Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра медицинской биологии и генетики

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ПАТОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Часть IV

ОПЛОДОТВОРЕНИЕ. ВОЗНИКНОВЕНИЕ НОВОГО ОРГАНИЗМА. БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА РАННЕГО РАЗВИТИЯ

Курс лекций для студентов-медиков

Санкт-Петербург
РИЦ ПСПбГМУ
2019

Подписано в печать 04.12.19. Усл. печ. л. 4,75.
Формат 60×84 1/16. Электронная библиотека. Заказ № 302/19.
197022, Санкт-Петербург, улица Льва Толстого, 6-8.
РИЦ ПСПбГМУ

УДК 576.3
ББК 28.05
М75

Авторы:
М.А. Корженевская, Л.Е. Анисимова, В.П. Болонина, Е.В. Карпова, С.В. Розенфельд, Е.Ф. Того, Н.Н. Степанов

Рецензент:
д.м.н., профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ПСПбГМУ им. И.П. Павлова **В.Л. Быков**

Утверждено на заседании ЦМК морфологических дисциплин. Протокол №2 от 24.09.2019 г.

М75 **Молекулярная биология и патология клетки** : курс лекций для студентов медицинский вузов. В 4-х ч. / М.А. Корженевская [и др.]. — Часть IV. Оплодотворение. Возникновение нового организма. Биология и генетика раннего развития. — СПб.: РИЦ ПСПбГМУ, 2019. — 60 с.

Данное пособие представляет собой дополненное и исправленное издание курса лекций по молекулярной биологии клетки, который читают студентам-первокурсникам в первом семестре на кафедре медицинской биологии и генетики. В нем освещен круг вопросов, касающихся молекулярных основ клеточной биологии и молекулярных причин патогенеза некоторых заболеваний человека. С учетом новейших достижений в области молекулярной биологии в пособии изложены современные представления о строении и функциях поверхностного аппарата клетки, клеточных органоидов и ядра, матричных процессах. В пособии дана характеристика генома человека, описаны структура и уровни регуляции работы генов, клеточный цикл и способы деления клеток, апоптоз, молекулярные основы канцерогенеза, а также ранние этапы эмбрионального развития и его генетический контроль. Особое внимание уделено описанию на клеточном и молекулярном уровнях причин некоторых заболеваний человека, таких как – лизосомальные болезни накопления, митохондриальную патологию, инсулинзависимый и независимый диабет, синдром тестикулярной феминизации, серповидно-клеточную анемию, различные формы талассемий и др.

Разделы и главы пособия составлены в соответствии с учебной программой, логично и последовательно, знакомство с ними является необходимым условием для последующего освоения специальных профильных клинических дисциплин.

© РИЦ ПСПбГМУ, 2019

Оглавление

1. Оплодотворение 4
1.1. Строение гамет 4
1.1.1. Сперматозоиды 4
1.1.2. Яйцеклетки 6
1.2. Узнавание и контакт между сперматозоидом и яйцеклеткой ... 8
1.2.1. Узнавание и контакт гамет у видов с наружным оплодотворением 8
1.2.2. Узнавание и контакт гамет у млекопитающих 10
1.3. Проникновение сперматозоида в яйцеклетку 11
1.3.1. Предотвращение полиспермии 12
1.3.2 Быстрый блок 13
1.3.3. Медленный блок 14
1.4. Слияние генетического материала 15
1.4.1. Функциональная неравнозначность мужского и женского ядер у млекопитающих 16
1.4.2. Геномный импринтинг 17
1.5. Активация яйца 19
1.6. Клонирование 21
2. Дробление 24
3. Гаструляция 31
3. 1. Особенности гаструляции у млекопитающих 33
4. Формирование зародышевых оболочек 36
5. Основные этапы развития эмбриона человека 38
6. Генетический контроль ранних этапов развития 40
6.1. Гены позвоночных, эквивалентные генам дрозофилы 51
Заключение 52
Литература 57

1. ОПЛОДОТВОРЕНИЕ

Оплодотворение — это процесс слияния двух половых клеток, или гамет, в результате которого возникает новая особь, объединяющая генетический материал от обоих родителей.

Особенности оплодотворения у разных видов могут варьировать, но в основном сводятся к четырем главным моментам:

1. Взаимное узнавание и контакт сперматозоида с яйцом.
2. Проникновение сперматозоида в яйцо.
3. Слияние ядер (генетического материала).
4. Активация метаболизма яйца и запуск процессов развития нового организма.

1.1. Строение гамет

1.1.1. Сперматозоиды

Сперматозоиды, или спермии — это зрелые гаплоидные мужские половые клетки, очень мелкие и подвижные. Их основное предназначение — сохранить и донести до яйцеклетки отцовские гены. Всем позвоночным свойственны жгутиковые сперматозоиды, поскольку жгутик обеспечивает поступательное движение в жидкой среде.

В сперматозоиде различают три основные части: головку, шейку и хвост (рис. 1). Головка спермии человека имеет спереди овальный, а сбоку грушевидный контур. Она содержит: а) гаплоидное ядро с неактивным плотно упакованным хроматином, в котором гистоновые белки заменены на белки протамины; б) мембранный мешочек — акросому с гидролитическими ферментами, необходимыми для проникновения в яйцеклетку. Акросома представляет собой видоизмененный транс-отдел аппарата Гольджи. У некоторых видов между ядром и акросомой имеется область, содержащая глобулярный актин, который используется для образования акросомного выроста. Большая часть цитоплазмы сперматозоида элиминируется при его созревании.

Шейка спермия представляет собой более узкую часть клетки, содержащую митохондрии и центриоли. Центриоли имеют вид двух зернышек, или пластинок.

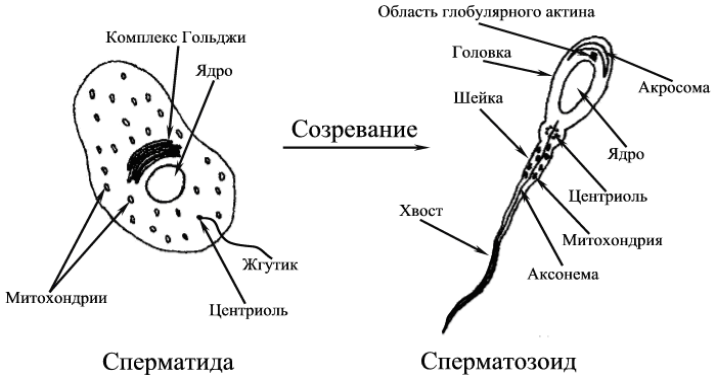


Рис. 1. Строение сперматозоида

Митохондрии образуют спиралевидное кольцо вокруг центриолей и обеспечивают энергией движение спермия. Центриоль дает начало осевой нити хвоста — аксонеме. Хвост с аксонемой представляет собой локомоторный аппарат. Хвост совершает волнообразные движения винтового характера, при этом головка спермия вращается и двигается вперед. Аксонема образована системой тубулиновых микротрубочек, ее стержень состоит из двух одиночных микротрубочек, а по периферии имеется кольцо из 9 их дуплетов. В дуплете одна микротрубочка имеет обычное строение и состоит из 13 протофиламентов, а другая — только из 11 протофиламентов. У млекопитающих вокруг аксонемы расположены 9 плотных волокон в настоящее время неизвестного состава. Микротрубочки имеют динеиновые выступы. Динеин обладает АТФ-азной активностью и участвует в преобразовании химической энергии в механическую. Набор микротрубочек 9+2 с динеиновыми выступами характерен для всего царства эукариот, что свидетельствует об исключительной эффективности такой организации для обеспечения движения (рис. 2).



Рис. 2. Строение аксонемы

Таким образом, сперматозоиды — это специализированные клетки, максимально приспособленные к движению в условиях жесткой конкуренции, несущие отцовские гены. Общая длина спермии человека составляет ~ 0,06 мм.

1.1.2. Яйцеклетки

Яйцеклетка — это женская половая клетка, содержащая все необходимые вещества для роста и развития зародыша. По сравнению со сперматозоидом самой очевидной и отличительной чертой яйцеклеток является их размер. У морского ежа, например, яйцеклетка в 10000 раз больше, чем сперматозоид. Размер яйцеклетки человека составляет ~ 0,15 мм, рыбы — 1–2 мм, птицы — до 80 мм (у страуса). Размер яйцеклетки не зависит от размеров тела животного, но может иметь обратную корреляцию с плодовитостью (кроме плацентарных). Большую часть яйцеклетки занимает цитоплазма, называемая ооплазмой. В ооплазме запасены все материалы, необходимые для развития зародыша: м-РНК, т-РНК, белки, липиды, морфогенетические факторы. Эти компоненты могут располагаться в яйце асимметрично. Такое неравномерное расположение компонентов ооплазмы является неслучайным и придает клетке полярность. Полярность ооплазмы — это первый шаг в создании пространственной организации зародыша. У многих видов животных еще в яйце определяется переднезадняя (П.-З.) и спинно-брюшная (С.-Б.) оси тела зародыша. Например, у амфибий неоплодотворенное яйцо обладает анимально-вегетативной асимметрией, или полярностью. Анимальный полюс содержит мало желтка, и в нем располагается ядерный материал. В центральной области находится много рибосом и митохондрий. Вегетативный полюс содержит большое количество желтка (рис. 3).

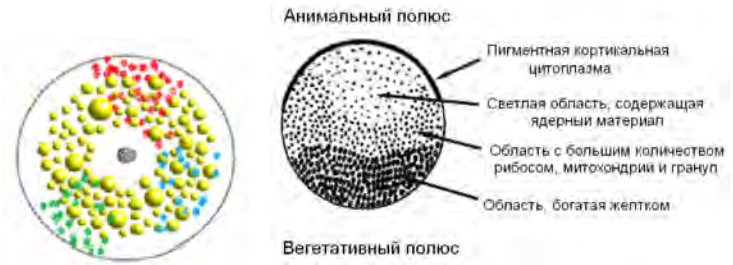


Рис. 3. Анимально-вегетативная полярность яйца амфибий

Человеческая яйцеклетка содержит мало желтка, так как развивающийся эмбрион получает питание от матери, однако в центре ооплазмы наблюдаются диффузно рассеянные желточные гранулы с липидами, аминокислотами и углеводами. Ядро человеческой яйцеклетки имеет шаровидную форму и располагается обычно эксцентрично. Слой ооплазмы, находящийся непосредственно под цитоплазматической мембраной, содержит кортикальные гранулы. Эти мембранные структуры аналогичны акросоме спермия, так как в них имеются протеолитические ферменты, мукополисахариды и белок гиалинового слоя.

Еще одной специфической чертой яйцеклеток является наличие специальных оболочек (рис. 4).

Яйцеклетку, окруженную оболочками, называют яйцом. В зависимости от способа образования различают несколько видов защитных оболочек.

Первичные оболочки образует само яйцо. Например, у морского ежа оболочка, примыкающая к мембране яйцеклетки, называется вителиновой; она состоит из гликопротеинов (см. рис. 4). У млекопитающих аналогичная оболочка называется прозрачной, или блестящей (zona pellucida). Первичные оболочки играют важную роль в обеспечении видовой специфичности прикрепления спермиев.

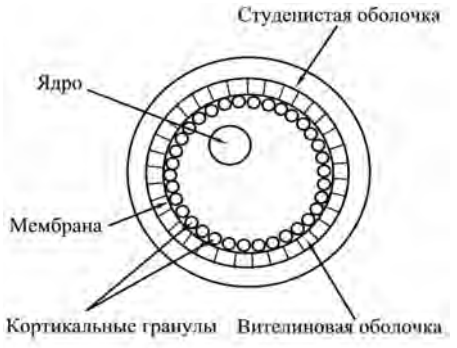


Рис. 4. Строение яйцеклетки морского ежа

Вторичные оболочки возникают благодаря деятельности оболочечных или фолликулярных клеток. Яйцеклетка млекопитающих окружена слоем фолликулярных клеток, образующих лучистый венец, или *corona radiata*. Основная задача этого слоя — обеспечение яйцеклетки питанием (рис. 5).

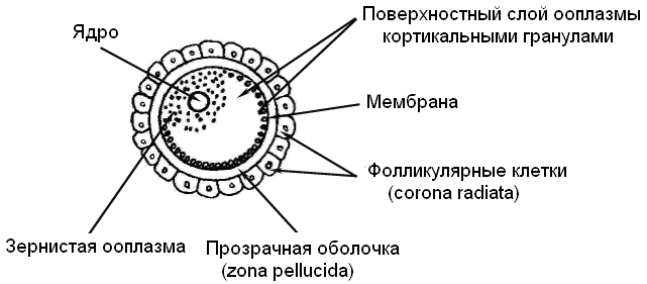


Рис. 5. Строение яйцеклетки человека

И, наконец, третичные оболочки образуются у животных, развитие которых происходит вне тела матери. Третичные оболочки являются продуктом деятельности эпителиальной выстилки выводных путей. К ним относится студенистая оболочка икринок морского ежа или амфибий, а также слой яичного белка и известковая скорлупа у птиц. Третичные оболочки защищают яйца от вредных воздействий, а у видов, размножающихся в воде, они способствуют склеиванию икринок.

Наличие яйцевых оболочек позволяет обеспечить выживаемость материнских генов и защиту начальных этапов развития зародыша.

1.2. Узнавание и контакт между сперматозоидом и яйцеклеткой

1.2.1. Узнавание и контакт гамет у видов с наружным оплодотворением

У видов с наружным оплодотворением (морских ежей, рыб, амфибий) для взаимного узнавания сперматозоида и яйцеклетки необходимы два важных момента — дистантное и контактное взаимодействия, которые активируют спермий и индуцируют акросомальную реакцию.

Установлено, что яйца морского ежа для привлечения сперматозоидов выделяют в воду химические вещества аттрактанты — сперакт и резакт. По своей природе они являются пептидами, состоящими из 10 и 14 аминокислот соответственно. Эти пептиды быстро диффундируют в воде, создавая химический градиент, вдоль которого и двигаются спермии, имеющие видоспецифические рецепторы к аттрактантам.

После завершения дистантного этапа химического привлечения (хемотаксиса) сперматозоиды вступают в непосредственный контакт со студенистой оболочкой яйцеклетки. При этом они активируются, и осуществляется акросомальная реакция (рис. 6). При ней разрывается акросомальный пузырек спермия и выдвигается акросомальный вырост.



Рис. 6. Акросомальная реакция и контакт спермия с яйцом

Предположительно акросомальную реакцию инициируют сульфатированные полисахариды студенистой оболочки яйцеклетки, связывающиеся с соответствующими рецепторами сперматозоидов. Вследствие этого происходит деполяризация их мембраны и в ней открываются дополнительные каналы для ионов Ca^{+2} и Na^+, поступающих внутрь головки сперматозоида. Одновременно активируются протонные насосы, и ионы H^+ и K^+ выходят из головки. Уменьшение концентрации H^+ (увеличение значения pH) способствует повышению гидростатического давления внутри сперматозоида. В результате этого происходит слияние мембраны акросомы с цитоплазматической мембраной и экзоцитоз гидролитических ферментов из акросомы. Затем благодаря полимеризации глобулярного актина и образованию актиновых филаментов формируется акросомный вырост, способствующий проникновению головки сперматозоида в оболочки яйцеклетки.

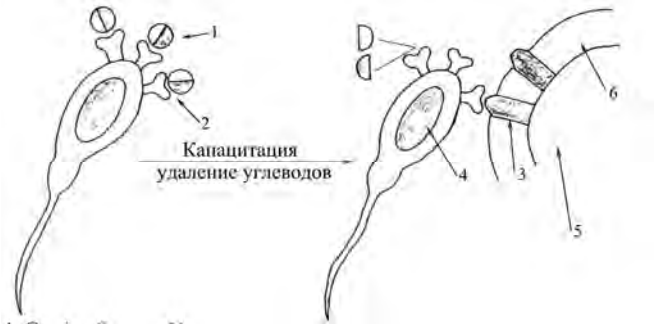
Среди акросомальных белков имеется белок байндин, отвечающий за видоспецифичность контакта сперматозоида с яйцеклеткой. Он взаимодействует с рецепторами на вителиновой оболочке.

1.2.2. Узнавание и контакт гамет у млекопитающих

У млекопитающих происходит внутреннее оплодотворение, поэтому контакт и узнавание сперматозоида и яйцеклетки имеют свои особенности. Оказалось, что сперматозоиды млекопитающих не способны к акросомальной реакции после семяизвержения. Для того чтобы реакция стала возможной, необходимо пребывание сперматозоида в половых путях самки. После этого сперматозоиды приобретают способность к акросомальной реакции и оплодотворению. Это явление называется капацитация. По-видимому, процесс капацитации заключается в изменении структуры липидов клеточной мембраны сперматозоидов. Исследования показали, что при инкубировании сперматозоидов in vitro в содержимом, экстрагированном из яйцеводов, уменьшается соотношение холестерин/фосфолипиды. Возможно, это происходит за счет того, что альбумин в половых путях самки способен извлекать холестерин из билипидного слоя. Снижение содержания холестерина дестабилизирует мембрану акросомального пузырька, чем способствует слиянию цитоплазматической и акросомальной мембран и, следовательно, экзоцитозу гидролитических ферментов.

Во время капацитации с поверхности сперматозоидов убираются особые вещества, препятствующие оплодотворению, их называют coating factors. Эти вещества представляют собой полимеры из остатков галактозы и ацетилглюкозамина. Выяснено, что на поверхности сперматозоидов есть белок N-ацетилглюкозамингалактозилтрасфераза (АГАГТ). Этот белок имеет активный центр, узнающий ацетилглюкозамин. В спермиях, не прошедших капацитацию, белок АГАГТ связан с глюкозаминовыми остатками coating factors. После капацитации активный центр белка АГАГТ освобождается и может взаимодействовать с глюкозаминовыми остатками, входящими в состав ZP3 рецептора прозрачной оболочки яйцеклетки. Белок АГАГТ прикрепляется к рецептору ZP3 по типу «ключ-замок», что обеспечивает контакт спермия и яйца (рис. 7).

Нахождение спермиев в момент акросомальной реакции по отношению к яйцеклетке может быть различно у разных видов млекопитающих и зависит от способности спермиев проникать сквозь клетки лучистого венца. Так, у кроликов и морских свинок акросомальная реакция происходит без контакта спермия с яйцом, а у мышей и человека — только после его прикрепления к яйцу. Акросомальная реакция приводит к выделению фермента гиалуронидазы, лизирующей связи между клетками лучистого



1. Coating factors - N-ацетилглюкозамин + галактоза.
2. Фермент-рецептор N-АГАГ-трансфераза, имеет центр присоединения N-ацетилглюкозамина.
3. Рецептор яйцеклетки ZP3, содержит остатки N-ацетилглюкозамина.
4. Ядро спермия.
5. Яйцеклетка.
6. Прозрачная оболочка.

Рис. 7. Молекулярный механизм узнавания гамет

венца, и акрозина, лизирующего прозрачную оболочку. По аминокислотному составу акрозин сходен с трипсином. В акросоме акрозин не активен и активируется только после взаимодействия с гликопротеинами прозрачной оболочки.

1.3. Проникновение сперматозоида в яйцеклетку

Вслед за узнаванием сперматозоида и завершением акросомальной реакции происходит слияние мембран сперматозоида и яйцеклетки.

Слияние мембран представляет собой активный процесс, опосредованный специфическими фузогенными (способствующими слиянию) факторами. В роли такого фактора может выступать белок байндин. При нарушении целостности билипидного слоя мембран спермия и яйцеклетки образуются замкнутые липидные пузырьки — мицеллы. Затем происходит их перераспределение и восстановление единой мембраны (рис. 8).

В результате материал мембраны сперматозоида обнаруживается в составе мембраны яйцеклетки. Ядро спермия при этом оказывается в ооплазме яйцеклетки. Жгутик и цитоплазма сперматозоида с митохондриями и центриолями также попадают в яйцеклетку (через цитоплазматический мостик). У некоторых видов животных жгутик спермия не проникает в яйцеклетку, а остается снаружи.

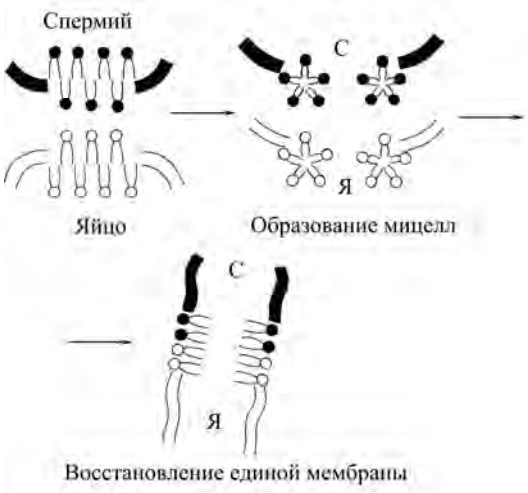


Рис. 8. Схема слияния клеточных мембран при оплодотворении

1.3.1. Предотвращение полиспермии

Несмотря на то, что с яйцеклеткой могут контактировать одновременно много спермиев, сливаться с ней может только один.

Проникновение в яйцеклетку множества спермиев (полиспермия) приводит к гибельным последствиям по той причине, что образуется триплоидный зародыш. Клетки такого зародыша развиваются атипично, и последний обычно погибает. Не описано ни одного случая живорождения триплоидного ребенка у человека. Все они погибали на ранних стадиях эмбриогенеза (спонтанные абортусы или выкидыши). В научной литературе известно 8 случаев живорождения детей-мозаиков 2n/3n. У них наблюдались тяжелые пороки развития: расщелина губы, недоразвитие носа, отсутствие глаз, ушей, синдактилия, пороки внутренних органов. В связи с гибельными последствиями для будущего зародыша триплоидного набора хромосом, в процессе эволюции у всех организмов выработались механизмы защиты от полиспермии.

У рыб, например, в яйцеклетке-икринке есть отверстие — микро́пиле, по которому сперматозоиды могут двигаться только один за другим, пока содержимое кортикальных гранул не закупоривает микро́пиле. У большинства других видов животных яйцеклетки не имеют такого отверстия и могут сливаться со сперматозоидом в любом месте. Соответственно, у них

выработались специальные механизмы блокирования (блок) полиспермии, которые включают: а) быстрый блок — путем изменения электрохимического потенциала на мембране; б) медленный блок — путем экзоцитоза кортикальных гранул.

1.3.2. Быстрый блок

Мембрана яйцеклетки должна утрачивать способность сливаться с мембраной сперматозоидов сразу после того, как первый сперматозоид вступит с ней в контакт. Эта цель достигается путем изменения электрического потенциала мембраны, который в норме существует благодаря работе K^+-Na^+-насоса, постоянно поддерживающего разность концентраций ионов K^+ и Na^+ внутри и снаружи клетки. Величина такого электрохимического потенциала, называемого потенциалом покоя, составляет $U \approx -70$ мВ (милливольт). После прикрепления первого сперматозоида мембрана яйцеклетки в течение 0,1 секунды деполяризуется, и величина потенциала становится равной значению от –10 до +20 мВ. Через 1 минуту величина потенциала возвращается к исходному значению (рис. 9).

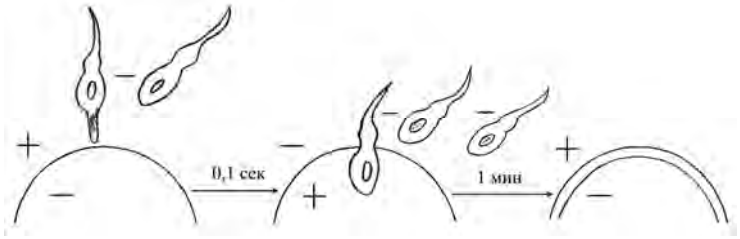


Рис. 9. Деполяризация мембраны яйцеклетки

Спермии способны сливаться с мембранами, обладающими потенциалом покоя, но не способны сливаться с теми, потенциал которых имеет отрицательные значения, поскольку сами они несут отрицательный заряд. Из сперматозоидов морского ежа был выделен белок, способный открывать Na^+-каналы в мембране, что делает возможным деполяризацию мембраны яйцеклетки.

Быстрый блок полиспермии описан у морских ежей и амфибий. У млекопитающих быстрого блока, по-видимому, нет, так как он не играет существенной роли из-за малого числа сперматозоидов, достигающих места оплодотворения. У рептилий и птиц, размножающихся яйцами,

богатыми желтком, в яйцеклетку проникают несколько сперматозоидов, но все, кроме одного, разрушаются. Факторы разрушения сперматозоидов пока остаются неизвестными.

1.3.3. Медленный блок

Для удаления прикрепившихся к яйцеклетке «лишних» сперматозоидов срабатывает медленный блок защиты, который включается посредством кортикальной реакции. Сутью этой реакции является экзоцитоз содержимого кортикальных гранул, которое оказывается между мембраной яйцеклетки и ее первичной оболочкой. Сама кортикальная реакция запускается в результате увеличения концентрации ионов Ca^{+2} в ооплазме за счет его запасов, сосредоточенных в эндоплазматической сети (ЭПС). Механизм кортикальной реакции сходен с таковым акросомальной реакции и происходит в течение 1–2 минут после проникновения спермия.

Содержимое кортикальных гранул включает ферменты, растворяющие белки, которые соединяют вителиновую оболочку с мембраной, и мукополисахариды, создающие осмотический градиент а, следовательно, привлекающие воду.

В результате первичная оболочка с оставшимися на ней сперматозоидами отделяется от мембраны яйцеклетки. Вместе со слоем мукополисахаридов она образует оболочку оплодотворения (рис. 10).

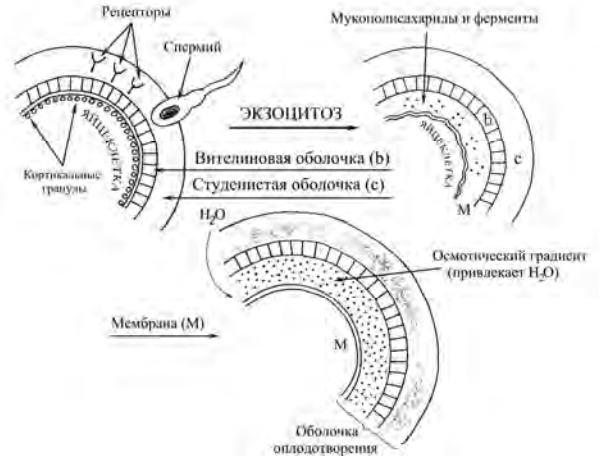


Рис. 10. Кортикальная реакция и образование оболочки оплодотворения

У морского ежа, кроме того, наблюдается изменение байндин-рецепторов и выделение гиалина, одевающего яйцеклетку сплошным слоем.

У млекопитающих при кортикальной реакции не наблюдается образования оболочки оплодотворения, однако выделение ферментов из кортикальных гранул приводит к изменению ZP3-рецепторов и отсоединению от них сперматозоидов. Это явление называется реакцией прозрачной оболочки.

1.4. Слияние генетического материала

В связи с тем, что размеры яйцеклетки очень велики по сравнению со сперматозоидом, ядрам гамет для слияния необходимо преодолеть значительные расстояния. Такое передвижение ядер определяется структурой цитоскелета яйцеклетки. Ядра, прежде чем сблизиться, совершают сложные движения, которые называют «танец пронуклеусов». Ядро сперматозоида всегда движется внутрь яйца перпендикулярно поверхности последнего. Этот путь называют «дорожкой проникновения». Затем ядра яйцеклетки и сперматозоида движутся уже навстречу друг другу по «дорожке копуляции».

У морского ежа сперматозоид привносит в яйцеклетку свои центриоли, а яйцеклетка при этом утрачивает свои. Центриоли сперматозоида располагаются между двумя ядрами гамет, и от них отходят лучи микротрубочек (сперматическая звезда). Затем микротрубочки соединяются с обоими ядрами. Далее происходит сближение, а затем и слияние ядер с образованием общей ядерной оболочки.

У млекопитающих сохраняются центриоли яйцеклетки, а не сперматозоида. Кроме того, не происходит непосредственного слияния ядер. В ходе сближения ядерные мембраны разбираются до маленьких пузырьков. Происходит замена белков хроматина спермия на белки ооплазмы, и хроматин этим приводится в деконденсированное состояние. Затем ядерная оболочка вновь воссоздается (рис. 11).

В это же время ядро яйцеклетки, которая у всех позвоночных является ооцитом II порядка, завершает второе мейотическое деление. Только после этого ядра начинают двигаться навстречу друг другу, и в них одновременно происходит репликация обеих ДНК. Ядерные оболочки вновь разбираются, происходит слияние генетического материала и конденсация хроматина. После этого сразу же начинается митоз. Истинное диплоидное ядро у млекопитающих образуется только на стадии двух бластомеров.

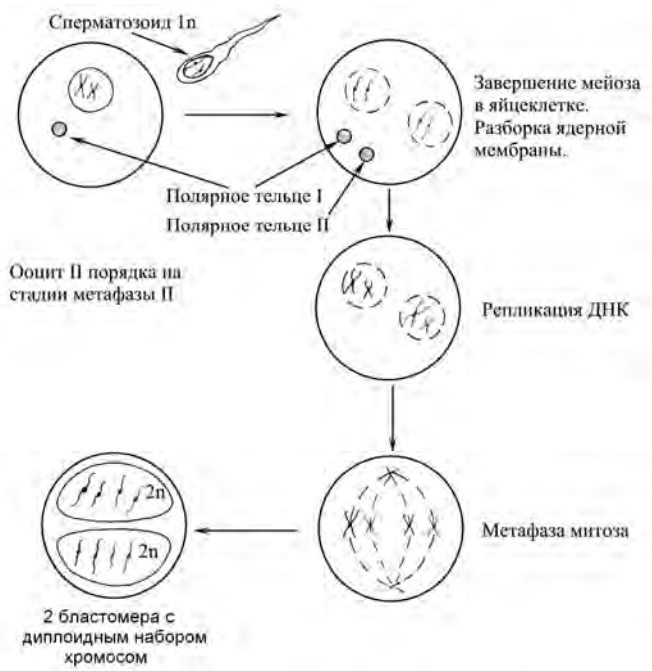


Рис. 11. Слияние генетического материала при оплодотворении у человека

1.4.1. Функциональная неравнозначность женского и мужского ядер у млекопитающих

Ядра яйцеклетки и сперматозоида можно считать генетически эквивалентными, однако между ними существуют функциональные различия.

Экспериментально показано, что если гаплоидное ядро сперматозоида сливается с безъядерной яйцеклеткой, и после его проникновения в ооплазму число хромосом сперматозоида удваивается, то развитие такой зиготы идет аномально. У женщин в таком случае может образоваться опухоль матки — хорионаденома. В этом образовании плод не развивается, но имеется гипертрофированная ткань плаценты.

Если у мышей экспериментально подавить отделение полярного тельца, то возникнут диплоидные яйцеклетки, в которых наследственный материал происходит только от матери. Развитие зародыша будет проходить недолго — 10–11 дней, что составляет примерно половину срока

беременности у мышей, а затем зародыш дегенерирует. Следовательно, у млекопитающих для развития необходимы отцовский и материнский геномы.

Наличие разных свойств у мужского и женского ядер подтверждают опыты по их пересадке и реконструированию зигот.

С помощью тончайших стеклянных капилляров из оплодотворенной яйцеклетки избирательно удаляют либо женское, либо мужское ядро. Затем вместо удаленного вводят ядро из другой оплодотворенной яйцеклетки. Метод переноса дает возможность создавать необычные эмбрионы, у которых оба набора хромосом унаследованы от матери (гиногенетические эмбрионы) или от отца (андрогенетические эмбрионы). Оказалось, что такие эмбрионы имели поразительные различия. У гиногенетических — тело имело незначительные аномалии, а структуры, необходимые для питания зародыша (плацента, желточный мешок), оказались сильно недоразвитыми. У андрогенетических животных, наоборот, плацента и желточный мешок были почти нормальны, а тело эмбриона было очень слабо развито. При этом развитие эмбрионов до конца не происходило ни в одном случае.

Такие результаты свидетельствуют о функциональных различиях мужского и женского ядер.

1.4.2. Геномный импринтинг

Функциональная неравнозначность мужского и женского ядер может быть объяснена явлением геномного импринтинга.

Геномный импринтинг состоит в том, что в ходе гаметогенеза происходит функциональная инактивация определенного набора генов. Оказалось, что набор генов, инактивируемых в оогенезе, отличается от набора генов, проходящих через сперматогенез. Поэтому представляется важным, от кого из родителей унаследован определенный ген. Потомки, получившие набор генов с материнской маркировкой, отличаются от таковых, получивших набор генов с отцовской маркировкой. При образовании половых клеток у самих потомков прежняя маркировка стирается, и гены маркируются заново в соответствии с полом потомка.

Функциональные отличия женских и мужских генных наборов проявляются у реципрокных гибридов мула и лошака, так как они различаются даже фенотипически (мул — гибрид кобылы и осла, а лошак — гибрид ослицы и коня).

Кроме того, на линиях мышей, несущих мутацию hairpin tail на 17 хромосоме, было показано, что если мутация наследуется от матери, то эмбрионы гибнут на ранних стадиях эмбриогенеза. Если же мутация наследовалась от отца, то фенотипический эффект был незначителен. В других экспериментах на мышах было показано, что мышата с двумя материнскими хромосомами отличаются от мышат с двумя такими же отцовскими хромосомами по весу, размеру и поведению. В следующих поколениях этот эффект не сохранялся. Таким образом, оба родителя могут передавать потомкам совершенно идентичные гены, но при отцовском и материнском импринтингах действие этих генов будет не одинаково. Возможно, что различие в экспрессии генов обусловлено их избирательной инактивацией.

Проявление геномного импринтинга связано и с некоторыми заболеваниями у человека. Оказалось, что больные синдромом Прадера — Вилли, который характеризуется ожирением, умственной отсталостью и непропорционально малыми размерами рук и ног, ярко выраженным гипогонадизмом, имеют две 15-х хромосомы, унаследованные только от матери, или 15-я отцовская хромосома имеет микроделецию (del15q11-13) (рис. 12).



Рис. 12. Внешний вид больного с синдромом Прадера — Вилли b
(с любезного разрешения проф. Е.Г.Ильиной, г. Минск)

У больных с синдромом Ангельмана (синдром «смеющейся куклы»), при котором наблюдается неадекватная смешливость, резкие судорожные движения, умственная отсталость, функционируют или две отцовские

хромосомы 15, или материнская хромосома 15 имеет частичную делецию (del15q11-13) (рис. 13).



Рис. 13. Внешний вид больных с синдромом Ангельмана
(с любезного разрешения проф. Е.Г.Ильиной, г. Минск)

Эти два заболевания связаны с различиями в импринтинге генов одной и той же хромосомы, что может быть объяснено недостатком или избытком продуктов одних и тех же генов.

Предполагается, что молекулярным механизмом геномного импринтинга являются различные химические модификации ДНК, например, метилирование. По-видимому, существуют несколько генов-модификаторов, ответственных за импринтинг, которые у самцов и самок работают поразному. Поэтому у особей одного пола, но обладающих разными генами-модификаторами, будут различаться и наборы модифицируемых генов.

1.5. Активация яйца

Оплодотворение должно привести к началу развития зиготы, при этом в яйце активируется запрограммированная цепь метаболических событий.

Первое событие, которое происходит после оплодотворения, — это деполяризация мембраны яйцеклетки. Однако сама деполяризация еще не активирует яйцо.

Второе событие — это кратковременное увеличение концентрации ионов Ca^{+2}, которое распространяется от места внедрения сперматозоида в виде «сферической волны». Именно это событие является пусковым сигналом для активации яйцеклетки. Если искусственно повысить концентрацию Ca^{+2} в яйцеклетке, то это приведет к ее активации, и, наоборот, если ввести вещества, связывающие ионы Ca^{+2} (ЭДТА), то активации яйца не происходит даже при деполяризации мембраны. Ионы Ca^{+2} в яйцеклетках связываются с белком кальмодулином, а последний, в свою очередь, активирует много других белков, запуская целый ряд метаболических реакций. При оплодотворении повышение концентрации Ca^{+2} происходит очень быстро в течение 25 секунд. По-видимому, это связано с инозитолфосфолипазным механизмом клеточной сигнализации. Определенная акросомная молекула, взаимодействуя со специфическими рецепторами на мембране яйцеклетки, инициирует через G-белок мембранную фосфолипазу-С, которая способствует гидролизу фосфотидилинозитол-4,5-бифосфата на диацилглицерол (ДАГ) и инозитол-3-фосфат (ИЗФ). Затем ИЗФ диффундирует в ооплазму и открывает Са-каналы в мембранах ЭПС, что способствует высвобождению из нее Ca^{2+} (рис. 14).

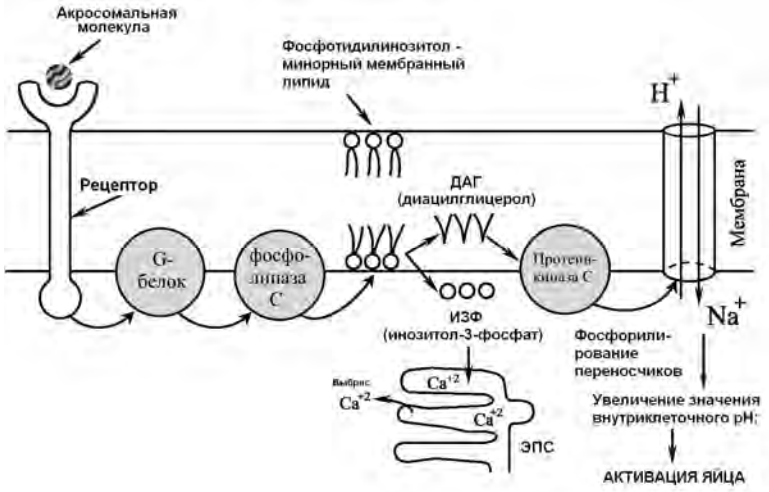


Рис. 14. Инозитолфосфолипазный механизм, приводящий к активации яйца

В свою очередь, ДАГ активирует мембранную протеинкиназу-С, и она фосфорилирует белок-переносчик ионов Na^+ и H^+. Ионы Na^+ переносятся в яйцеклетку, а протоны H^+ выводятся наружу. При этом происходит

повышение значения pH с 6,8 до 7,2. Увеличение внутриклеточного pH приводит к включению белкового синтеза, репликации и транскрипции ДНК. Кроме того, в яйцеклетке активируется фермент НАД-зависимая-киназа, который катализирует фосфорилирование НАД и превращение его в НАДФ, который в качестве ко-фермента используется в биосинтезе липидов, а липиды необходимы для построения плазматических мембран новых клеток при дальнейшем дроблении зиготы.

Одновременно с этими процессами в оплодотворенной яйцеклетке увеличивается потребление кислорода для окисления запасенных веществ.

У многих видов животных сразу же после оплодотворения начинается расслоение и перемещение компонентов ооплазмы яйцеклетки. Это явление называют ооплазматической сегрегацией. Так, у морского ежа до оплодотворения вся поверхность яйца содержит красный пигмент эухром, а после оплодотворения он концентрируется в виде пояска на экваторе яйца.

У оболочников Styela partita неоплодотворенные яйца содержат гомогенно рассеянные по кортикальному слою желтые гранулы, окружающие центральную серую ооплазму. После оплодотворения разные участки ооплазмы окрашиваются по-разному: желтые гранулы оказываются под экватором в области так называемого желтого серпа, а на противоположной стороне появляется серый серп. Вегетативный полюс заполняется ооплазмой с митохондриями и желтком, а анимальный — прозрачной безжелтковой ооплазмой. Явление ооплазматической сегрегации, которое называют эффектом мозаичных яиц, еще раз свидетельствует о химической асимметрии яйца. Указанный эффект позволяет проследить судьбу разных участков ооплазмы: желтый серп впоследствии дает начало мезодерме, серый серп — хорде, ооплазма вегетативного полюса будет соответствовать энтодерме, а анимального — эктодерме. Таким образом, оплодотворение запускает цепь биохимических реакций, обеспечивающих начало развития зародыша, которое начинается с деления зиготы или дробления.

1.6. Клонирование

Клонирование – это способ создания абсолютных двойников живого существа.

Работы по клонированию позвоночных были начаты еще в 50-е годы прошлого столетия, но, несмотря на значительные достижения в этой области, проблема клонирования взрослых особей остается до сих пор не решенной.

В ходе исследований было установлено, что в процессе клеточной дифференцировки у амфибий, например, происходит необратимая инактивация определенных генов или их утрата. При этом теряется та часть генома, которая отвечает не за ранние, а за поздние этапы онтогенеза. Механизм этого явления пока не поддается научному объяснению.

Однако уже в конце 70-х годов прошлого столетия многие ученые и даже политики всерьез обсуждали проблему клонирования человека, поскольку была проведена попытка пересадить в человеческую яйцеклетку диплоидное ядро из сперматогония. Три такие реконструированные яйцеклетки даже начали дробление, которое прошло до стадии морулы, но позднее они деградировали.

Большинство ранних работ сводилось к клонированию эмбрионов домашних животных. В 1997 г. появилось сенсационное сообщение о получении клонального животного — овечки Долли. В этих экспериментах донорские ядра из клеток молочной железы овцы трансплантировали в ее же ооцит второго порядка. Из 227 ооцитов, подвергшихся трансплантации, родилась только одна Долли. В результате проведенного исследования было установлено, что если донорские ядра находились на стадии S- или G_2-периодов интерфазы, то при дальнейшем дроблении происходили дополнительные репликации ДНК, что, в свою очередь, приводило к анеуплоидии и к аномальному развитию реконструированного эмбриона. Если же донорские ядра находились на стадии G_0, то случаи хромосомных аномалий уменьшались. Тем не менее существенным недостатком этих работ явилась низкая выживаемость реконструированных яйцеклеток, которая составляла 0,36 %. Отсюда вытекает ряд важных вопросов, связанных с выяснением причин гибели зародышей, а именно:

1. Все ли донорские ядра обладают свойством тотипотентности (от лат. totalis — общий, целый + potentia — способность, сила, мощь)? [1]

2. Сохраняется ли весь набор генов, необходимый для нормального развития?

3. Все ли нужные для развития гены дерепрессируются в клетке?

В связи с этим главная задача клонирования на сегодняшний день сводится к созданию искусственно выращиваемых линий малодифференцированных (стволовых) клеток.

Ядра стволовых клеток могут обеспечить полное и нормальное развитие зародыша из реконструированной яйцеклетки, поскольку ооплазма

[1] Тотипотентностью называется свойство клетки реализовать при определенных условиях имеющуюся у нее генетическую информацию и дать начало целому организму.

создает необходимые условия для репрограммирования и восстановления тотипотентности соматических ядер.

Стволовые клетки выделяют из внутренней клеточной массы (ВКМ) на стадии бластоцисты. Эти клетки обладают высокой пролиферативной активностью и способны длительное время находиться в недифференцированном состоянии. Они имеют высокий уровень теломеразной активности, а также ферментативный механизм осуществления гомологичной рекомбинации между экзогенной и хромосомной ДНК. Стволовые клетки используют для изучения начальных стадий эмбрионального развития и клеточной дифференцировки, а способность управлять цитодифференцировкой может позволить использование эмбриональных стволовых клеток в заместительной терапии нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Кроме того, стволовые клетки обладают высокой совместимостью при трансплантации, и поэтому в лабораторных условиях можно культивировать предшественников любых человеческих клеток – сердечных, нервных, печеночных и т.д., а затем трансплантировать их больным людям вместо донорских органов.

Таким образом, проблема клонирования человека пока может быть связана только с созданием банка донорских тканей для конкретных индивидуумов.

Малоизученным остается влияние клонирования на полноценность развития, продолжительность жизни и функциональные характеристики. Существуют и определенные этические возражения против клонирования человека, которые можно свести к следующим положениям:

1. Создание человеческих клонов нарушает человеческое достоинство и уникальность.

2. Клонирование может привести к созданию монстров и уродов.

3. Клонирование сократит генетическое разнообразие и сделает человечество более уязвимым к эпидемиям.

4. Немаловажным является также тот факт, что согласно всем религиозным учениям, появление человека на свет – есть «промысел божий», следовательно, зачатие и рождение должны происходить естественным путем.

2. ДРОБЛЕНИЕ

Дробление — это серия митотических делений, в результате которых объем ооплазмы яйца распределяется в клетки меньшего размера. Образующиеся при дроблении клетки называют бластомерами. В период дробления объем зародыша не увеличивается, так как деления цитоплазмы не сопровождаются ростом объема бластомеров. Между делениями дробления происходит «выпадение» интерфазного периода роста, который необходим для поддержания относительно постоянного соотношения между объемами цитоплазмы и ядра.

Клеточный цикл бластомеров очень упрощен, он состоит из S-периода интерфазы и собственно митоза, тогда как у обычных соматических клеток клеточный цикл состоит из G_1, S и G_2-периодов интерфазы и митоза (рис. 15).

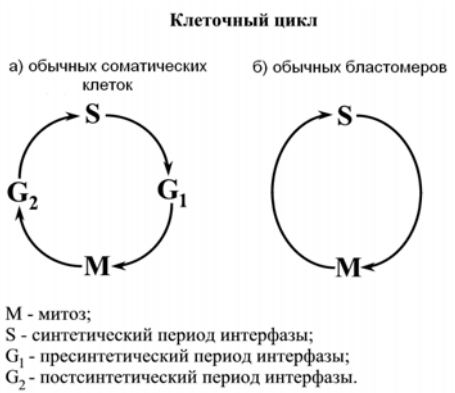


Рис. 15. Схемы клеточных циклов

Факторы, регулирующие двухфазный цикл дробления, локализуются в цитоплазме. К ним относятся: митозстимулирующий фактор (MPF) и цитостатический фактор (CSF). Кроме того, важным является присутствие ионов Ca^{2+}, которые высвобождаются при кортикальной реакции. Показано, что активность MPF в дробящихся клетках циклически меняется. Максимальная активность наблюдается в митозе, а минимальная — в S-периоде. Известно, что CSF-фактор стабилизирует MPF-фактор,

и активность последнего увеличивается. Ионы Ca^{2+} инактивируют CSF, при этом активность MPF падает (рис. 16).

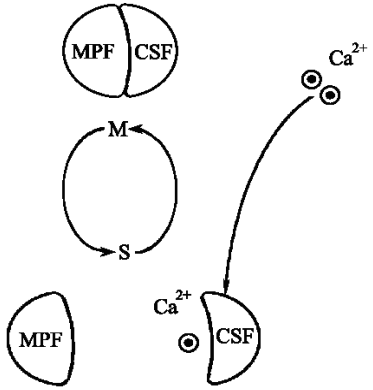


Рис. 16. Действие факторов, регулирующих двухфазный цикл при дроблении: CSF — цитостатический фактор; MPF — митозстимулирующий фактор (имеет максимальную активность в комплексе с CSF; Ca^{2+} — инактивирует CSF, MPF имеет минимальную активность в S-фазе

Таким образом, на ранних стадиях развития белковые факторы ооплазмы зиготы определяют скорость клеточных делений (продолжительность M- и S-фаз). Обычно после 12–14 делений дробления восстанавливается нормальный 4-фазный клеточный цикл.

Видовые особенности дробления определяются количеством и расположением желтка в яйце, а также присутствием ооплазматических факторов, влияющих на ориентацию митотического веретена. При неравномерном расположении желтка в яйце (как у рыб, амфибий, рептилий и птиц), дробление яйца может быть частичным или неполным, так как борозды дробления не могут пересечь область, богатую желтком. Такой тип дробления называется меробластическим. При равномерном распределении желтка или его малом количестве (например, у ланцетника или иглокожих), дробление может быть полным. В таком случае оно называется голобластическим. Однако наличие желтка — это только одна из причин, влияющих на характер дробления, поскольку еще существует и генетическая детерминация клеточных делений.

Желток в яйце является эволюционным приспособлением, обеспечивающим питание зародыша, не получающего пищи извне. Яйца млекопи-

тающих не содержат большого запаса желтка, так как они развиваются в материнском организме с образованием плаценты.

В результате ооплазматической сегрегации разные морфогенетические факторы оказываются в разных областях яйца, а в процессе дробления — в разных бластомерах. Морфогенетические факторы определяют дальнейшую судьбу бластомеров и дифференцировку клеток. Таким образом, деления дробления детерминированы, и уже с ранних стадий бластомеры отличаются друг от друга по величине, форме, по расположению и внутриклеточным компонентам. Каждый бластомер дает начало строго определенным зачаткам органов.

При дроблении наиболее важными являются два этапа. Первый — это образование стадии клеточного узелка из 16 клеток. Эта стадия называется морулой (лат. morula уменьш. от morum — тутовая ягода). При этом между бластомерами образуются новые межклеточные взаимодействия, возникают плотные и щелевые контакты. На этом же этапе происходит усиление асимметрии, возникшей еще в оогенезе, и ее дальнейшая реализация в развитии.

Вторым важным этапом дробления является образование стадии бластулы. Бластула формируется как крупный клеточный шар, начиная со 128 клеток, с полостью внутри. Такая полость называется бластоцель. Ее образование имеет большое значение, потому что создается возможность для миграции клеток внутрь полости, и предотвращаются преждевременные контакты между клетками. Бластула морского ежа представляет собой однослойный клеточный полый шар (целобластула). У амфибий бластула (амфибластула) — это многослойный полый шар, состоящий из клеток разного размера, поскольку на анимальном полюсе клетки делились быстрее, чем на вегетативном (рис. 17).

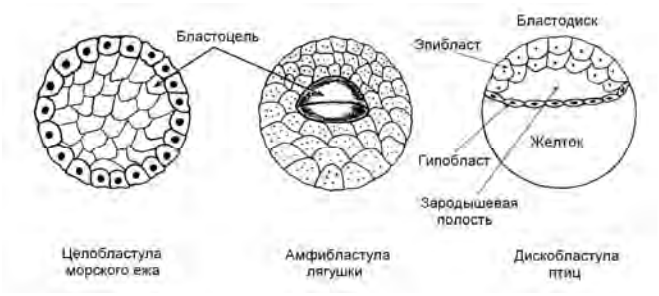


Рис. 17. Строение бластул

У птиц и рептилий, у которых яйца богаты желтком, образуется диск из нескольких слоев бластомеров, располагающихся один над другим. Затем между желтком и бластомерами возникает зародышевая полость. Большая часть клеток остается на поверхности и образует эпибласт, а меньшая — мигрирует в полость и образует гипобласт. Эта стадия соответствует бластуле (дискобластула).

Труднее всего изучать дробление яиц млекопитающих, так как оно идет резко отлично от других видов организмов.

У человека из яичника высвобождается ооцит II порядка, и оплодотворение происходит в верхней трети яйцеводов (рис. 18).

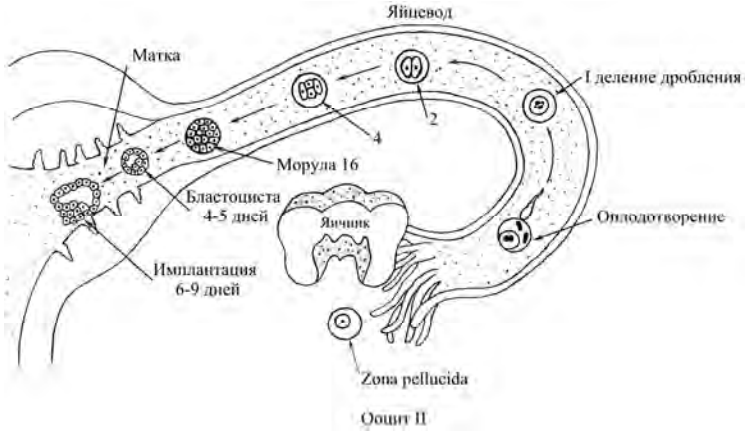


Рис. 18. Раннее дробление зиготы у человека

Деления дробления характеризуются следующими особенностями: 1) очень медленные (12–24 часа на 1 дробление); 2) неравномерные (бластомеры могут иметь разный размер); 3) несинхронные, в зародыше может быть нечетное число бластомеров; 4) на стадии восьми клеток происходит явление компактизации. До этого этапа бластомеры располагались рыхло, между ними были небольшие пространства. На стадии восьми клеток бластомеры сближаются, площадь их контакта резко увеличивается. Между клетками наружного слоя образуются плотные контакты, а между клетками внутреннего — щелевые. Возникает позиционная асимметрия бластомеров вследствие их взаимодействия друг с другом. Асимметрия характеризуется наличием микроворсинок у наружных клеток, а также различием содержания специфических компонентов в наружных и внутренних клет-

ках. Возникшая асимметрия обеспечивает первый шаг в процессе дифференцировки клеток у млекопитающих.

Асимметрия связана и с изменением поверхностного аппарата клеток. Поверхностные молекулы гликопротеинов располагаются беспорядочно на стадии 4-х бластомеров, а на стадии 8 клеток они обнаруживаются только на полюсе бластомера, наиболее удаленного от центра.

В процессе компактизации участвует гликопротеин — увоморулин (кадгерин Е). Инактивация увоморулина вызывает декомпактизацию бластомеров. Принято считать, что кадгерины играют важную роль и на поздних стадиях развития позвоночных, так как их появление или исчезновение на поверхностях клеток коррелирует с морфогенетическими событиями, при которых ткани отграничиваются друг от друга. Кроме того, мембрана клеток может изменяться за счет реорганизации цитоскелета, связанной с возникновением микроворсинок.

Бластомеры 8-клеточного компактного шара делятся еще раз, и образуется 16-клеточная стадия — морула. Дальнейшие деления дробления ориентированы так, чтобы использовать возникшую асимметрию и образовать клетки двух разных вариантов: 1) наружные клетки с микроворсинками и ассоциированными с ними специфическими компонентами, которые дадут начало клеткам трофобласта; 2) внутренние клетки, которые дадут ВКМ (рис. 19).



Рис. 19. Образование клеток трофобласта и ВКМ у млекопитающих

Клетки трофобласта секретируют в полость шара жидкость за счет активной работы K^+-Na^+-насоса, что приводит к образованию полости бластоцёля на стадии бластоцисты.

Клетки ВКМ отличаются от таковых трофобласта по виду и спектру белков. В дальнейшем из клеток ВКМ образуются зародышевые структуры и зародышевые оболочки — амнион, аллантоис и желточный мешок.

Клетки трофобласта не участвуют в образовании зародышевых структур, а формируют хорион, играющий важную роль в процессе имплантации и образования плаценты.

У млекопитающих яйцеклетка не обладает исходной асимметрией, поэтому до стадии 8-ми клеток бластомеры не детерминированы, и зародыш может развиваться из любого бластомера. Экспериментально доказано, что если одну из клеток 2-клеточного эмбриона мыши разрушить иглой, то из оставшегося бластомера разовьется нормальная мышь. Если же объединить два 8-клеточных эмбриона в одну гигантскую морулу, то тоже развивается нормальная мышь, которая будет состоять из генетически различных клеток (рис. 20).



Рис. 20. Объединение двух мышиных эмбрионов на стадии 8 клеток

Следовательно, до 8-клеточной стадии бластомеры млекопитающих функционально идентичны и обладают неограниченными потенциями. Этим можно объяснить образование однояйцевых близнецов (ОБ) у человека. Однояйцевые близнецы возникают путем разделения бластомеров на ранних стадиях или разделения клеток ВКМ. При этом возможны три варианта (рис. 21):

1. Примерно 33 % ОБ имеют два полноценных хориона и амниона, что указывает на срок разделения зародыша еще до появления клеток трофобласта и ВКМ (5 сутки беременности).

2. Примерно 65 % ОБ имеют общий хорион, но самостоятельные амнионы, значит, разделение зародыша произошло на стадии формирования ВКМ.

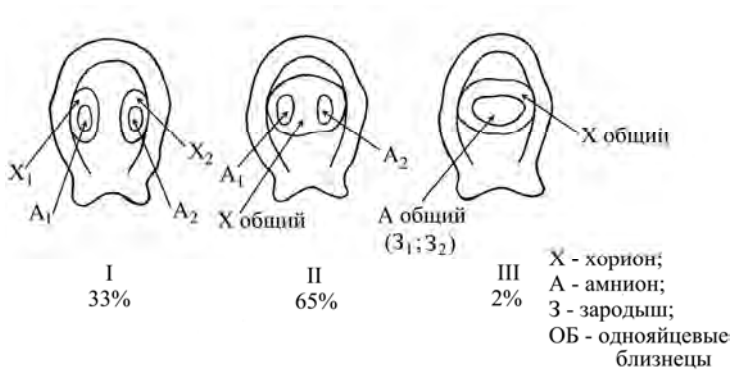


Рис. 21. Три варианта образования однояйцевых близнецов у человека

3. Только 2 % ОБ имеют общий хорион и общий амнион. Такие близнецы могут срастись между собой разными частями тела. Они и будут называться «сиамскими близнецами», на самом деле их правильнее называть «не до конца разделившимися близнецами».

3. ГАСТРУЛЯЦИЯ

После образования стадии бластулы наступает следующий важный этап развития — гаструляция.

Гаструляция — это процесс превращения многоклеточного полого шара бластулы в многослойную двустороннесимметричную структуру. При этом устанавливается план строения тела и формируются зародышевые листки экто-, энто- и мезодерма.

Все гаструляционные движения основаны на стандартном наборе клеточных движений. Это изменение формы клеток за счет вытягивания или сокращения, приклеивание и отделение клеток друг от друга или от матрикса, рост и деление клеток, а также секреция веществ, направляющих движение.

Процесс изменения формы и подвижности клеток связан с изменением клеточной поверхности и ее адгезивных свойств. Несомненно, что могут происходить и внутриклеточные изменения. Например, гаструляция у морского ежа начинается с уплощения вегетативного полюса сферической бластулы. В центре плоской вегетативной пластинки оказывается скопление мелких клеток, называемых микромерами. Они способны образовывать тонкие длинные выросты, или филоподии, и с их помощью мигрировать в бластоцель. Миграция становится возможной вследствие изменения химического сродства клеток бластулы. К внеклеточному матриксу сродство увеличивается, а к гиалиновому слою, образующемуся после оплодотворения, — уменьшается. При этом важным является участие двух белков — фибронектина и сульфатированного гликопротеина. Фибронектин является нормальным компонентом внеклеточного матрикса. Филоподии мигрирующих клеток прикрепляются к внутренней стенке бластоцеля и подтягивают вегетативную пластинку бластулы внутрь, образуя полость первичной кишки или гастроцель. Форма клеток вегетативной пластинки меняется. Образуется стадия двухслойного зародыша, которую называют гаструла. Наружный слой клеток является эктодермой, внутренний слой — энтодермой, а мигрировавшие в бластоцель микромеры становятся клетками первичной мезенхимы. Клетки мезенхимы перемещаются в центр гаструлы и дают начало целóму и мускулатуре (рис. 22).

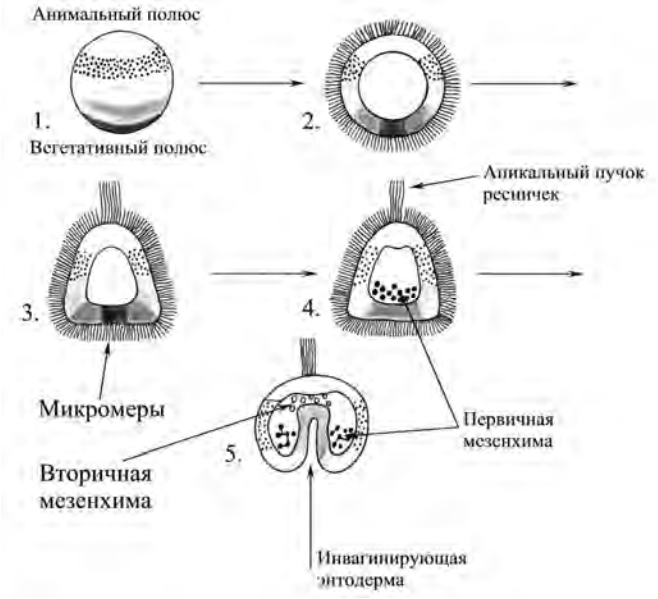


Рис. 22. Гаструляция у морского ежа:
1 – оплодотворенное яйцо; 2 – стадия бластулы;
3 – уплощение вегетативного полюса; 4 – миграция микромеров в полость;
5 – подтягивание вегетативного полюса внутрь бластоцеля
с образованием двухслойного зародыша.

Способ образования второго слоя клеток путем впячивания стенки бластулы называется инвагинацией. Отверстие гастроцеля называют первичным ртом, или бластопором. У первичноротых животных (кольчатые черви, моллюски, членистоногие) бластопор превращается в рот. У вторичноротых животных (позвоночные) дефинитивный рот возникает в другом месте, независимо от бластопора, а бластопор превращается в анус.

Кроме инвагинации, существуют еще несколько способов гаструляции, то есть образования двухслойного зародыша (рис. 23). К ним относятся:

1) иммиграция — выселение в бластоцель отдельных клеток с одного или многих полюсов;

2) эпиболия — обрастание крупных неподвижных клеток мелкими клетками;

3) деламинация — расслоение, расщепление слоев клеток и их дифференцировка в зависимости от положения внутри или снаружи.



Рис. 23. Различные способы гаструляции

Независимо от способа гаструляции достигается единая цель — привести внутрь зародыша клетки, предназначенные для образования энтодермальных органов, окружить зародыш клетками эктодермы, а между экто- и энтодермой поместить мезодермальные клетки. Мезодерма образуется либо независимо от первичных зародышевых листков, либо входит в состав одного из листков и позже вычленяется из него. У всех беспозвоночных, кроме иглокожих, мезодерма образуется из двух клеток телобластов. У иглокожих она вычленяется из первичной энтодермы, у ланцетника — из крыши гастроцеля в виде двух карманоподобных выступов. У пресмыкающихся, птиц и млекопитающих мезодерма мигрирует из первичной эктодермы через первичную полоску, которая аналогична бластопору.

3.1. Особенности гаструляции у млекопитающих

В основе гаструляционных движений у млекопитающих, как и у птиц и рептилий, лежат те же механизмы, что и у морского ежа. Это изменение формы клеток и их миграция, однако существуют и свои особенности.

Они связаны с тем, что яйца млекопитающих имеют мало желтка. Клетки ВКМ «сидят» на верхушке воображаемого шара, заполненного желтком, то есть можно сказать, что бластоцель аналогичен пространству, которое в яйцах птиц и рептилий заполнено желтком. Первое разделение клеток ВКМ заключается в формировании двух слоев — эпибласта и гипобласта. Из эпибласта образуются зародышевые структуры и выстилка амниона, из гипобласта развивается внезародышевая энтодерма желточного мешка (рис. 24).

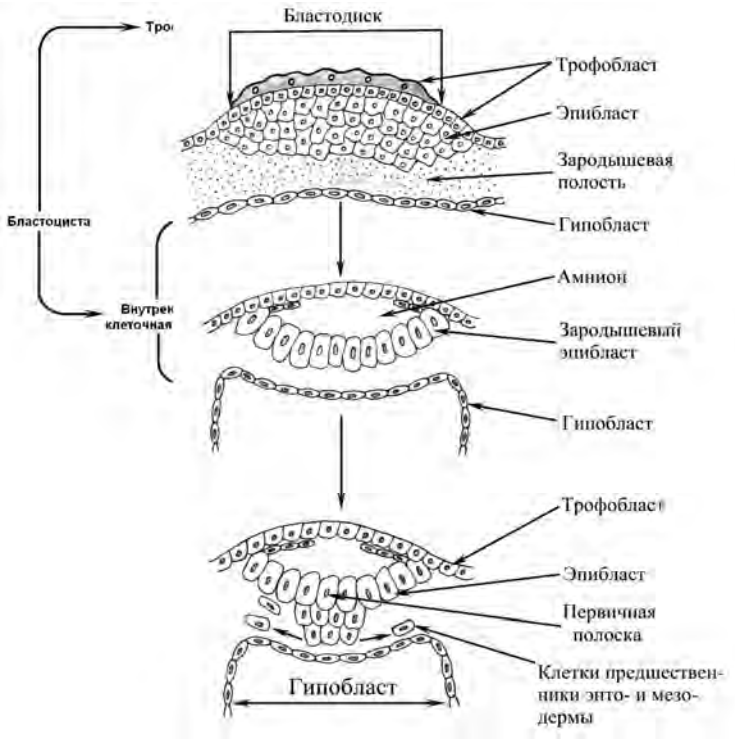


Рис. 24. Гаструляция у млекопитающих

Дальнейшее развитие эмбриона происходит из клеток зародышевого эпибласта. На его заднем конце формируется небольшое утолщение — первичная полоска. Через полоску происходит миграция клеток, являющихся предшественниками энто- и мезодермы (рис. 25).

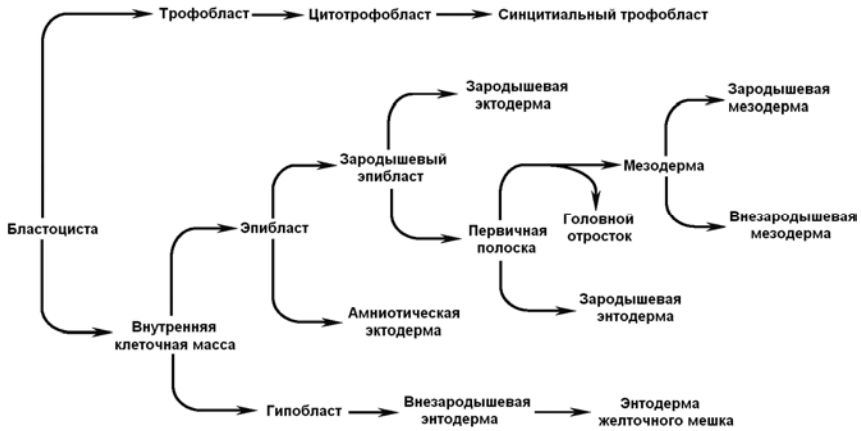


Рис. 25. Происхождение различных тканей у зародыша человека

Таким образом, гаструляция — это серия хорошо скоординированных движений клеток, приводящих к перераспределению бластомеров и их взаимодействию. Механизмы движений клеток являются общими для большинства живых организмов. В результате гаструляции образуется стадия трехслойного зародыша с эктодермой снаружи, энтодермой внутри и мезодермой посередине, что в общих чертах соответствует организации взрослых особей с эпидермисом снаружи, кишкой внутри и соединительной тканью между ними. После гаструляции условия для формирования новых органов зародыша подготовлены.

Из эктодермы развиваются покровы тела, нервная система и органы чувств. Из энтодермы развиваются кишка и ее производные, а также легкие. Из мезодермы образуются мышцы, скелет, сердечно-сосудистая и мочеполовая системы.

4. ФОРМИРОВАНИЕ ЗАРОДЫШЕВЫХ ОБОЛОЧЕК

В период эмбрионального развития для обеспечения жизнедеятельности и защиты зародыша у высших позвоночных (амниот) образуются зародышевые оболочки хорион, амнион, аллантоис и желточный мешок. Эти оболочки формируются из внезародышевых частей экто-, энто- и мезодермы.

Хорион — это наружная ворсинчатая оболочка зародыша. У человека хорион образуется на ранних стадиях развития из клеток трофобласта, часть из которых способна делиться митотически без цитокинеза. Образуется синцитиальный трофобласт, который внедряется в слизистую стенку матки, образуя ворсинки хориона, и в дальнейшем контактирует с кровеносными сосудами материнского организма. Затем из внезародышевой мезодермы формируются кровеносные сосуды пупочного канатика, несущие питательные вещества от матери к зародышу. Хорион сливается со стенкой матки и образует плаценту. Плацента осуществляет связь между организмом матери и плодом, обеспечивая газообмен плода, транспорт питательных веществ и продуктов метаболизма (рис. 26).

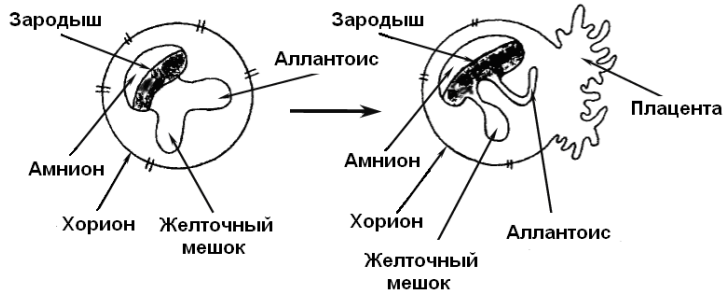


Рис. 26. Развитие зародышевых оболочек у млекопитающих

Хорион продуцирует хорионический гонадотропин. Это пептидный гормон, который побуждает клетки плаценты и яичника вырабатывать стероидный гормон прогестрон, необходимый для поддержания состояния беременности. Кроме того, хорион продуцирует хорионический соматомаммотропин, стимулирующий развитие молочных желез. Он также защищает плод от иммунной атаки материнского организма. Клеточные

мембраны синцитиального трофобласта содержат вещество, локально подавляющее деление клеток иммунной системы матери.

Амнион — это водная оболочка зародыша, примыкающая к стенке матки. Он заполнен амниотической жидкостью, которую секретируют клетки амниона. Выполняет функцию защиты от высыхания (у птиц и рептилий, развивающихся на суше) и функцию защиты от механических повреждений у млекопитающих (см. рис. 26).

Аллантоис — оболочка, которая закладывается как вырост заднего отдела кишки зародыша. Она участвует в образовании системы пупочных сосудов, входящих в плаценту. У птиц и рептилий аллантоис служит эмбриональным органом дыхания и сбора продуктов азотистого обмена, а на более поздних стадиях развития он превращается в клоаку. У млекопитающих размер аллантоиса зависит от того, как плацента справляется с удалением конечных продуктов обмена. У человека аллантоис является рудиментарным органом, его часть превращается в мочевой пузырь.

Желточный мешок образуется из энтодермы путем обрастания желтка клетками. Он представляет собой вырост среднего отдела первичной кишки. В стенке желточного мешка образуются первичные клетки крови и кровеносные сосуды, кроме того в энтодерме желточного мешка накапливаются первичные половые клетки, которые по современным представлениям обособляются у млекопитающих на стадии ранней гаструляции из клеток эпибласта.

Таким образом, желточный мешок выполняет функции питания, дыхания и кроветворения. У зародыша человека желточный мешок рудиментарен и представлен пупочным пузырьком, соединенным с кишкой. На поздних стадиях развития желточный мешок вообще исчезает.

5. ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА

Активное разрастание внезародышевых частей — хориона, амниона, аллантоиса и желточного мешка начинается у человеческого эмбриона к концу второй недели беременности. Идет подготовительная работа, развиваются те части, которые должны обеспечить зародыш питанием, дыханием и выведением продуктов метаболизма. К концу третьей недели беременности начинает формироваться плацента, а к концу четвертой — тело эмбриона обособляется от внезародышевых частей. Длина тела зародыша в этот период составляет всего 7–8 мм. Полностью образуется желточный мешок, который на первых порах выполняет функции кроветворения, дыхания и питания. Именно здесь закладываются первичные половые клетки. Затем появляется зачаток кишки, слепо замкнутый с двух сторон. Формируется нервная система. Начинается дифференцировка мезодермы, из которой образуется скелет, мышцы и соединительная ткань.

К концу второго месяца длина зародыша составляет 30–32 мм. По бокам тела закладываются зачатки рук и ног, формируются половые железы. К концу третьего месяца эмбрион уже имеет основные черты, сходные с новорожденным. Таким образом, органогенез к этому сроку в основном заканчивается. При дальнейшем развитии происходит усиленный рост, окончательная дифференцировка клеток и образование тканей — гистогенез.

В индивидуальном развитии выделяют периоды, которые являются критическими для будущей судьбы зародыша. Критические периоды — это ряд последовательных этапов с наибольшей скоростью развития разных систем органов, связанных с реализацией новых объемов генетической информации. Среди критических периодов выделяют: имплантацию, образование плаценты, образование нервной системы, формирование конечностей, закладку сердца, формирование половых органов и т.д. (табл. 1).

Согласно современным представлениям любые внешние факторы, воздействующие в критические периоды и приводящие либо к гибели зародыша, либо к аномалиям его строения, называют тератогенами. Аномалии строения или уродства в основном возникают в период органогенеза, когда органы закладываются еще из малоспециализированных клеток. Поскольку органогенез заканчивается к концу третьего месяца беременности, то можно сказать, что надо как минимум «иметь два хороших месяца для хорошей жизни!».

Таблица 1. Действие внешних факторов в критические периоды развития зародыша [3]



Все врожденные аномалии являются результатом отклонения от нормального эмбрионального развития. Это может быть задержка формирования образующихся зачатков, их искажение или подавление. Показано, что примерно 90 % спонтанно абортированных зародышей при сроке беременности до одного месяца имеют хорошо различимые аномалии. Среди родившихся детей 5 % имеют явные уродства.

Тератогенные факторы, вызывающие уродства, можно сгруппировать в пять больших классов:

1. Физические факторы (радиация, СВЧ-излучение).
2. Химические вещества (алкоголь, никотин, гербициды и т.д.).
3. Лекарственные препараты (талидомид, аспирин, хинин, цисретиноевая кислота).
4. Болезни матери во время беременности (инфекционные, вирусные и протозойные: сифилис, краснуха, малярия, токсоплазмоз, диабет).
5. Генетические ошибки (генные, геномные и хромосомные болезни человека).

Тератогенное действие факторов этих классов сводится к возникновению дефектов разных систем органов — зрения, слуха, сердечно-сосудистой системы, опорно-двигательного аппарата, строения конечностей и, главное, психомоторного развития.

Ежегодно в мире рождаются сотни тысяч детей-уродов. Понять причины уродств, обнаружить факторы, их вызывающие, разработать методы их раннего выявления и способы предупреждения — это задача не только эмбриологов, но и медиков.

6. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ РАННИХ ЭТАПОВ РАЗВИТИЯ

Главной задачей развития является формообразование, или становление пространственной формы тела, и эти формы могут быть самыми разнообразными, как у жирафа, слона, лягушки или человека. Любой организм можно рассматривать как клон клеток, возникших из одной диплоидной зиготы в результате ее последовательного деления и дифференцировки. В организме человека, например, существует примерно 250 типов разных специализированных клеток, которые образуются при помощи весьма ограниченного набора форм клеточной активности: роста, размножения, движения, соединения и изменения формы клеток. Все клетки получают генетические инструкции, но интерпретируют их по-разному, с учетом времени и обстоятельств.

Почти 50 лет назад было установлено, что в процессе дифференцировки клеток одни гены включаются, а другие — выключаются. Этот факт был продемонстрирован в экспериментах по трансплантации ядер из дифференцированной клетки в зиготу без ядра на шпорцевой лягушке Xenopus laevis (рис. 27).

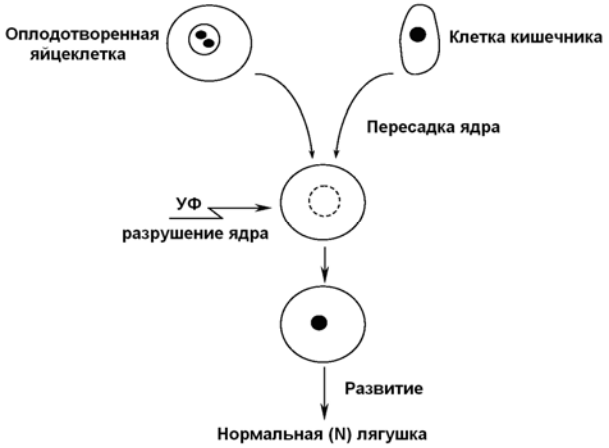


Рис. 27. Трансплантация ядер из дифференцированной клетки в зиготу без ядра у лягушки Xenopus laevis

Ультрафиолетовым облучением в оплодотворенной яйцеклетке лягушки разрушали ядро. Затем в безъядерную яйцеклетку пересаживали диплоидное ядро из дифференцированной клетки кишечника лягушки. Такая «гибридная» зигота развивалась в нормальную лягушку.

По результатам экспериментов было сделано два важных вывода.

1. В ядре дифференцированной соматической клетки содержится вся необходимая для развития генетическая информация, но часть генов в клетке выключена. При пересадке ядра из дифференцированной клетки в зиготу эти гены включаются и могут быть использованы для повторения процесса развития.

2. Активация генов происходит под действием компонентов ооплазмы оплодотворенного яйца.

До сих пор одной из главных тайн развития остается способность организма «дирижировать» активностью своих генов. Важно понять какие сигналы и гены руководят дифференцировкой клеток, формирующих тело эмбриона.

В процессе дифференцировки происходит образование специализированных тканей, клетки которых содержат специфические наборы белков. Например, в мышечных клетках имеется сократительный белок миозин, в клетках эпидермиса — белок кератин, в клетках крови — эритроцитах — гемоглобин. Следовательно, в этих клетках работают только определенные наборы генов.

У большинства живых организмов работа генов регулируется на уровне транскрипции. Основными регуляторными сигналами являются сложные белковые ансамбли, которые называют транскрипционными факторами. Для включения или выключения генов эти факторы должны связываться с ДНК, а именно, с регуляторными элементами (инициаторами и модуляторами) гена-мишени. Ансамбль транскрипционных факторов можно рассматривать как компьютер, в котором сигналы складываются в различные комбинации, и поэтому могут включаться и выключаться разные гены.

В настоящее время известно несколько сотен различных транскрипционных факторов, большинство из которых может быть отнесено к классу белков со специфической молекулярной структурой. К ним относятся сайт-специфические ДНК-связывающие белки типа «цинковые пальцы» (рис. 28), белки, содержащие «мотив лейциновой молнии», а также белки, построенные по принципу «спираль–складка–спираль» или «спираль–петля–спираль».

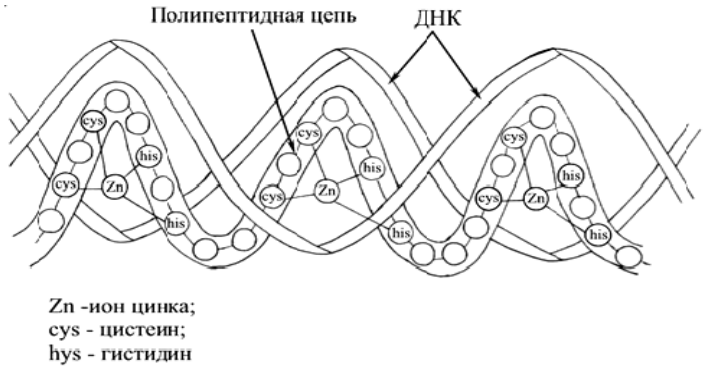


Рис. 28. ДНК-связывающий белок типа «цинковые пальцы»

Эти белки имеют узнающий участок, в котором аминокислотная последовательность образует водородные связи с определенными последовательностями нуклеотидов ДНК.

Показано, что многие транскрипционные факторы являются димерами, и составляющие их субъединицы могут быть разными или одинаковыми, то есть образуют гомо- или гетеродимеры. Такое перекомбинирование транскрипционных факторов создает возможность достаточно небольшому количеству регуляторных молекул управлять множеством подчиненных генов. Например, если есть четыре субъединицы А, В, С и Д, то они могут образовать десять различных димеров: АА, АВ, АС, АД, ВВ, ВС, ВД, ДД, СС, СД.

Для транскрипционных факторов существует правило «четырех К»: 1) кооперация; 2) конкуренция; 3) комбинация; 4) концентрация.

Ранее было отмечено, что большинство животных (моллюски, кольчатые черви, морские ежи, насекомые, асцидии, амфибии) имеют асимметричные или полярные яйца. Пространственная неоднородность оо-плазмы яйца или **полярность** возникает на ранних стадиях оогенеза задолго до оплодотворения. Показано, что существует анимально-вегетативный градиент в строении поверхности яйца; в локализации внутримембранных частиц; градиентные различия в подвижности липидов; полярность в локализации желточных и пигментных гранул, клеточных органоидов, РНК и белков. Эта асимметрия ооплазмы может определять пространственную организацию тела зародыша и судьбу эмбриональных клеток. Факторы, детерминирующие судьбу отдельных зачатков эмбриона, называют морфогенетическими факторами, или **морфогенами**.

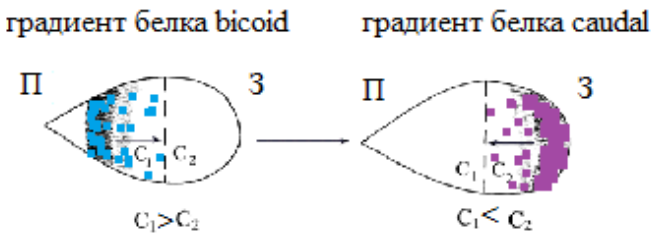
Существуют экспериментальные доказательства наличия морфогенов и их неслучайного асимметричного расположения в яйце. Например, в оплодотворенном яйце дрозофилы хорошо различимы передняя и задняя части. Если иголкой проколоть яйцо в передней части и дать вытечь небольшому количеству ооплазмы из передней области, то разовьется эмбрион без головы. А если в переднюю часть яйца инъецировать ооплазму из задней области, то разовьется эмбрион с двумя задними частями тела. При этом ооплазма нормального яйца может исправить дефект, если она взята из передней части. Таким образом, уже в яйце дрозофилы определяется передне-задняя ось эмбриона.

По молекулярной природе большинство морфогенов относят к специфическим рибонуклеопротеидам, или белкам, которые выступают в роли транскрипционных факторов. Считается, что предопределенность их расположения связана с системой цитоскелета яйца (у дрозофилы, амфибий и млекопитающих). Также получены данные об ассоциации белков и рибосом с такими компонентами цитоскелета, как микротрубочки и микрофиламенты.

Взаимодействие морфогенов с цитоскелетом стабилизирует их пространственное расположение, а, с другой стороны, может выполнять функцию трансляционного контроля. На яйцах морского ежа продемонстрирована зависимость уровня белкового синтеза от степени развития цитоскелетной системы. Химические агенты колхицин и винбластин, которые специфически разрушают микротрубочки, препятствуют нормальной цитоплазматической сегрегации.

Так как обнаруживаемые в яйце морфогены или транскрипционные факторы, содержались в нем еще до оплодотворения, то гены, контролирующие их структуру, работали еще в оогенезе, то есть являются **материнскими генами**. Работа материнских генов не зависит от генотипа зиготы. В частности, у дрозофилы идентифицировано несколько генов с материнским эффектом. К ним относятся гены bicoid, snake, oskar и caudal. Продуктами этих генов являются белки с соответствующими названиями. Градиенты этих белков обнаруживаются в яйце после оплодотворения (рис. 29).

Мутации в этих генах приводят к развитию дефектного зародыша (bic/bic — эмбрион без головы, caud/caud — эмбрион без задних структур брюшка, snake/snake — без кутикулы и без брюшных структур).



ПЗ — передне-задняя ось тела

Рис. 29. Градиенты белков-морфогенов (С1и С2) в оплодотворенном яйце дрозофилы

При делениях дробления зиготы происходит неслучайное распределение полярных участков ооплазмы, или **ооплазматическая сегрегация**. В результате этого исходно идентичные ядра образующихся бластомеров оказываются в разном химическом окружении, то есть содержат разные наборы морфогенов. Каждый морфоген имеет свой ген-мишень, поэтому в разных бластомерах будет наблюдаться различный характер генной экспрессии. В конечном счете, именно от этого будет зависеть клеточная дифференцировка.



Рис. 30. Ооплазматическая сегрегация окрашенных в разные цвета морфогенов в разные бластомеры при дроблении зиготы мыши

При дроблении зиготы образуются много бластомеров, которые вступают между собой в межклеточные взаимодействия. Их называют **эмбриональной индукцией**. Она проявляется в изменении силы натяжения и упругости клеток и образовании клеточных контактов. Клетки начинают реагировать даже на слабые сигналы от других клеток, при этом образуются новые поверхностные рецепторы или секреторные белки. Таким образом, при появлении новых межклеточных взаимодействий должны включаться и новые наборы генов. Эти гены должны будут контролировать структуру секреторных белков, которые и играют важную роль в индукционных взаимодействиях и передаче клеточных сигналов. Кроме того, эти гены должны контролировать структуру трансмембранных рецепторов и структуру компонентов цитоскелета.

Многие гены обладают мощным плейотропным эффектом, запуская через ряд каскадных механизмов синтез огромного числа других молекул, направляющих клетку по пути дифференцировки. Следовательно, в результате эмбриональной индукции происходит переключение путей развития клеток. Явление эмбриональной индукции можно продемонстрировать на специально разработанных генетических методиках. Так, у мышей известен ген Т, который имеет много рецессивных аллелей. Гомозиготы по рецессивным аллелям прерывают свое эмбриональное развитие на разных этапах. Гомозиготы по аллелю t12/t12 погибают на стадии морулы, а у гомозиготы tw73/tw73 нарушается имплантация. Таким образом, каждый мутантный аллель, вероятно, блокирует развитие на стадии, когда появляются новые межклеточные взаимодействия. Возникает гипотеза о том, что ген Т контролирует развитие путем изменения свойств поверхностей клеток и изменения клеточных контактов. Установлено, что некоторые аллели t, оказывают влияние на мембрану сперматозоидов. Самцы t+/t– продуцируют сперматозоиды двух типов t+ и t–, которые различаются по антигенным свойствам. По неизвестной пока причине сперматозоиды t– имеют преимущества в оплодотворении перед сперматозоидами t+.

В работах последних лет было продемонстрировано использование эмбриональных стволовых клеток в сочетании с методом гомологичной рекомбинации, что открыло новые возможности для изучения направленного мутагенеза. При этом были получены линии мышей, у которых в результате направленных мутаций выключались определенные гены (генный таргетинг). Репрессия разных генов приводила у мышей к трем основным результатам:

1. Летальный эффект в эмбриогенезе или сразу же после рождения наблюдался при выключении следующих генов: nfl, Rb, N-myc, GAP, c-jun, c-myb, c-abl, BDNF, trk, TGF3.

2. Нарушение строения и функций разных органов, приводящее к гибели до наступления половой зрелости, наблюдалось при выключении генов: CNTF, Dlx-2, FNAR-1, Ki-ras, AT-2.

3. Нормальная жизнеспособность и плодовитость наблюдались при выключении генов: ApoE, N-ras, MyoD, pim1, c-fos.

Экспериментально показаны различия компонентов клеточных поверхностей у личинки морского ежа. Клетки, образующие кишку, и клетки, предназначенные для развития скелетных игл, окрашиваются поразному при использовании флуоресцирующих моноклональных антител. Таким образом, возникающая при дроблении эмбриональная индукция, происходит за счет изменения клеточных поверхностей и передачи сигналов между клетками. Дробление заканчивается образованием стадии бластулы, а затем начинается следующий этап — гаструляция.

Оказалось, что на стадии бластулы большое значение имеет положение бластомеров относительно друг друга. Расположение бластомеров формирует **позиционную информацию**. Значение позиционной информации показано в экспериментах по обмену участков эмбриональной ткани на стадии бластулы или при удалении участков бластодермы. Например, у дрозофилы удаление участков бластодермы приводит к специфическому повреждению тела взрослой мухи. Еще одним важным примером является исследование гинандроморфов. **Гинандроморф**ы — это особи, части тела которых состоят из клеток женского и мужского фенотипа. Женский пол дрозофилы определяется двумя XX-хромосомами, а мужской — одной X-хромосомой (XO).

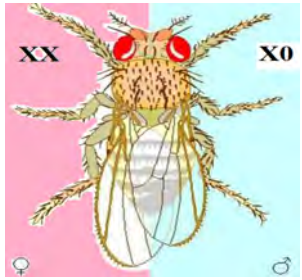


Рис. 31. Гинандроморфы дрозофилы

Гинандроморфы могут образоваться, если зигота с хромосомным набором «XX» в митозе потеряет одну из X-хромосом. Образуется мозаик XO/XX. Такие мозаики во взрослом состоянии являются частично самцами, а частично самками. Если маркировать одну из X-хромосом геном, изменяющим, например, окраску тела, то разные части тела гинандроморфов будут хорошо различимы. Получается много вариантов мозаичного расположения мужских и женских частей тела. Следовательно, на стадии бластодермы

клетки XX и XO занимали разное пространственное положение. При этом каждая клетка уже тогда должна была «знать», какой части тела она будет принадлежать. Таким образом, задолго до появления внешних признаков дифференцировки определяется судьба клеток или пути их развития. Выбор пути развития контролируется на начальных этапах материнскими генами, а затем включаются **зиготические гены** (схема 1).

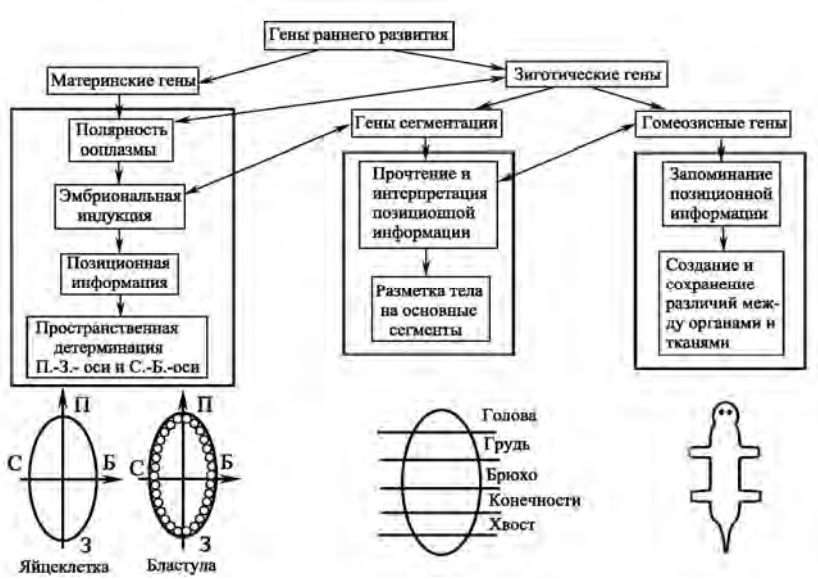


Схема 1. Гены раннего развития и их действие

Показано, что работа многих зиготических генов регулируется продуктами материнских генов, причем они могут их включать или выключать. Так, зиготический ген Zerknult в норме должен экспрессироваться в дорзальных структурах зародыша дрозофилы в присутствии материнского гена snake. Если ген snake оказывается мутантным, то ген Zerknult экспрессируется и в дорзальных и в вентральных структурах, что приводит к повреждениям тела дрозофилы.

При включении зиготических генов клетки уже знают, какой части тела они будут принадлежать и приобретают характерные признаки для образования основных сегментов тела. То есть, происходит интерпретация позиционной информации, в результате создания и прочтения которой

определяются **передне-задняя, спинно-брюшная оси**, и тело разбивается на основные сегменты — голову, грудь, брюхо, хвост и конечности.

Гены, контролирующие этот этап, называют **генами сегментации**. Почти все они являются регуляторами транскрипции. Клетки каждого сегмента тела приобретают свойства, которые должны предупреждать их случайное перемешивание. Клетки сегментов должны оставаться в соответствующих сегментах, а сохранение места этим клеткам должно обеспечиваться за счет селективного слипания клеток, имеющих одинаковые молекулярные адреса. У ранних эмбрионов птиц и амфибий известны стабилизирующие эффекты межклеточной адгезии. Если же искусственно диссоциировать клетки куриного эмбриона, то происходит формирование трехслойной структуры зародыша с эктодермой снаружи, энтодермой внутри и мезодермой между ними.

По мере роста эмбриона информация добавляется и уточняется, затем образуется внутренняя детальная сеть информации, которая приводит к формированию органов и тканей. При этом в каждой клетке такая детальная информация должна закрепляться. Это явление называют **клеточной памятью.** Благодаря ей все клетки взрослого организма стойко сохраняют дифференцированное состояние.

У млекопитающих изучены 3 гена сегментации — Sonic (SHH), Desert (OH) и Indian hedgehog (IHH), отвечающие за контроль право-левой симметрии, формирование скелета и детерминацию полярности клеток ЦНС, сомитов и конечностей. Показано, что мутации гена Sonic нарушают разделение развивающегося головного мозга на два отдельных полушария и желудочки, что приводит к голопрозэнцефалии.

Сложная иерархическая система генов расчленяет зародыш в разных направлениях с помощью своих продуктов-морфогенов, образующих концентрационные градиенты, которые включают работу других генов.

Затем этот процесс повторяется в более мелком масштабе под контролем другой группы **гомеозисных зиготических генов**, приводя к возникновению и запоминанию внутренней детальной сети информации, для того чтобы установить границы каждого сегмента тела и сформировать специфические различия между ними.

Мутации в гомеозисных генах вызывают появление на месте одного органа совершенно другого. Например, у дрозофилы известны такие мутации, при которых образуется вторая дополнительная пара крыльев (bithorax) или на голове вместо антенн образуется пара ног (Anthenopedia). Было установлено, что такие изменения (ноги на голове) могут быть обусловлены

мутацией в одном гене, хотя развитие конечности контролируется несколькими десятками генов. Поэтому логично предположить, что гомеозисные мутации затрагивают регуляторные гены. Они управляют деятельностью большого количества подчиненных генов. С помощью методов генной инженерии гены Anthenopedia и bithorax были выделены и секвенированы. Оказалось, что эти гомеозисные гены содержали последовательность ДНК, которая имелась и в других регуляторных генах. Эти последовательности назвали гомеобоксами, которые были найдены в генах важных для развития организмов: у жуков, червей, амфибий, птиц и даже у человека. Сходство в организации гомеозисных генов у позвоночных и беспозвоночных позволяет предположить, что, имея продольную передне-заднюю ось, легче сегментировать тело, чем искать новые пути формообразования.

Показано, что гомеозисные гены кодируют структуру ДНК-связывающих белков, которые также выступают в роли транскрипционных факторов. Участок молекулы белка, соответствующий гомеобоксу, обеспечивает связывание белка с ДНК. Его называют гомеодомен.

Оказалось, что порядок расположения гомеозисных генов в хромосоме соответствует порядку расположения зон активности генов вдоль передне-задней оси. Выявить эти зоны можно по наличию в каждом сегменте тела специфических белков, являющихся продуктами гомеозисных генов. Причем наблюдаются удивительно ровные, параллельные друг другу границы областей распространения белков. Тело эмбриона разбивается на клеточные поля с разными возможностями развития.

Все позвоночные имеют 4 группы гомеозисных генов, из которых наиболее изученными являются гены семейства HOX, PAX и SOX.

Рассмотрим, например, развитие передней конечности у птиц. Она развивается из мезодермы, в которой экспрессируется гомеозисный ген X1HOX1 или сокращенно HOX1. Сначала образуется маленькая почка, внешне гомогенная. В ней имеется градиент белка HOX1, а затем появляются градиенты других белков — HOX5 и HOX2, имеющие обратное направление. По мере удлинения конечности активируются еще 3 гена HOX. Белки всех генов HOX обнаруживаются в ядрах клеток. Следовательно, эти белки являются ДНК-связывающими. Градиент белков может служить сигналом для определения положения клеток и направления их развития.

Нарушение работы гомеозисных генов приводит к нарушению строения тела. Если в ранний эмбрион амфибий вводили антитела к белку HOX1, то он при этом инактивировался, и ткань, которая в норме входила бы в состав спинного мозга, оказывалась в составе головного мозга. Если же в эм-

брион мыши вводили рекомбинантную ДНК, содержащую дополнительную копию мышиного гомеозисного гена, то этот ген работал по всей длине тела эмбриона, хотя в норме должен был работать только в задней части тела. У родившихся мышат имелись тяжелые дефекты головы — расщелина неба («волчья пасть»), дополнительные позвонки и ребра на шее.

Мутации генов семейства HOX у человека приводят к тяжелым дефектам кистей рук, например к синполидактилии. Мутации гена PAX3 (семейства «paired box») могут приводить к развитию синдрома Ваарденбурга, сопровождающегося нейросенсорной глухотой, депигментацией волос, гетерохромией радужек и телекантом. Мутации гена PAX6 приводят к развитию аниридии (отсутствие радужной оболочки глаза), которая является ключевым признаком для **WAGR**-синдрома: **W**ilms tumor (опухоль Вильмса), **A**niridia (аниридия), **G**enitourinary anomalies (аномалии мочевыделительного тракта, псевдогермафродитизм, гонадобластома, двусторонний крипторхизм), **R**etardation mental (умственная отсталость). Семейство генов SOX гомологично гену SRY, локализованному на Y-хромосоме. Мутации гена SOX9 вызывают кампомелическую дисплазию, множественные аномалии скелета и внутренних органов.

Таким образом, гомеозисные гены обеспечивают уточнение и детализацию судьбы клеток сегментов тела, вместе с этим происходит их окончательная дифференцировка.

В результате работы гомеозисных генов образуются органы и ткани, а на более поздних стадиях развития создаются молекулярные сигналы, «напоминающие» клеткам из какой части тела они происходят. Так, развитие конечности обеспечивается несколькими различными способами дифференцировки мышечных, хрящевых, костных и соединительно-тканных клеток. Эти разные клетки расположены в пространстве весьма сложно. Кроме того, конечности могут быть передними и задними, а типами входящих в них клеток они не отличаются. При этом каждая конечность характеризуется определенным и различным расположением клеток в пространстве. Следовательно, эти различия связаны со структурами, возникшими еще до дифференцировки. Если пересадить ткань бедра из медиального отдела зачатка ноги в дистальный участок зачатка крыла, то из этой ткани развивается палец крыла. По-видимому, после трансплантации клетки бедра «прочитывают» информацию о том, что они находятся на дистальном участке и развиваются в палец, но палец ноги, а не палец крыла. Следовательно, клетки помнили, что они происходили из зачатка ноги.

6.1. Гены позвоночных, эквивалентные генам дрозофилы

Известно, что продукт гена дрозофилы dorsal сходен с транскрипционным фактором экстренного реагирования NFB у млекопитающих.

Продукт гена дрозофилы fork-head подобен транскрипционному фактору, специфичному для печени млекопитающих.

Введение эмбриону дрозофилы мышиного или человеческого гена, аналогичного гену Anthenopedia, приводит к тем же дефектам тела взрослой мухи, что и ее собственные мутации.

Обнаружено сходство гена дрозофилы nautilus, который экспрессируется в будущих мышечных клетках, с геном млекопитающих MyoD. Продукт этого гена превращает клетки в мышечные.

Ген дрозофилы wingless сходен с мышиным геном wnt1, контролирующим развитие нервной системы. У мышиных эмбрионов с генотипом wnt/wnt обнаруживается почти полное отсутствие головного мозга. Продукт гена wnt1 является не транскрипционным фактором, а секретируемым белком, влияющим на транскрипцию в нервных клетках.

Приведенные выше данные позволяют считать, что молекулярные механизмы генетического контроля этапов развития и механизмы формирования пространственной организации тела у насекомых и позвоночных схожи. Однако оценить масштабы сходства пока не представляется возможным.

Помимо чисто научного интереса, понимание того, каким образом гены управляют и управляются в развивающемся организме, может открыть новые способы борьбы с болезнями, возникающими при нарушении процессов развития. Возможно, скоро станет реальным целенаправленное создание лекарств, включающих и выключающих определенные гены. Тем самым свершился бы принципиально прогрессивный скачок в медицину будущего.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процесс развития любого живого организма предполагает становление пространственной организации тела за счет дифференцировки его клеток. Подобная задача решается на ранних этапах развития с помощью материнских генов, которые контролируют план строения эмбриона в двухмерной прямоугольной системе координат: передне-задней и спинно-брюшной осей тела. Далее гены сегментации формируют координированную структуру из мелких сегментов, различающихся характером генной экспрессии, затем гомеозисные гены создают различия между этими сегментами тела.

В процессе формообразования организма открывается поразительно сложная иерархическая система генов, определяющих индивидуальное развитие и план строения тела. В первые часы после оплодотворения такая система генов расчленяет зародыш в разных направлениях. Гены кодируют белки, образующие концентрационные градиенты, которые в свою очередь включают и выключают другие гены. Затем этот процесс повторяется в более узких масштабах. Тело взрослого организма формируется по типу «лоскутного одеяла», причем в каждом «лоскуте» экспрессируется определенный набор генов. Продукты генов служат молекулярными адресами, по которым клетка обеспечивается позиционной информацией и ее запоминанием (см. схему 1).

Несмотря на то, что большинство исследований выполнено на дрозофиле, морских ежах или амфибиях, полученные результаты применимы ко всем другим живым организмам, включая человека, так как их основные этапы эмбриогенеза имеют принципиальное сходство (стадии бластулы, гаструлы, образование экто-, энто- и мезодермы, формирование передне-задней и спинно-брюшной осей и подразделение тела на сегменты).

На сегодняшний день в общих чертах становятся понятными молекулярные механизмы дифференцировки клеток, но представить себе, как в процессе развития образуется орган и тело определенной формы и размера, еще достаточно проблематично. Установлено, что все природные объекты строго упорядочены и даже иерархически организованы, начиная от строения атомов или молекул органических полимеров и завершая усложнением строения на уровне клеток многоклеточных растительных и животных организмов, популяций, видов и т.д. Сложные системы живой

и неживой природы способны упорядочиваться, т.е. превращаться из хаоса в порядок, путем самоорганизации, например, молекулы воды образуют в точке замерзания снежинки; пчелиные соты удивительно схожи с призматическими ячейками Бенара; песчаные барханы в пустынях, концентрические круги на воде, вихри торнадо и т.п. По-видимому, самоорганизация открытых систем в природе происходит самопроизвольно при достижении ими критического неравновесного состояния, которое переводится на новый, более устойчивый, упорядоченный и равновесный уровень.

Знаменитый британский информатик и математик Алан Тьюринг создал математическую модель морфогенеза, то есть появления закладки и последующего развития органов и частей тела у эмбриона животных путем их самоорганизации, направляемой реакционно-диффузным механизмом действия морфогенов.

Для представления эффекта воздействия на клеточную дифференцировку градиентных концентраций хотя бы одного морфогена используется так называемая модель сине-бело-красного «французского флага»: например, высокие концентрации морфогена активируют «синий» ген, средние значения концентраций — «белый», а более низкие концентрации — «красный». Градиентные концентрации морфогена представляют собой простейший вариант создания позиционной информации, которая интерпретируется разными клетками организма индивидуально в зависимости от их положения в пространстве. В различных клетках включаются неодинаковые наборы генов, приводящие к трем разным клеточным фенотипам – «синему, белому и красному», формируя трехцветную структуру французского флага.

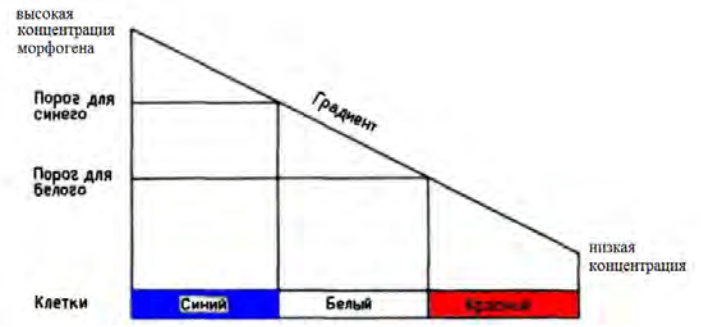


Рис. 32. Модель французского флага.(Гилберт,1995)

Согласно реакционно-диффузному механизму Тьюринга предполагается, что самоорганизация в морфогенезе возможна при наличии минимально двух взаимодействующих морфогенов А-активатора и I-ингибитора, имеющих разные исходные концентрации и разные скорости диффузии. Сила взаимных влияний морфогенов А и I спонтанно порождает в клетке разнообразные «рисунки» изменения их концентраций в пространстве, которые назвали паттернами самоорганизации. Подобные паттерны могут быть как подвижными, похожими на бегущие волны прибоя, так и неподвижными, что приводит к формированию сложных биологических узоров из полос и пятен, часто встречающихся в живой природе, например, полосы у зебры или тигра, пятна на шкуре леопарда или на раковине моллюсков.

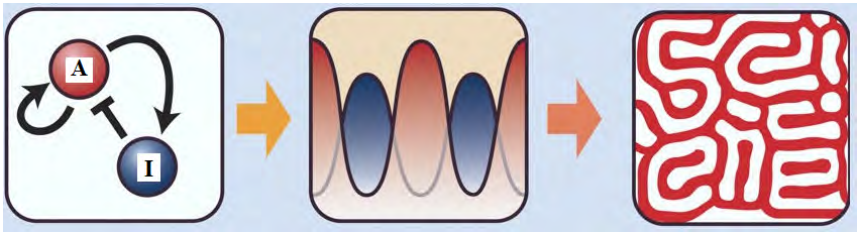


Рис. 33. Взаимодействие двух морфогенов А и I и формированием разнообразных рисунков. Морфоген А усиливает собственный синтез и образование второго морфогена I-ингибитора, который подавляет образование активатора-А.

Развитие пальцев на конечности у млекопитающих может быть объяснено реакционно-диффузным механизмом, как минимум, двух и более взаимодействующих гипотетических морфогенов -А и -I, сила действия которых контролируется разными дозами генов-регуляторов раннего развития — Gli3 и Hoxd11-13. Эти гены относятся к группе гомеозисных и кодируют структуру транскрипционных факторов. Продукт гена Gli3 — белок с мотивом цинковых пальцев экспрессируется вдоль передне-задней оси почки конечности, позднее он обнаруживается только в ее передней части, образуя градиент в направлении от области мизинца к большому пальцу. При этом морфоген А в зачатке конечности формирует сложный узор из полос, ориентированных случайным образом (рис. 34).

Ключевыми регуляторами морфогенеза являются Hox-гены, обеспечивающие правильное образование тканей, органов и частей тела за счет спецификации сегментов тела вдоль передне-задней оси. Гены Hox-11-13 регулируют взаимодействие морфогенов А и I в зачатках кистей и стоп,

что порождает на периферии зачатка конечности паттерн в виде 5 полос, соответствующих будущим пальцам вместо сложного узора. На рисунке 34 представлено компьютерное моделирование формирования пальцев, которое соответствует реакционно-диффузному механизму Тьюринга.

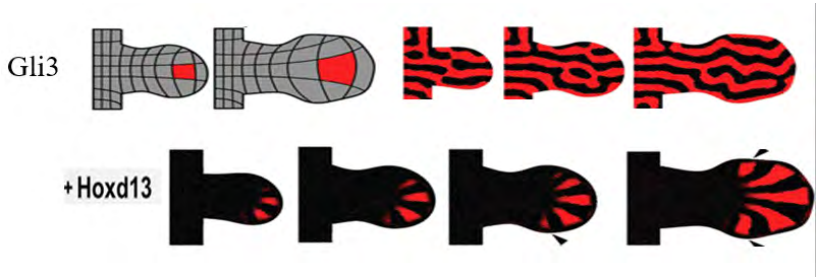


Рис. 34. Компьютерное моделирование формирования пальцев на основе взаимодействия морфогенов А и I, регулируемых генами Gli3 и Hoxd11-13. Возникновение паттернов самоорганизации в зачатке конечности в виде полос, соответствующих будущим пальцам

Длина и ширина полос будет определять длину и толщину пальцев, а значит, и их количество, так как зачаток лапки имеет определенный конечный размер, при этом следует учитывать необходимость образования межпальцевых промежутков.

Поскольку морфогены А и I не идентифицированы, то для изучения их влияния на формирование конечности были использованы генно-инженерные методики, направленные на последовательное выключение регуляторных генов Hox и Gli3, управляющих морфогенами А и I. Потеря функции гена Gli3 приводит к укорочению пальцев или к нарушению их идентичности, что может сопровождаться развитием дополнительного мизинца на месте большого пальца. Постепенное отключение *Hox*-генов или уменьшение их «дозы» приводит к постепенному усилению полидактилии. Отключение половинной дозы *Hox*-генов (*Hoxa13+/–)* совместно с полным выключением гена (*Gli3–/–)* увеличивает число пальцев до 8–9, а полное отключение генов (*Hox–/–)* и (*Gli3–/–)* увеличивает число пальцев до 13. Таким образом, при уменьшении дозы регуляторных генов размер пальцев стремился к нулю, а их число — к бесконечности, что на самом деле означает отсутствие пальцев или соединение их кончиков с образованием хрящевой дуги, похожей на плавники рыб (рис. 35).

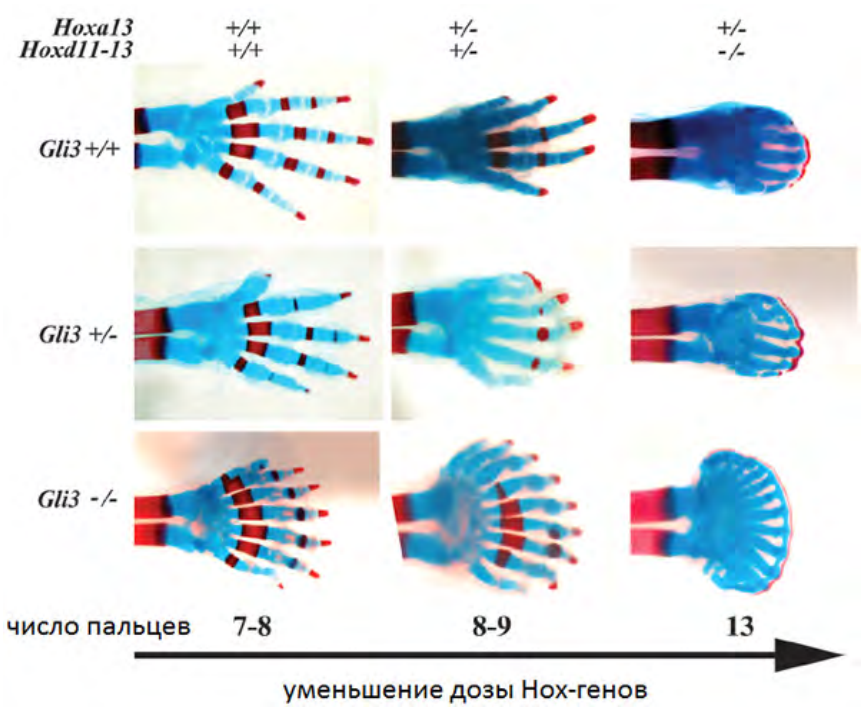


Рис.35. Генно-инженерные эксперименты по отключению генов-регуляторов Gli3 и Hoxd11-13 и изменение длины и количества пальцев на конечности

Вывод. Ход морфогенетических процессов, приводящих к формообразованию и возникновению дискретных фенотипов, ранее объясняемый исключительно генетической детерминацией, по-видимому, управляется градиентно-диффузной системой морфогенов, работающих как пространственные переключатели программ развития.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов В.С. Цитогенетика эмбрионального развития человека / В.С. Баранов, Т.В. Кузнецова. — СПб.: изд. Н-Л, 2007. — 638 с.
2. Баттулин Н.Р. Генетика развития // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2014. — Т. 8, №1. — С. 103-111.
3. Кэрролл Ш. Бесконечное число самых прекрасных форм / Ш. Кэрролл. — М.: Corpus, 2015. — 432 с.
4. Генетика в клинической практике : руководство для врачей / В.Н. Горбунова [и др.] ; под ред. В.Н. Горбуновой, М.А. Корженевской. — СПб: СпецЛит, 2015. — 334 с.
5. Генетика человека по Фогелю и Мотульски. Проблемы и подходы / Ред. М.Р. Спейчер и др. — 4-е изд. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2013. — 1056 с.
6. Гилберт С. Биология развития / пер. с англ. под ред. А. П. Перевозчикова. — 7-е изд. — М., 2014. — 838 с.
7. Марков А. Рождение сложности. Эволюционная биология сегодня. Неожиданные открытия и новые вопросы / А. Марков. — М.: Астрель, Corpus, 2010. — 528 с.
8. Медицинская биология и патология клетки : в 4-х ч. / М.А. Корженевская [и др.]. — СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2013. – 161 с.
9. Молекулярная биология клетки : в 3-х т. / Б. Альбертс, А. Джонсон, Д.Льюис [и др.]. — М.-Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика» Институт компьютерных исследований, 2013. — 808 с.
10. Дейвис Джейми Онтогенез. От клетки до человека / Джейми Дейвис. — СПб.: Питер, 2017. — 352 с.
11. Molecular Biology of the Cell / B. Alberts [et al.]. —5th ed. — Garland Sceince, 2008. — 1267 p.
12. Hox Genes Regulate Digit Patterning by Controlling the Wavelength of a Turing-Type Mechanism / Sheth R. [et al.] // Science. — 2012. — Vol. 338. — P. 1476–1480.
13. Alan Mathison Turing. The Chemical Basis of Morphogenesis (PDF, 1,14 Мб) // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. Vol. 237. N 641 (Aug. 14, 1952). Pp. 37–72.

При подготовке рисунков использовали интернет-ресурсы свободного доступа:

www.cellbiology.ru
ww.med.gen.by
www.nature.com
medicaplanet.su
www.ebio.ru
www.elementy.ru
www. oko-planet.su\ science

ДЛЯ ЗАМЕТОК