выявления СР применён метод привитой радикальной сополимеризации (ПРС), разработанный для биологических объектов Ю. П. Козловым [3]. Этот радиоиндикаторный метод в сочетании с радиоавтографией позволил определить не только динамику возрастных изменений уровня СР-реакций на последовательных стадиях развития зародыша, но и локализацию СР-реакций в отдельных группах его клеток (зачатков органов) [4]. Индикатором служит акриламид АА-¹⁴С. Для исследования субклеточной локализации СР применили методы биохимического фракционирования и дифференциальной седиментации с последующей радиометрией полученных фракций липидов, белков, ДНК (ДНП) и РНК (РНП), а также ядер, митохондрий, желточных гранул и меланосом.

Результаты и обсуждение

Прослежена динамика изменения уровня СР-реакций в процессе развития эмбриона, в детерминации эмбриональных зачатков органов, в индукционных системах. Получено последовательное по стадиям развития

описание изменений интенсивности СР-реакций при проведении измерений *in situ* на срезах целого зародыша радиоавтографическим вариантом метода привитой радикальной сополимеризации (ПРС). Описание представляли в виде распределения процесса в целом зародыше, т. е. в виде карт срезов [4; 5] и сопоставляли с известными данными экспериментальной эмбриологии и генетического анализа развития [2].

Такой подход позволил впервые установить, что фазы компетенции и детерминации в зачатках эмбриона характеризуются повышением концентраций СР в их клетках. На последовательных стадиях развития быстрый рост концентраций СР наблюдали в энтодерме и будущей мезодерме морулы (центр Ньюкупа), вступающих в индукционное взаимодействие, позже – в ходе гастрюляции до начала и во время индукционного взаимодействия презумптивной хордомезодермы и нейроэктодермы (центр Шпеманна); на стадии поздней нейрулы – до начала и во время индукционного взаимодействия стенки глазного пузыря и линзообразующей эктодермы. Таким образом, обнаружен универсальный неспецифический механизм детерминации, лежащий в основе повышенной чувствительности компетентных и детерминирующихся зачатков – активное локальное развитие СР-реакций [5]. Детерминация направления будущей дифференцировки эмбрионального зачатка означает качественное изменение его состояния, связанное с активацией генной экспрессии [2]. Нами показано на целом ряде примеров, что этому предшествует локальный рост уровня СР-реакций, соответствующий состоянию компетенции, т. е. готовности клеток к индукционному взаимодействию.

Для выяснения биохимических механизмов участия СР-процессов в пространственно-временной регуляции эмбриогенеза мы предприняли исследование субклеточной локализации и биохимических субстратов СР-реакций в эмбриональном периоде (детерминация зачатков) и личиночном (дифференцировка). Обнаружено, что в эмбриональном периоде наиболее интенсивно радикалообразование в ядрах и желточных гранулах, в личиночном, когда активный рост организма сопровождается высоким уровнем синтеза белков – в митохондриях. При измерении уровня радикалообразования во фракциях липидов, РНП, ДНП и белков отмечено значительное участие СР-реакций в липидном обмене, причём главным образом – во фракции полифосфоинозитидов. Фосфоинозитиды осуществляют внутриклеточную передачу внешних сигналов от мембранных рецепторов к ядерным и цитоплазматическим эффекторам и определяют режим функционирования клетки. Эти сведения также проясняют механизм взаимодействия свободнорадикальных эпигенетических процессов и экспрессии генов.

Известно, что регуляция детерминации в раннем развитии происходит на уровне активации трансляции материнских матриц и деблокирования материнских белков. У желток-содержащих зародышей такая активация, возможно, связана с разрушением желточных гранул, окислением желтка и высвобождением протеаз, участвующих в активации «материнских морфогенов». Существенно также, что начало активного радикалообразования в

ядрах бластомеров во время дробления предшествует удлинению клеточных циклов, а почти десятикратный рост уровня СР в ядрах предшествует активации транскрипции. Высокая скорость радикалообразования в индукционных центрах Ньюкупа и Шпеманна соответствует по времени и месту наиболее высокой активности ряда генов, определяющих устойчивую детерминацию пути специализации клеток [2]. Наши результаты позволяют связать специфическую экспрессию генов при детерминации клеточных типов с формированием энергетической готовности клеток, с повышением пластичности мембран и с высоким уровнем обмена фосфоинозитидов – внутриклеточных мессенджеров.

Таким образом, свободнорадикальные процессы, влияющие также на физико-химическое состояние мембранного аппарата клетки, являются фактором, определяющим неустойчивое состояние, чувствительность системы к специфичным управляющим стимулам и затем – готовность к перестройке всей рабочей системы синтеза белка в клетке. Результаты наших исследований раннего развития амфибий позволили сформулировать гипотезу о ключевой роли свободнорадикальных реакций в пространственно-временной координации процессов морфогенеза и цитодифференцировки в эмбриогенезе [5].

Рассмотренный здесь экспериментальный подход позволил нам исследовать механизмы чувствительности эмбриональных клеток к различным повреждающим факторам: рентгеновскому и локальному лазерному облучению, химическим воздействиям, измененным гравитационным условиям. Для этого разработали чувствительную тест-систему: объект – эмбрионы амфибий на одной из ранних критических стадий развития; тест-реакция – измерение сдвига уровня СР-процессов в ранние сроки после воздействия, а также регистрация более позднего биологического эффекта: наличие и характер аномалий развития, процент и сроки смертности, синхронность развития. Прослежен генезис аномалий развития, причинно связанных с нарушением детерминационных процессов при первичном окислительном стрессе и продемонстрирована возможность использовать модификации морфогенеза как средства оценки токсичности природной окружающей среды.

Заключение

Полученные результаты позволяют связать активацию специфической экспрессии генов при детерминации клеточных типов с формированием энергетической готовности клеток, повышением их чувствительности к индуцирующим сигналам микросреды и воздействиям извне, повышением пластичности мембранного аппарата и высоким уровнем обмена фосфоинозитидов – внутриклеточных мессенджеров. При этом иницирующую роль в неспецифической активации клеток играет развитие свободнорадикальных процессов – параметра окислительно-восстановительного клеточного гомеостаза.

Список литературы

1. Бурлакова Е. Б. Система окислительно-восстановительного гомеостаза при радиационно-индуцируемой нестабильности генома / Е. Б. Бурлакова, В. Ф. Михайлов, В. К. Мазурик // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2001. – Т. 41, № 5. – С. 489–499.
2. Гилберт С. Биология развития / С. Гилберт. – СПб. : Политехника, 2010. – 850 с.
3. Козлов Ю. П. Привитая сополимеризация как метод исследования свободных радикалов в биологических системах / Ю. П. Козлов. – М. : Изд-во МГУ, 1970. – 63 с.
4. Мелехова О. П. Свободнорадикальные процессы в эмбриогенезе Anura / О. П. Мелехова // Онтогенез. – 1976. – Т. 7, № 2. – С. 131–140.
5. Мелехова О. П. Свободнорадикальные процессы в эпигеномной регуляции развития / О. П. Мелехова. – М. : Наука, 2010. – 328 с.

Epigenomically Controlled Emoryogenesis of the Lower Vertebrata: Physical and Chemical Aspects

O. P. Melekhova

Lomonosov Moscow State University, Moscow

Abstract. The physical and chemical mechanisms involved in the space-and-time control of the early development (embryogenesis) of the lower vertebrata were investigated. Based on the data acquired by experiments, the leading role of the energetic drives – free-radical reactions – is justified as concerns their involvement in the quality progress of the complicated self-organizing system of embryonic organism.

Keywords: embryogenesis, free radicals, sensibility of embryo cells, development anomalies.

*Мелехова Ольга Петровна
доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник
Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова
119234, Москва, Ленинские Горы, 1/12
тел.: (495) 939–35–25
e-mail: muffs2013@gmail.com*

*Melekhova Ol'ga Petrovna
Doctor of Sciences (Biology)
Leading Research Scientist
Lomonosov Moscow State University
1/12, Leninskye Gory, Moscow, 119234
tel.: (495) 939–35–25
e-mail: muffs2013@gmail.com*