

**Мастер-класс
для Пантопеды**



Мастер-класс для Пантоподы

ISBN 5-87-317-340-0

Издательство КМК
Москва
2006

*Посвящается
Галине Анатольевне Соколовой*

Предисловие от авторов

Я помню древнюю молитву мастеров:
Храни нас, Господи, от тех учеников,
Которые хотят, чтоб наш убогий гений
Кошунственно искал все новых откровений.

Николай Гумилев

Сначала немного теории. Вопрос о том, на чей счет отнести успехи Ученика — на счет ли Учителя, или Генетики, или Родителей, или Стечения Обстоятельств, или (всяко бывает!) Собственных Мозгов, — вполне философский, а проще говоря — неразрешимый. Мы предлагаем усложнить его, включив в простую цепочку взаимоотношений Учитель — Ученик дополнительное звено, так сказать «Ученика первого порядка». Теперь в нашей системе над Учеником нависают и Учитель, и Ученик этого Учителя, который для нашего Ученика тоже оказывается Учителем. Уже при первом взгляде на все это напоминающее башню сооружение становится вполне очевидным, что мы не собираемся отвечать на исходный вопрос, а, напротив, стараемся показать всю бесперспективность простых рассуждений на этот счет. Если же мы введем в систему еще один показатель, а именно — серийность появления все новых слоев Учеников, всяческих Учеников ($n+1$), которые все надстраивают и надстраивают нашу башню снизу, то быстро перейдем от философских вопросов к вопросам сугубо практическим. Например — каково приходится Ученику 20-го, или 22-го, или 25-го порядка в нижнем венце башни среди прочих недообтесанных пока камней? Не пойдет ли кругом его слабая (пока) голова, не падет ли он жертвой энтропии, не гнутся ли еще казаки, держат ли вес (= давление?) верхних этажей? Но — чудо, не сякнет струя — вроде пока не жалуются...

Да, так о чем это мы? Заболталась, старая... А, вот! У вас в руках — нечто вроде сборника лекций, написанного учениками Г.А. для ее учеников, а значит — и для нее. Даже хорошо, что не все выпускники биоклассов 57-й и 520-й школ тут же бросаются учить следующие поколения, а то бы те, пожалуй, не потянули. Первому выпуску вполне хватило одной Г.А. К пятому выпуску приложили руку, а иногда и ногу, уже не менее десятка ее учеников. Дальше — больше. Для нынешних старшеклассников, абитуриентов и студентов первых курсов старшие товарищи уже, кажется, слились в некий гипервыпуск, в котором как будто сидели за одной партой Григ и Жура, Егор Виноградов и Алена Литвинова, Калякин и Наташа Решетникова. Прозрев своим умом сию сложную ситуацию, мы решили сделать нашему общему учителю наш общий подарок. При этом главной путеводной звездой нам служила идея о том, что подарок этот должен быть слабо-материальным. Во-первых, у Г.А. все есть и ей ничего не нужно. Во-вторых все, что нужно, уже подарили родители, причем в двух экземплярах. (Это легко объяснить тем фактом, что их почти в два раза больше, чем учеников, т.е. это уже четырехзначная цифра, а заработки у них в среднем выше, чем у их детенышей.) Да и легко представить себе, что будет, если у Г.А. случится какой-нибудь юбилей, — ведь даже после рядового ДР она каждый раз подумывает о сооружении пристройки к своей обширной квартире. Поэтому мы считаем свой выбор вполне обоснованным. Он состоит в том, что Г.А. будет наиболее рада такому подарку, который она тут же сможет применить к ученикам. Точнее — к наиболее свежееиспеченным, находящимся в нежном школьном возрасте, т.е. непосредственно под рукой, ученикам. Мы надеемся, в этой руке время от времени будет оказываться данная книжка, из которой Г.А. сможет зачитывать школьникам избранные лекции ее учеников 1-го, 2-го и последующих порядков. Мы не только надеемся, но и уверены в том, что Г.А. при этом сможет по ходу дела заметно приукрасить, подчеркнуть, выпятить, преподнести в неожиданном свете и с неожиданной стороны то, что мы пытаемся здесь изложить, дабы молодежь лучше впитала выстраданный нами за годы научной деятельности опыт.

Нас, дорогие читатели, объединяет гораздо больше вещей, чем вам кажется. Они настолько нам очевидны, что мы о них и не вспоминаем. Например — все мы, поголовно, по крайней мере один раз в

жизни уже отвечали на вопрос о том, что нам интересно в биологии. Авторы данного издания, находясь ныне в более твердом уме, но куда при хорошей памяти, попытаются ответить на него еще раз. И ответы эти стоят уже значительно дороже (книга при этом распространяется бесплатно). В них спрессовался, окуклился, метаморфизировался, перешел в новое качество многолетний опыт научной работы. Да, увы, — уже многолетний. Как и в любом другом опыте, в нем много шлаков, неоправданных ожиданий, ошибочных ходов, разочарований в себе, в методике или в условиях работы — а иногда и в ее целях. Тут и разбитые пробирки, и утопленное оборудование, и порванные байдарки, и сломанные центрифуги, ноги и саперные лопатки. Поиски литературы, попытки читать по-немецки (французки, японски, персидски), перерегистрация читательских билетов, споры с коллегами, неинтересные конференции, закупки реактивов, переделки опытов, комары, качка, вечная мерзлота и плесень влажных тропических лесов. Килограммы бумаг с заявками на гранты и открытки формата А6 с информацией о том, что Вам в этот раз не светит. Поиски спонсоров, походы к деканам и директорам, альянсы с иностранцами, получение медицинских справок и очереди за визами. Ручная шлифовка стекол, сплесневание тросов, ремонт грузовика при помощи доски и веревки, вялые многочасовые размышления и внезапные идеи в полпятого утра. И среди всего этого постепенно накопились и положительные результаты, которые мы и попытаемся вам преподнести, очистив их от перечисленных и не перечисленных наслоений.

Ниже мы, по мере наших скромных сил, постарались ответить на вопрос «А что мне показалось самым интересным в тех частях биологии, которыми я, с Божьей или Боссьей помощью, как занялся, так и занимаюсь?» Да, это письменное изложение тех лекций, которые либо уже в той или иной форме были прочитаны кому-то из учеников Г.А., или еще будут прочитаны им в будущем, или, может быть, излагаются здесь в первый и последний раз. Нам было легко и приятно это писать: над нами не довлел редактор, который обязательно что-то «улучшает» в вашем тексте, если вы пишете научную статью. Нам не пришлось рыться в литературных источниках, мы не следили за объемом, нас манила перспектива быстрого внедрения наших опусов в практику преподавания биологии. Кроме того, нам было и остается страшно и сложно: хотелось выжать из себя максимум четкости и образности описаний, логичности суждений и лаконичности формулировок, «что б кто-нибудь меня понял, не часто, ну хоть разок...».

Можно сказать об этом и по-другому. Г.А. не вырастила ни одного орнитолога, ботаника, молекулярщика или антрополога. А вырастила она, во многом личным примером, народ, который вслед за ней не просто хочет, а страстно желает, чтобы ему было интересно — в том числе и в работе, которая занимает-таки наше основное, а часто и побочное время. Вот это «интересное» — настолько интересное, что мы уже потратили на это годы, ресурсы центрального процессора и трудно подсчитываемый объем здоровья и адреналина, — и хочется передать нашим младшим.

Авторы

Предисловие от редакции

Эх, авторы, авторы!
Пишете вы безо всякого удержу!
Хотя извержение — хорошая штука! Кассовая!
Публика любит такие вещи.
Михаил Булгаков, «Багровый остров»

Издание, которое вы держите в руках, имеет странное название «Мастер-класс для Пантоподы». Что такое мастер-класс — понятно всякому грамотному, но вот что такое эта Пантопода? Кто, зачем и на какую тему собирается давать ей мастер-класс — вероятно, требует объяснений.

Всякому, кто имеет отношение к биоклассу 520-й (а ранее 57-й) московской школы должно быть известно, что это:

- 1) латинское имя морских членистоногих, которых попросту зовут морскими пауками;
- 2) прозвище одного мальчишки, который, будучи в очень юном возрасте и ничего не понимая в биологии, назвал себя так, потому что это показалось ему красиво. Постепенно это имя стало собирательным, и теперь часто в разговорах выпускников означает любого из нынешних учеников биокласса;
- 3) название школьного научного журнала, который с 1989 года издавали ученики биокласса. В нем печатались научные работы школьников не только 520-й, но и других школ и биологических кружков Москвы, Севастополя, Санкт-Петербурга и других городов.

За годы своего существования журнал «Пантопода» позволил не одному поколению будущих биологов попробовать себя в качестве авторов научных публикаций. На нем ребята учились и тому, как вообще делаются журналы, — собираются, редактируются, издаются. Но, кроме того, «Пантопода» собрала вокруг себя народ, которому не казалась безнадежной мысль о том, что биологическую науку можно развивать в нашей стране, в том числе — руками школьников. Возник даже клуб «Пантопода», в который входили не только ученики школы, но и студенты, и учителя, и ученые, которые помогали ребятам ставить и разрешать научные задачи. В жизнь «Пантоподы» оказались вовлечены и те, кто был школьником давно и не печатал своих статей в журнале, потому что его тогда еще не было.

Потом времена переменялись, и издание журнала постепенно стало затухать. В век Интернета выпускать журнал маленьким тиражом, практически кустарным способом, стало неинтересно. Уже несколько лет новые номера журнала не появлялись, хотя школьники биокласса продолжали делать научные работы, и им было о чем рассказать.

Но недавно выяснилось, что «Пантопода» не умерла. Как это часто бывает в природе, она, видимо, «окуклилась», чтобы потом возродиться в новом виде. Стало активно происходить формирование интернет-версии журнала. Можно надеяться, что скоро статьи сегодняшних школьников будут в ней опубликованы. А одновременно с подготовкой Интернет-версии в недрах той же «куколки» образовался еще один проект.

Один из выпускников биокласса, Илья Кукулин (ныне с биологией не связанный), вспомнил, что в 1987—1988 годах на биофаке МГУ существовал семинар, которым руководила Лена Говорунова. И на этом семинаре выпускники биокласса, работавшие в разных областях биологии, рассказывали друзьям-неспециалистам про самое новое и ценное в своей области. Этот семинар был очень интересен всем его участникам. Аналогичная идея была положена Галиной Анатольевной Соколовой в основу курса «Мастер-класс», в котором биологи-специалисты в доступной форме рассказывают биологам-старшеклассникам о достижениях в своей науке. Получается, что мастер-класс для юных «пантопод» существует уже давно.

Заниматься чтением лекций в школе могут далеко не все. Кто-то так загружен работой, что не в состоянии выкроить ни секунды, кто-то не может оторваться от семейных дел, а многие вообще живут и работают вдали от Москвы. К тому же просто невозможно обрушить на головы нынешних крошек все те знания, которые накоплены коллективным разумом бывших учеников.

Поэтому Илья предложил создать сборник, в котором приняли бы участие те выпускники биокласса, которые чувствуют в себе силы и желание что-то сказать молодому поколению. Эту идею он

изложил Ире Кобузовой, Лене Кудрявцевой и Жене Петраш. Было решено «бросить клич», распространив информацию среди выпускников, и посмотреть, что из этого получится. Дальше дело пошло далеко не так быстро, как хотелось бы. К счастью, к процессу подключились другие участники: Миша Калякин, Лена Говорунова, Сережа Лукьянов, Катя и Оля Богдановы, Митя Петраш... Всех здесь назвать невозможно, смотрите страницу 214.

Постепенно информационные волны разошлись по миру. Наверняка они достигли не всех, кто мог бы откликнуться. Но все-таки 27 человек, несмотря на сжатые сроки и непосильное требование писать так, чтобы поняли школьники, прислали свои статьи. Из них и получился сборник, который мы представляем вашему вниманию.

А из тех, кто статьи не прислал, еще очень многие содействовали его появлению на свет самыми разными способами: советами, опытом, технической помощью и, наконец, деньгами. Всем им огромное спасибо — без их участия, и особенно — без материальной поддержки, издание сборника было бы невозможно.

Что он собой представляет, теперь смогут увидеть читатели. Так же, как и в журнале «Пантопода», у нас не было цензуры. Мы опубликовали все статьи, которые пришли в срок, и даже задержавшиеся старались напечатать, если была хоть какая-то техническая возможность это сделать. Более того, мы старались максимально сохранить авторский стиль, внося только самые необходимые изменения.

Подборка получилась очень пестрая по всем параметрам.

Она охватывает самые разные области биологии — от классической зоологии и ботаники до молекулярной биологии и биофизики, поведения животных и антропологии, — во всех этих областях работают выпускники биокласса, в России и других странах.

В ней представлены все мыслимые стили: от классического научно-затрудного (в хорошем смысле этого слова) до легкомысленного и патетического. Есть статьи лаконичные, есть — пространные; в некоторых очень точно подобраны научные термины, другие — красочны и образны.

Одним словом, конечный результат в определенной мере отражает разнообразие, наблюдающееся среди выпускников биологических классов 57-й, а затем 520-й школы. Хочется верить, что среди этого разнообразия читатели найдут что-то интересное и даже (чем черт не шутит) поучительное для себя. Может быть, кому-то захочется что-то спросить у авторов или вступить с ними в дискуссию. Для этого мы публикуем их электронные адреса.

Но есть Читатель, чьего мнения мы все, авторы и издатели, ждем с особым волнением и трепетом. Мы преподносим это издание Галине Анатольевне в качестве Деньрожденного Подарка и надеемся, что этот подарок будет приятным и полезным.

Приятным потому, что он ясно показывает, что посеянные за годы существования биокласса семена все-таки взошли и сообщество его выпускников существует. В это сообщество входят люди, которые по-настоящему делают современную биологию, находят это занятие увлекательным и готовы доказать это собственным примером. И среди тех, кто не стал ученым или занимается другими областями науки, много людей, понимающих биологию, осознающих ее ценность и готовых помогать обучению новых поколений биологов.

А полезным потому, что все статьи в этом сборнике в первую очередь адресованы школьникам. Тем, кто сегодня ищет свой подход к науке, пытается нащупать в ней собственный интерес и выбирает направление. А значит, наше издание может в какой-то мере помочь Галине Анатольевне в том, что она любит делать больше всего, — учить детей.

Итак — с любовью от авторов, издателей, спонсоров и всех-всех-всех.

Участники проекта

Фоторецепторные родопсины и регуляция движения жгутиковых водорослей

Е. Говорунова



Елена Говорунова,
5-й выпуск биокласса,
школа № 57 (1980 г.),
закончила кафедру физиологии растений Биофака МГУ (1985 г.), к.б.н., старший научный сотрудник кафедры физико-химической биологии Биофака МГУ, egovoru@yahoo.com

Способность реагировать на внешние стимулы — такое же фундаментальное свойство живой материи, как и способность к питанию или размножению. Но и питание, и размножение были бы невозможны, если бы живые организмы были неспособны к рецепции внешних стимулов: ведь прежде чем проглотить пищу, ее надо сначала разыскать, а делать это, ориентируясь на специфические свойства пищи (например, ее вид или запах) гораздо эффективнее, чем просто бродить в надежде, что рано или поздно наткнешься на что-нибудь съедобное!

Самым важным стимулом для живых организмов служит свет, и это понятно, поскольку для фототрофов он является источником энергии, и, кроме того, для всех организмов, независимо от типа их метаболизма, слишком много света представляет собой опасность для жизни. Наша исследовательская группа на кафедре физико-химической биологии Биологического

факультета МГУ занимается изучением двигательных реакций на свет и другие стимулы внешней среды у жгутиковых водорослей. С главным объектом наших изысканий все хорошо знакомы по учебнику ботаники 5 класса — это хламидомонада (рисунок 1).

Одноклеточные зеленые жгутиконосцы, к которым относится хламидомонада, перемещаются в среде при помощи двух жгутиков (по-английски — *flagella*), расположенных на переднем конце клетки. Это движение регулируется светом, причем клетки реагируют не просто на интенсивность света, а на направление световых лучей. Перемещение клеток параллельно световым лучам называют фототаксисом. Как же клетка хламидомонады определяет направление света? Медленно движущиеся клетки, такие как цианобактерия *Synechococcus*, поступают очень просто: они сравнивают освещенность двух противоположных концов клетки, в один и тот же момент времени и поворачиваются в сторону того из них, на который попадает больше квантов. Однако жгутиконосцы движутся слишком быстро, и такая стратегия для них не работает. У хламидомонады есть только один фоторецептор, расположенный на боковой поверхности клетки, а непосредственно рядом с ним располагается хорошо видимое в световой микроскоп скопление каротиноидных пигментов. Уже первые микроскописты, чуть ли не сам Левенгук, обратили внимание на это образование и поняли, что оно имеет отношение к фоторецепции, почему и назвали его глазком или стигмой (по-английски — *eyespot*). Глазок, однако, не содержит фоторецепторных молекул, а его роль заключается в модуляции освещенности фоторецептора во время движения клетки. Дело в том, что клетки хламидомонады плавают не по прямой, а вращаясь вокруг своей продольной оси. Если при этом ось вращения не совпадает с направлением распространения света, то на единственный фоторецептор хламидомонады попадает то много света — когда клетка повернута к его источнику своей несущей фоторецептор стороной (как клетка, помеченная цифрой 2 на рисунке 2), то мало — в противоположной фазе цикла вращения, когда фоторецептор затенен от света

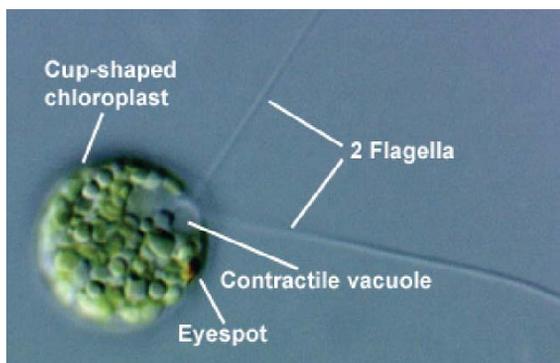


Рисунок 1. Клетка хламидомонады *Chlamydomonas reinhardtii* под световым микроскопом.

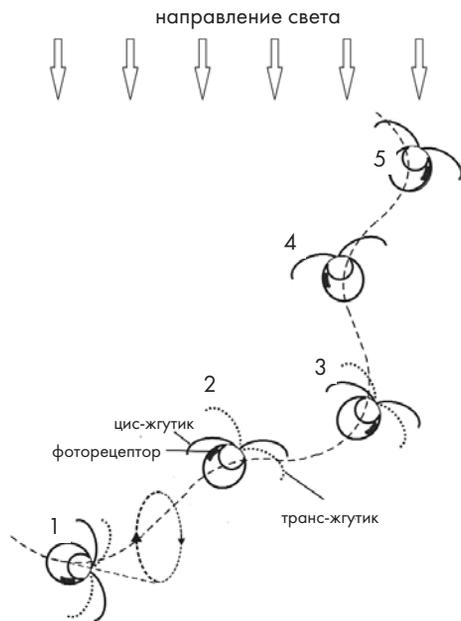


Рисунок 2. Схема ориентации жгутиковых водорослей в соответствии с направлением световых лучей.

глазком (как у клетки, помеченной цифрой 1 на том же рисунке). Вот это периодическое изменение освещенности фоторецептора в цикле вращения клетки и воспринимает как сигнал для изменения направления своего движения. Получив такой сигнал, два жгутика клетки начинают биться по-разному, заставляя ее поворачивать в сторону к источнику света (если интенсивность светового стимула низкая) или от него (если интенсивность высокая). Это продолжается до тех пор, пока ось вращения клетки (совпадающая с направлением ее поступательного движения) не совпадет с направлением световых лучей (как у клеток 3, 4 и 5 на рисунке 2). В такой ситуации освещенность фоторецептора в цикле вращения уже не меняется, и клетка продолжает двигаться в направлении света, пока опять не отклонится от него в силу случайных причин или под действием какого-то другого стимула.

Вывод о том, что глазок, несмотря на свое название, все же не является собственно фоторецептором, окончательно подтвердился, когда были получены и исследованы мутанты хламидомонады, не имеющие глазка. У таких мутантов есть фототаксис, но точность фотоориентации у них гораздо слабее, чем у дикого типа, что и понятно, так как вместо компактного глазка у них в роли затеняющего образования выступает громоздкий хлоропласт. К фототаксису оказались способны и бесхлорофильные мутанты, которые не образуют и полноценного хлоропласта. Правда, эти мутанты, вместо того, чтобы

плыть к источнику света при низкой интенсивности стимула, плывут, наоборот, от него. Их способность определять направление световых лучей основана на фокусирующем («линзовом») эффекте прозрачного тела клетки, так что максимальная освещенность фоторецептора достигается как раз в той фазе цикла вращения, когда он находится на стороне клетки, повернутой от источника света, а не к нему, как у дикого типа. Корректирующие движения жгутиков у этих мутантов приходится поэтому на противоположную по сравнению с диким типом фазу цикла вращения, что и определяет обратный знак их фототаксиса.

Итак, наличие фототаксиса и у мутантов без глазка, и у мутантов без хлоропласта окончательно доказывает, что фоторецепторный пигмент расположен не в этих окрашенных органеллах — иными словами, что его в клетке так мало, что не видно в микроскоп. Как же тогда узнать, что это за вещество? Первоначальные сведения о предполагаемой химической природе фоторецепторного пигмента удалось получить, измерив спектр действия фототаксиса, т.е. зависимость его величины от длины волны светового стимула. Спектр действия фототаксиса хламидомонады и некоторых других жгутиконосцев оказался близок спектру поглощения зрительного пигмента палочек сетчатки животных и человека — родопсина. Родопсин — это комплекс белка (опсина) с ковалентно связанным хромофором — ретиналем. Предположение о наличии фоторецептора родопсиновой природы у одноклеточных водорослей было очень интригующей гипотезой, принимая во внимание филогенетическую удаленность их от животных. Однако для окончательных выводов о химической природе рецептора анализа спектров действия было все же недостаточно, поскольку спектры поглощения многих классов пигментов перекрываются, а в спектр действия фототаксиса вносят вклад другие процессы, кроме поглощения самого фоторецепторного пигмента (в частности, поглощение затеняющего образования).

Первое надежное свидетельство в пользу родопсиновой природы рецепторного пигмента, опосредующего фототаксис, было получено в опытах на мутантах хламидомонады, не способных синтезировать каротиноиды. Сами по себе эти мутанты «слепые», не способные к фототаксису, но они становятся «зрячими», если в среду добавить синтетический ретинол. Восстановление способности к фототаксису у слепых хламидомонад под действием ретинола можно было объяснить только тем, что их фоторецепторный белок представляет собой комплекс ретинола с



Рисунок 3. Массовый рост галоархей в соленых озерах: фиолетовый цвет обусловлен бактериородопсином.

белком. Более детальные эксперименты (а именно сравнение эффективности разных изомеров и аналогов ретиналя) показали, что фоторецептор хламидомонады больше похож даже не на зрительный родопсин животных, а на ретиналь-содержащие белки, обнаруженные у галофильных археобактерий, живущих в очень соленой воде пустынных озер (рисунок 3). Археобактерии — это прокариоты, по своему внешнему виду и строению клетки похожие на обычные бактерии, но по своим генетическим характеристикам, отражающим их эволюционное происхождение, они оказываются ближе к эукариотам, чем к настоящим бактериям. Чтобы подчеркнуть это отличие от бактерий, их часто называют просто «археями».

В начале 1970-х гг. в клеточной мембране одной из архей, *Halobacterium salinarum*, был обнаружен ретинальсвязывающий белок. Это было совершенно сенсационное открытие, потому что до этого такие белки были известны исключительно в фоторецепторных клетках сетчатки животных. Новый белок назвали «бактериородопсином», поскольку в то время принципиальное различие между настоящими бактериями и археями было еще не установлено. При этом оказалось, что хромофор бактериородопсина — изомер ретиналя, у которого все углерод-углеродные двойные связи находятся в *транс*-конфигурации, в то время как зрительный родопсин животных содержит ретиналь, у которого двойная связь между 11-м и 12-м атомами углерода находится в *цис*-положении (рисунок 4). Более того, когда были выяснены первичные последовательности аминокислот этих двух белков, между ними не было обнаружено ровно никакой гомологии, хотя по вторичной структуре они оказались очень похожи: оба они образуют 7 трансмембранных альфа-спиралей, в середине последней из которых расположен остаток лизина, ковалентно связывающий ретиналь.

Выяснилось также, что бактериородопсин — вовсе не фоторецептор, как родопсин зрительный, а светоактивируемая протонная помпа, т.е. он перекачивает протоны через мембрану (изну-

три наружу), используя для этого энергию света. Создаваемый таким образом электрохимический градиент протонов клетка использует для синтеза АТФ или других процессов, требующих затраты энергии. Считается, что такой способ утилизации солнечной энергии одной-единственной молекулой возник в ходе эволюции задолго до появления куда более сложно организованного фотосинтеза на основе хлорофилла. Далее, оказалось, что у того же вида архей кроме бактериородопсина есть еще три других ретинальсвязывающих белка. Один из них под действием света перекачивает через мембрану не протоны, а ионы хлора — в противоположном протонам направлении, запасая дополнительную энергию. А два остальных работают-таки как фоторецепторы, позволяя клеткам *H. salinarum* скапливаться в местах, освещенных оранжевым светом (бактериородопсин лучше всего поглощает именно этот свет), и избегать опасного коротковолнового света.

В течение 30 лет после открытия бактериородопсина считалось, что галофильные археобактерии — единственные организмы, помимо животных, у которых есть ретинальсодержащие белки. Результаты же опытов по восстановлению фототаксиса слепых мутантов хламидомонады после добавления ретиналя показали, что у этих эукариотических водорослей тоже есть ретиналь-содержащие белки, причем именно белки, больше похожие на родопсины галоархей, т.е. прокариотических микроорганизмов, чем на зрительные родопсины. Конечно, ученым сразу же захотелось как можно быстрее получить эти белки в чистом виде, чтобы исследовать их свойства. Но вот это оказалось исключительно трудным делом из-за чрезвычайно низкой концентрации фоторецепторных белков в клетках. Решение этой проблемы было найдено только

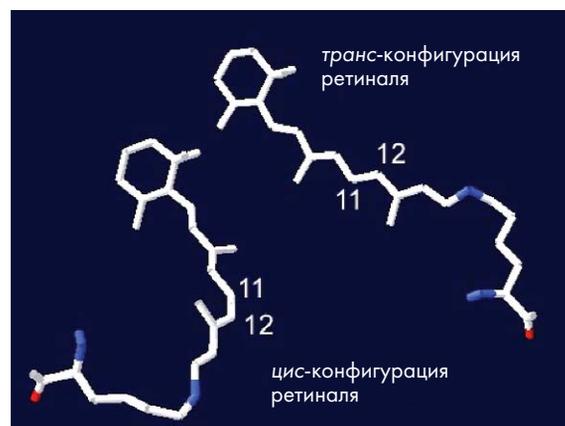


Рисунок 4. Молекулярные модели полностью *транс*- и *11-цис* изомеров ретиналя, ковалентно связанных с остатками лизина в (не показанных) полипептидных цепях опсинов.

тогда, когда была установлена полная нуклеотидная последовательность генома хламидомонады. Оказалось, что в нем содержится целых два гена, кодирующих белки, первичные последовательности которых близки к родопсинам галофильных архей. Между собой эти два гена оказались еще более похожи, так что можно было предполагать, что они возникли в результате дубликации одного предшественника. Некоторые детали последовательностей этих генов свидетельствовали о том, что они кодируют белки-фоторецепторы, а не ионные помпы, поэтому этим белкам присвоили имена «сенсорные родопсины хламидомонады А и В».

Но, конечно, точно предсказать функцию белка в клетке на основании одного только знания его первичной последовательности нельзя, требуются дополнительные исследования. Самый надежный способ — разрушить ген того белка, функцию которого надо выяснить, и посмотреть, как изменился фенотип у такого организма. В случае хламидомонады, однако, это сделать было не так-то просто, т.к. особенности ее генома не позволяют направленно разрушать заранее заданные гены. На помощь исследователям пришел метод так называемой РНК-интерференции (РНКи). Сущность этого метода состоит в том, что клетку трансформируют специальной генетической конструкцией, содержащей один и тот же начальный участок данного гена в прямой и обратной ориентации. РНК, транскрибируемая с такой конструкции, замыкается сама на себя и образует двухцепочечную шпильку. В клетке же существует специальная ферментная система, разрушающая не только сами такие шпильки, но и нативную РНК, считываемую с клеточной копии того гена, на основе которого была приготовлена РНКи-конструкция. Таким образом, сам клеточный ген остается активным, но синтез кодируемого им белка существенно подавляется из-за разрушения соответствующих РНК-матриц.

При помощи метода РНКи удалось получить трансформантов хламидомонады с существенно пониженным содержанием либо родопсина А, либо родопсина В — иными словами, обогащенных в первом случае родопсином В, а во втором — родопсином А. При сравнении этих трансформантов с диким типом оказалось, что оба они остались способны к фототаксису, однако количественные характеристики их фототаксиса изменились весьма примечательным образом. Выяснилось, что спектр действия фототаксиса у трансформанта, обогащенного родопсином А, сдвинут в длинноволновую область по сравнению со спектром дикого типа, а спектр действия фототаксиса у трансформанта, обогащенного

родопсином В, — в коротковолновую! Эти сдвиги спектров действия, во-первых, доказывают, что оба родопсина действительно служат в клетке рецепторами фототаксиса, а, во-вторых, свидетельствуют о том, что спектры поглощения этих пигментов различаются приблизительно на 40 нм.

Но наиболее интересные вещи обнаружались при анализе фотоэлектрических ответов этих трансформантов. Дело в том, что еще задолго до обнаружения у хламидомонады генов ретинальсодержащих белков, Олегом Алексеевичем Синещековым, руководителем нашей группы, было установлено, что фотовозбуждение этих рецепторов приводит к генерации трансмембранных электрических токов в клетках зеленых жгутиковых водорослей. Это была исключительно тонкая работа: клетки эти настолько малы, что разрушаются при введении обычных микроэлектродов. Чтобы обойти эту трудность, О.А. Синещеков изобрел специальный метод электрода-присоски, позволяющий измерять электрические сигналы экстраклеточно (рисунок 5). Засасывая в микроприсоску разные участки клеточной мембраны, он выяснил, что освещение вызывает протекание тока через участок мембраны, непосредственно примыкающий к глазку, — тот самый, где предположительно располагаются фоторецепторные молекулы. Спектр действия этого тока, названного «фоторецепторным», и другие его свойства (в частности, отсутствие этого тока у «слепых» мутантов) не оставляли сомнений, что именно он представляет собой самое первое звено в цепи трансдукции сигнала при фототаксисе. Используя очень короткие лазерные импульсы и систему регистрации с высоким временным разрешением, О.А. Синещеков показал, что фоторецепторный ток на самом деле состоит из по крайней мере двух кинетических компонентов —

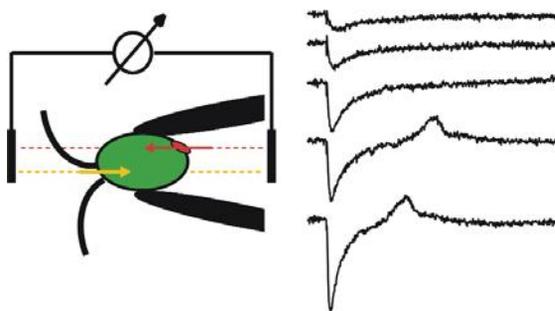


Рисунок 5. Схема метода измерения фотоиндуцированных трансмембранных токов в клетках жгутиковых водорослей методом электрода-присоски (слева) и серия таких токов, регистрируемых в ответ на возбуждение вспышками света возрастающей интенсивности (справа; верхний ответ — на самую слабую вспышку).

быстрого и медленного. Анализ зависимости амплитуды тока от интенсивности светового стимула к тому же выявил, что в его генерации участвуют два процесса, различающиеся на несколько порядков по уровню светового насыщения. Таким образом, стало ясно, что фоторецепторная система зеленых жгутиковых водорослей гетерогенна, но определить, в чем причина этой гетерогенности, при исследованиях на диком типе не удавалось.

Когда же О.А. Синешекоев измерил фоторецепторный ток, генерируемый трансформантом хламидомонады, обогащенный родопсином А, то оказалось, что этот ток существенно быстрее, чем ток дикого типа (рисунок 6), и его амплитуда насыщается при более высокой интенсивности света. Ток же у трансформанта, обогащенного родопсином В, наоборот, замедлен по сравнению с диким типом (и уж тем более с током первого трансформанта!) и характеризуется более низким световым насыщением. И сразу стало ясно, что два компонента тока, выявленные еще при исследованиях на диком типе, просто-напросто генерируются двумя различными рецепторными пигментами — сенсорными родопсинами А и В.

Как быстрый, так и медленный компоненты фоторецепторного тока направлены внутрь клетки, так что их протекание деполяризует клеточную мембрану (т.е. уменьшает отрицательный мембранный потенциал). Когда эта деполяризация достигает некоторого порогового уровня под действием светового стимула достаточно высокой интенсивности или дли-

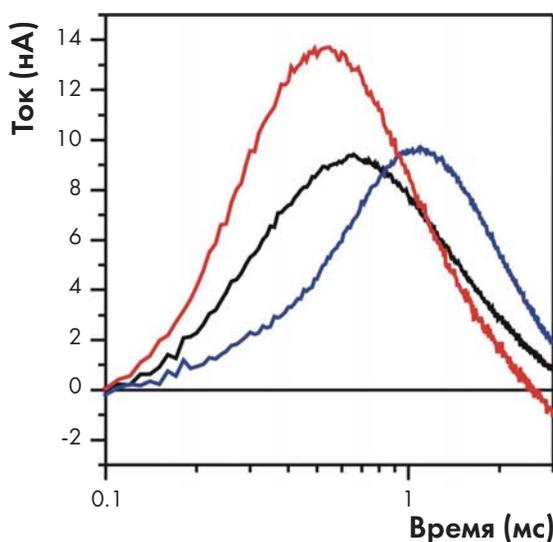


Рисунок 6. Фоторецепторные токи, генерируемые диким типом хламидомонады (черная линия), трансформантом, обогащенным родопсином А (красная линия) и трансформантом, обогащенным родопсином В (синяя линия).

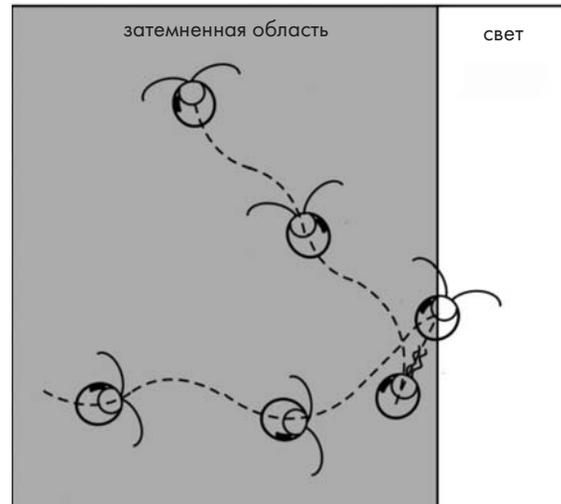


Рисунок 7. Схема фотофобной реакции жгутиковых водорослей.

тельности, в мембране, покрывающей жгутики клетки, открываются кальциевые каналы, и во внутрижгутиковое пространство начинают поступать ионы кальция, что регистрируется как острый импульс так называемого жгутикового тока (на рисунке 5 этот импульс хорошо различим в сигналах, полученных в ответ на вспышки высокой интенсивности). Резкое повышение концентрации ионов кальция внутри жгутов приводит к тому, что вместо обычного биения, в результате которого клетка плывет вперед как бы «бассом», жгутики начинают ундулировать, т.е. совершать волнообразные движения, что заставляет клетку сначала резко остановиться, а потом двигаться назад. Этот «задний ход» длится только короткое время, после чего клетка снова переключается на движение вперед, но уже, как правило, в другом направлении. В природе такое поведение можно наблюдать, когда клетка случайно заплывает в ярко освещенное место из неосвещенной области. Клетку как будто охватывает «испуг» при пересечении границы темноты и света, почему ее поведение в этом случае и назвали «фотофобной», или «фотошоковой», реакцией (рисунок 7).

Понятно, что, раз оба тока, генерируемые при фотовозбуждении и родопсина А, и родопсина В, деполяризуют клеточную мембрану, в принципе оба они могут приводить не только к фототаксису, но и к фотофобной реакции. Это предположение было доказано экспериментально при сравнении спектральной чувствительности у трансформантов, обогащенных каждым из двух белков. Однако вклад тока В, как имеющего более низкое световое насыщение, в фотофобную реакцию относительно меньше, чем вклад высоконасыщающегося

тока А. Иными словами, можно сказать, что родопсин В отвечает в клетке в основном за фототаксис, а родопсин А — за фотофобную реакцию. Такое «разделение труда» может объяснять и различие спектральных характеристик этих двух пигментов. Фототаксис основан на затенении фоторецептора стигмой и хлоропластом, а поглощение этих образований, особенно хлоропласта, лежит в коротковолновой области. Чтобы затенение было эффективным, фоторецептор, отвечающий за фототаксис, также должен поглощать свет в коротковолновой области. Фотофобная же реакция, в отличие от фототаксиса, не зависит от направления света, а значит, нет необходимости «подгонять» спектр поглощения ее фоторецептора под спектральные характеристики затеняющих образований.

Как бы то ни было, наличие в одной и той же клетке нескольких родственных фоторецепторных белков — по-видимому, общее правило, а не исключение: так, в клетках растений может присутствовать целых пять различных фитохромов (рецепторов красного света, обеспечивающих фоторегуляцию многих морфогенетических процессов); рецепторов синего света, криптохромов и фототропинов, обычно тоже бывает несколько. Что же касается родопсиновых пигментов, то, как уже упоминалось, даже в совсем простых клетках галоархей имеется два сенсорных родопсина, а семейство таких белков у многоклеточного животного организма может содержать до тридцати членов — как, например, у гидры. Правда, у многоклеточных эти белки чаще всего избирательно синтезируются только в определенных клетках, причем, как недавно выяснилось, далеко не только в клетках сетчатки глаза. Например, белок меланопсин у шпорцевой лягушки был обнаружен в меланофорах — клетках кожи, обеспечивающих ее окраску за счет содержащегося в них пигмента меланина и способных перемещаться в коже под действием света. При этом меланопсин выступает в качестве фоторецептора этого перемещения. А у крыс тот же меланопсин содержится в сетчатке, но не в фоторецепторных ее клетках, палочках и колбочках, где находятся собственно зрительные пигменты, а в ганглиозных, и отвечает он не за зрение, а за световую регуляцию фазы циркадных (около-суточных) ритмов. Другие «нестандартные» родопсины животных обнаружены в глубине мозга или вообще в семенниках, у клеток которых уж совсем трудно предполагать какую-либо нужду в фоторегуляции. Зачем этим клеткам родопсины, пока что не ясно.

Не установлена пока и клеточная функция многих родопсиновых белков, гены которых

были идентифицированы в геномах разнообразных представителей других царств. Один из самых трудных случаев — это, по-видимому, родопсины, обнаруженные у грибов. Первым таким грибом была нейроспора — особый род плесени, широко используемый для лабораторных исследований. У нейроспоры известно несколько фоторегуляторных реакций, в основном связанных с развитием органов размножения. В отличие от хламидомонады, нейроспора — исключительно удобный объект для направленного разрушения генов, чем в значительной мере и объясняется ее популярность у ученых. Вывести штамм нейроспоры с разрушенным опсиновым геном было нетрудно. Однако оказалось, что все известные фоторегуляторные реакции протекают у этого штамма точно так же, как и у дикого типа, а значит ни одна из них не опосредована родопсиновым рецептором! Разрешение этой загадки — задача для будущих исследователей.

Выяснение клеточной функции конкретного пигмента — это только начало его изучения, потому что интересно знать не только, что он делает, но и как. Поскольку основное свойство пигментов — способность поглощать свет, естественно, что основным инструментом для их изучения служит абсорбционная спектроскопия, а также другие оптические методы, разнообразие и эффективность которых постоянно увеличиваются по мере совершенствования их технического обеспечения. Доступность лазеров, способных генерировать ультракороткие вспышки света, сейчас позволяет исследовать фотохимические процессы с временным разрешением в субфемтосекундном диапазоне (для справки: фемто — это десять в минус пятнадцатой степени). Чувствительность же используемых в настоящее время детекторов света позволяет регистрировать, например, флуоресценцию индивидуальных молекул. Однако для применения большинства самых информативных оптических методов все же требуется достаточно большое количество более или менее очищенного пигмента. В случае, например, фотосинтетических пигментов это очень просто: они присутствуют в клетках в колоссальной концентрации. Но клеточная концентрация пигментов фоторецепторных, как правило, настолько мала, что выделить их в чистом виде никак не удастся. Как уже говорилось, это относится и к сенсорным родопсином хламидомонады: их наличие в клетках (и в отдельных клеточных фракциях — а именно, во фракции мембран, примыкающих к глазку) удалось показать сверхчувствительными иммунологическими методами, но все попытки их препаративного выделения оказались неудачными.

Альтернативная стратегия, позволяющая обойти эту трудность, заключается в производстве требуемых количеств исследуемого белка в модельном организме — чаще всего в бактерии *Escherichia coli* (кишечной палочке), широко используемой для молекулярного клонирования. Используя специальные генно-инженерные приемы, удастся заставить бактерию синтезировать так много заданного чужеродного белка, что он составляет более половины всего ее белкового содержания! Если чужеродный белок — пигмент, то колонии бактерий, синтезирующих такой белок, приобретают его окраску и выглядят на агаре очень красиво. Когда интересующего нас белка в клетке так много, выделить его в чистом виде, конечно, не составляет особого труда. Тем более, что к нему заранее (т.е. еще на уровне генетической конструкции, которую используют для трансформации бактерий) «подшивают» группы, облегчающие очистку. Чаще всего в качестве такой группы используют последовательность из нескольких (от шести до десяти) остатков гистидина — аминокислоты, боковая цепь которой образует прочный комплекс с ионами металлов. Лизат клеток, синтезирующих чужеродный белок с такой дополнительной последовательностью на одном из концов, пропускают через хроматографическую колонку с иммобилизованными на агарозе ионами никеля (рисунок 8). Полигистидиновые «хвостики» удерживают содержащие их молекулы белка на колонке, а все остальные белки легко проходят сквозь нее. Потом колонку с «прилипшими» к ней нашими белками промывают веществом, разрушающим связи гистидина с никелем, и — voila! — мы получили препарат нашего белка, пригодный для оптических или биохимических исследований. Такой способ очистки белка называют аффинной хроматографией («аффинность» означает «средство», в данном случае химическое). Если же требуется еще более высокая степень очистки белка (например, для выращивания его кристаллов), то полученный с помощью аффинной хроматографии препарат подвергают еще нескольким последовательным процедурам фракционирования, основанным уже на других принципах — например, разделению молекул по массе или по отношению массы к заряду.

Дополнительное преимущество такого подхода состоит в возможности направленного мутагенеза с целью изучения взаимосвязи структуры и функции белка. Ведь бактерию легко трансформировать не только геном дикого типа, но и искусственным геном — в последовательности которого триплет, кодирующий

интересующий нас остаток аминокислоты, заменен на триплет, кодирующий другую аминокислоту. Первичная последовательность белка, транслируемого с этого гена, будет отличаться от белка дикого типа только на одну эту аминокислоту, так что сравнение свойств мутантного белка с белком дикого типа покажет, какое значение имеет данный аминокислотный остаток для функции нашего белка. Действуя последовательно, т.е. мутируя одну аминокислоту за другой и производя сравнительный анализ получаемых мутантов, можно получить очень детальную картину того, как работает наш белок.

Использование кишечной палочки как своеобразного «станка» по производству чужеродных белков оказалось очень эффективным в случае родопсинов прокариотического происхождения. К сожалению, при экспрессии в *E. coli* опсиновых генов эукариотических организмов полипептидная цепь чаще всего сворачивается неправильно, что приводит к образованию

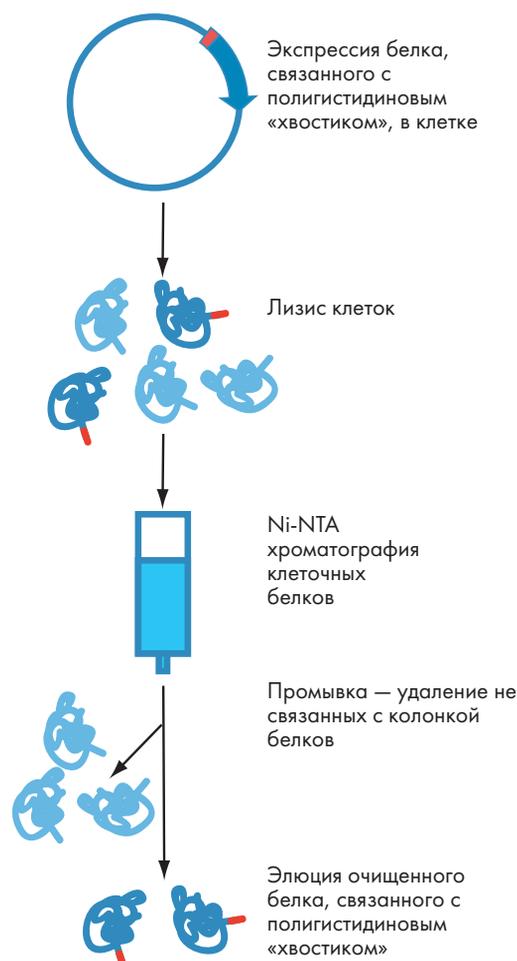
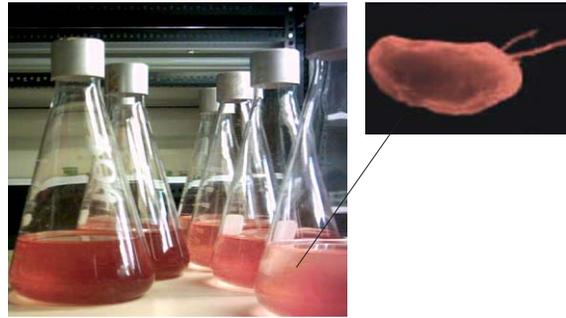


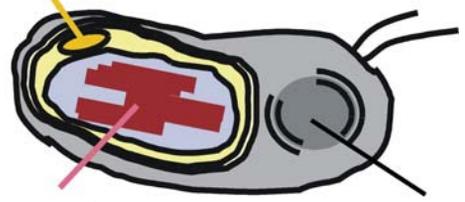
Рисунок 8. Схема очистки белка, содержащего гистидиновый «хвостик», при помощи аффинной хроматографии на никель-агарозной колонке.

функционально неактивного белка, не способного даже связывать ретиналь. В частности, это происходит с сенсорными родопсинами хламидомонады: получить в модельной бактериальной системе полноценный пигмент не удастся. А вот в случае другой водоросли, относящейся к отряду криптофитовых, это оказалось возможно. У этой водоросли, латинское название которой *Guillardia theta*, в геноме имеются по крайней мере два опсиновых гена, и, когда мы экспрессировали один из них в *E. coli*, получился полноценный пигмент. У *G. theta* тоже есть фототаксис, как и у хламидомонады. Пик поглощения пигмента, синтезированного в *E. coli*, соответствует плечу спектра действия фототаксиса самой *G. theta*, так что есть основания считать, что этот родопсиновый пигмент выполняет в клетке функцию одного из рецепторов фототаксиса. Для окончательной проверки этой гипотезы необходимы эксперименты с подавлением активности этого гена и исследованием фенотипических последствий этого подавления, как это было сделано для хламидомонады.

Интересно, что криптофитовые водоросли филогенетически очень далеки от зеленых водорослей, к которым принадлежит хламидомонада. Более того, криптофиты представляют собой совершенно уникальные организмы, содержащие четыре генома в клетке. Помимо трех «обычных» геномов — ядерного, хлоропластного и митохондриального — имеющих также и у хламидомонады, у криптофитов обнаруживается еще один дополнительный геном, геном так называемого «нуклеоморфа». Откуда же он взялся? Дело в том, что криптофиты, так же как и некоторые другие группы водорослей, например диатомеи, — продукты вторичного эндосимбиоза (рисунок 9). В ходе их эволюции процесс поглощения фотосинтезирующего организма гетеротрофным происходил дважды: первый раз, когда один гетеротроф поглотил фотосинтезирующую бактерию, в результате чего образовался первичный эндосимбиотический организм (т.е. такой, какие представляют из себя ныне живущие зеленые водоросли), и второй раз, когда другой гетеротроф (надо полагать, большего размера, чем первый!) поглотил первичный эндосимбиотический организм, что привело к образованию вторичного эндосимбиотического организма. Так вот, криптофиты — одна из только двух групп водорослей (причем вторая — совсем малоизученная), у которых сохраняется, хотя и в редуцированном виде, ядро первого гетеротрофа, в то время как у всех остальных групп, прошедших в эволюции тот же путь вторичного эндосимбиоза, оно начисто исчезает.



нуклеоморф (произошел из ядра красной водоросли)



хлоропласт (произошел из цианобактерии)

ядро

Рисунок 9. Культура криптофитовой водоросли *G. theta*, ее отдельная клетка (изображение получено при помощи сканирующего электронного микроскопа) и схема строения этой клетки, отражающая ее происхождение в результате вторичного эндосимбиоза.

Каким образом опсиновые гены попали в геном криптофитовых водорослей, пока не ясно. Да и вообще распределение этих генов среди организмов различных групп, геномы которых были полностью отсеквенированы к настоящему времени, совершенно загадочно. Например, среди множества цианобактерий с полностью известными геномами опсиновые гены найдены только у двух видов, находящихся, можно сказать, на противоположных полюсах всего разнообразия цианобактерий: у *Gloebacter violaceus*, одиночной цианобактерии, считающейся наиболее примитивной, предковой, формой, и у одной из наиболее сложно организованных, нитчатой *Anabaena*, причем только у одного вида (точнее, даже штамма) из этого обширного рода. В довершение сложности картины, между этими двумя цианобактериальными белками очень мало сходства как по структуре (первичной последовательности), так и по функции: родопсин *Gloebacter* представляет собой протонную помпу, как бактериородопсин, а родопсин *Anabaena* — фоторецептор, но не фототаксиса (которого нет и не может быть у этого неподвижного штамма), а фоторегуляции пигментного состава фотосинтетического аппарата. Так что анализ молекулярной эволюции опсиновых генов — еще одна весьма непростая задача для будущих ученых.

Поскольку родопсины хламидомонады, в отличие от цианобактериальных и других прокариотических, производить в бактериях пока что не удастся, для этой цели были опробованы другие модельные системы. Успеха удалось добиться с ооцитами шпорцевой лягушки, которые, в отличие от бактерий, совершенно не годятся для наработки больших количеств чужеродных белков, но зато предоставляют отличные возможности для исследования этих белков электрофизиологическими методами. Ооциты лягушки — это очень большие клетки (икру пусть не шпорцевых, но обыкновенных лягушек все видели в пруду весной), в которые можно легко вводить микроэлектроды (рисунок 10). Сравнивая электрические сигналы, отводимые микроэлектродами от контрольных ооцитов и ооцитов, инъецированных матричной РНК исследуемого белка, можно определить, какую именно электрическую активность проявляет данный белок.

Результаты такого эксперимента для обоих родопсинов хламидомонады оказались совершенно удивительными, а именно оказалось, что эти белки представляют собой фотоактивируемые ионные каналы — единственные в своем роде, поскольку ничего подобного ранее было в природе неизвестно! Разница же между ионным каналом и ионной помпой заключается не только в том, что последняя может перекачивать ионы против их электрохимического градиента, но и в том, что трансмембранные токи, генерируемые помпами, по своей амплитуде обычно меньше токов через ионные каналы. Это и понятно: ионные помпы, такие как бактериородопсин, перекачивают только один протон на каждый поглощенный квант света, а через канал, активированный одним квантом, может пройти последовательно много ионов.

Именно с этой стороны фотоактивируемые ионные каналы, каковыми оказались родопсины хламидомонады, особенно второй из них, — родопсин В, чрезвычайно заинтересовали исследователей: ведь наличие такого канала в мембране клетки означает возможность манипулировать ее мембранным потенциалом просто при помощи света. Немедленно были предприняты попытки экспрессии опсинового гена В хламидомонады в нейронах разнообразных животных организмов — и они оказались успешными! Такие трансформированные нейроны оказались способны генерировать потенциал

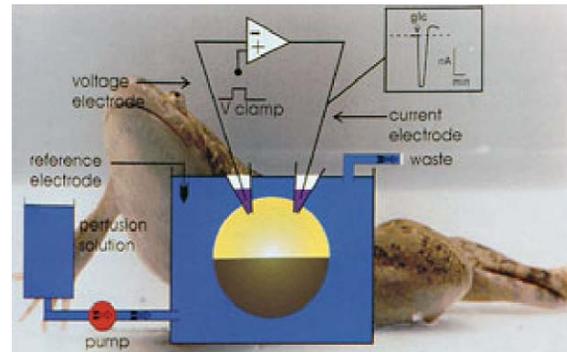


Рисунок 10. Шпорцевая лягушка и схематическое изображение ее ооцита с введенными в него двумя микроэлектродами в цепи измерения электрических токов.

действия в ответ на освещение и запускать таким образом контролируемый ими физиологический ответ — например, сокращение мышц в случае мотонейронов. Но наиболее практически значимый результат был достигнут, когда ген опсина В экспрессировали в ганглиозных клетках сетчатки слепых крыс, у которых палочки и колбочки совершенно дегенерировали в результате болезни, весьма распространенной также и у людей. Трансгенные крысы приобрели способность если не видеть, то по крайней мере ясно различать свет и темноту, поскольку электрические сигналы, генерируемые родопсином В хламидомонады в мембране ганглиозных клеток, адекватно интерпретировались крысиным мозгом. Так что вполне возможно, что через несколько лет экспрессия родопсинов водорослей в сетчатке глаза станет рутинным способом восстановления зрения и у слепых людей.

Эта история очень наглядно показывает, каким непредсказуемым образом развиваются научные исследования и к каким неожиданным практическим результатам они могут приводить. А ведь родопсины хламидомонады — это только один, хотя и совершенно уникальный, вариант ретинальсодержащего белка, которых к настоящему времени уже известно около тысячи. Вернее, столько известно нуклеотидных последовательностей опсиновых генов, обнаруженных в ходе разнообразных проектов секвенирования геномов культивированных организмов, и особенно — образцов ДНК, выделенных непосредственно из проб морского нанопланктона, преимущественно состоящего из прокариот. Изучение же свойств белков, кодируемых всеми этими генами, ждет будущих исследователей!

Что увидел орнитолог в тропическом лесу? или Вот оно — биоразнообразие!

М. Калякин



Михаил Калякин,
5-й выпуск, школа № 57
(1980 г.), закончил кафедру
зоологии позвоночных
Биофака МГУ (1985 г.),
работает в Зоологическом
музее МГУ с 1985 г. *,
к.б.н., ученый секретарь
Зоологического музея,
kalyakin@rambler.ru

Часть 1. Как становятся орнитологом?

Ах, зачем я на свет появился,
Ах, зачем меня мать родила.
Кажется, народная песня

Кто загнал тебя сюда, в тесную посудину?
В.Высоцкий

Таких лекций вы еще не слышали. В ней почти незаметен четкий план, а речь пойдет не только о том, что обозначено в заглавии и в названии двух ее частей. Это не рассказ о птицах, а рассказ об экосистеме тропического леса глазами орнитолога и поэтому — с большим вниманием к птицам. Предваряющая эти рассуждения часть появилась как-то сама собой и раз уж появилась, то я не стал с ней бороться. Так что больше всего это похоже на беседу где-нибудь на крыльце беломорского дома, когда рассказчик не может остановиться, а слушатели настолько терпеливы и внимательны, что и не перебивают его вопросами и не полностью заснули. Удобно то, что книжку можно на время отложить, — пользуясь этим, я незаметно перехожу от темы к теме, и вы получаете три или четыре лекции в одной.

Сначала поговорим про то, чем специфично положение начинающего орнитолога (орнитология — наука о птицах), а потом — про то, куда его может завести такой выбор профессии.

Любой орнитолог легко докажет вам на пальцах одной руки, что наука о птицах — центральная область биологии. Многим из орнитологов кажется, что уже простой констатации этого факта вполне достаточно для полного и всеобъемлющего убеждения слушателя или слушателей (такие тирады обычно произносятся с трибун съездов и конференций и адресуются сразу большой аудитории). Если этого утверждения недостаточно, то используются такие аргументы, как гораздо более полная изученность биологии птиц в сравнении с другими животными, что и позволило, например, классику биологии XX века Эрнсту Майру (орнитологу; рисунки 1, 2) сделать далеко идущие общебиологические выводы, опираясь в первую очередь на обширную фактологическую базу, накопленную в орнитологии (за рубежом говорят — in Avian Biology). Если же после этого кто-то все еще будет сомневаться в полной и абсолютной гегемонии орнитологии, ссылаясь, например, на то, что и млекопитающие изучены не хуже, то его добьют фактом о том, что птиц зато гораздо больше. Обычно диспут на этом заканчивается, поскольку те, кто захочет заикнуться про обилие моллюсков, ракообразных или насекомых, вспомнят о слабой изученности биологии этих групп и тихо отойдут в сторонку.

Однако, рассуждая теперь над местом и ролью орнитологии среди других биологических дисциплин с самим собой, я почему-то обращаю больше внимания на другие аспекты этой науки. Такие особенности птиц, как легкость наблюдения за ними (это, как правило, но есть исключения), их «обаятельность» в виде яркой или изящной окраски, громкого или красивого голоса, а также их умение летать (завидки берут), безусловно делают их привлекательным объектом для людей, интересующихся природой. Да, я буду строить свои рассуждения в направлении от первого, поверхностного, интереса, к более глубокому, научному. Разнообразие птиц относительно велико: в мире их примерно 10 000 видов, а на территории одной только Московской области — чуть более трехсот. Эти масштабы, видимо, близки к «разрешающей способности» памяти среднего научного работника: разнообразие не запредельное, это вам не сосудистые растения и

* В 1989–1992 гг. был командирован во Вьетнам, в состав Советско-Вьетнамского, ныне — Российско-Вьетнамского Тропического центра.

не насекомые, вполне можно держать в уме одновременно все названия птиц фауны России (более 700 видов) или Вьетнама (более 800 видов). Впрочем, это показатель «плавающий» — многие ботаники и энтомологи помнят гораздо больше названий. Возможно, более крупные группы оказываются несколько менее интересными потому, что при огромном видовом разнообразии сведений о биологии конкретных видов, т.е. о самой квинтэссенции биологии — об их специфике, специфике вида (каламбур, если не тавтология), явно мало, а по большей части нет вовсе. Забегая вперед, скажу, что особенно удручает этот перекокс тех, кто хотел бы, например, почитать о биологии насекомых в тропическом лесу. «Запрос посылаем мы, что это там, а нас посылают обратно» (опять В.Высоцкий), поскольку на то, чтобы изучить биологию конкретных видов, нет ни сил, ни времени. Пока не до того — ведь оказывается, что еще отнюдь не все виды найдены, описаны, систематизированы и внесены в список. При этом специалист по жукам и специалист по двукрылым фактически говорят на разных языках, поскольку даже для «простого» определения видов нужно держать в уме сложные определительные

таблицы каждой из групп с тысячами информационных «ячеек», организованных в сложную иерархическую конструкцию.

Итак, птицы достаточно разнообразны, но это разнообразие обозримо; удобны как объект прямых наблюдений (следить за ними легче, чем за полевками или медведями); поют и кричат, помогая себя обнаружить и определить; часто — просто красивы; в основном активно проводят время, что не дает скучать наблюдателю; встречаются фактически в любых биотопах. Так в чем же негатив? А негатив, как ни парадоксально, — именно во внешней легкости наблюдений за ними. Как для игры в футбол достаточно относительно круглого предмета и небольшой, приблизительно ровной площадки, отчего это — игра миллионов, так и наблюдения за птицами требуют от начинающего орнитолога только наличия бинокля (опытные при выполнении многих исследований обходятся и без него) и некоторого терпения в ожидании момента, когда «вылетит птичка». В итоге среди непрофессиональных любителей природы (т.е. тех, кто интересуется ей не за зарплату) первое место по числу участников уверенно занимают клубы, союзы, кружки и общества любителей птиц. В одной Великобритании таких любителей более миллиона! Еще не менее 200 000 (двести тысяч) — в Нидерландах. И пусть поменьше, но все-таки весьма немало их и в других странах Европы и Северной Америки. Короче говоря, знакомство с окружающей природой обычно начинается с птиц, и часто на этом пункте и останавливается (но не заканчивается). Не один десяток статей и книг написано о том вкладе в орнитологию, который внесли в эту отрасль науки любители. Естественно, многие из них, истово интересуясь птицами на протяжении всей своей жизни, вырастали в специалистов, рядом с которыми средний профессиональный орнитолог выглядит весьма бледно. (Что, между прочим, подтверждает то положение, что лучше всего человек делает то, что больше всего хочет. Определить это в нашу напряженную эпоху довольно сложно, поскольку в идеале надо дать молодому человеку так много свободного времени, чтобы он от него изнемог и взялся, при полной свободе выбора, за самое для себя желанное.)

Так или иначе, но орнитология обладает, по моему, особым магнетизмом — это «на входе», когда юное существо делает свой первый выбор. Не касаясь массы деталей, влияющих на этот выбор, в целом я могу сделать следующее заключение о таком человеке. Он не должен бояться повышенной конкуренции в выбранной им области — ведь он движется в ту же сторону, что и множество других выбирающих. Этому спо-



Рисунок 1. Памятная табличка у входа в мемориальный кабинет Э.Майра в Музее сравнительной зоологии, Кембридж (окрестности Бостона), Массачусетс, США.



Рисунок 2. Часть интерьера мемориального кабинета Э.Майра, там же.

собствует либо повышенная (нередко переходит в завышенную) самооценка — «я их всех переплюну», либо тоже повышенное спокойствие, фактически переходящее в отсутствие опасений выглядеть хуже многочисленных «коллег».

Возможна также и такая причина, как давнее знакомство с объектом за счет участия еще в малосознательном возрасте в соответствующих кружках или, реже, — наличие родителей-орнитологов. Реже потому, что в соответствующем возрасте хочется от родителей сильно отличаться. Помогает стать орнитологом и некоторая инфантильность (проходящая с возрастом или остающаяся с клиентом навсегда), когда выбор представляется делом малоответственным, вполне может не быть окончательным, а порой зависит от выбора друга или подруги. И вот, образно говоря, наш ручеек сливается со многими такими же, образует довольно мощный поток, который в свою очередь тоже куда-то вливается, причем в какой-то момент обязательно теряется скорость — значит, течение достигло чего-то вроде морского залива. Любая вода течет сверху вниз, так что если тут была глубокая впадина, то она давно заполнилась. Как ни широк разлив, но берега у него тоже есть — обилие орнитологов, например, ограничивает число мест работы, где за изучение птиц платят деньги. Раз это слово возникло, то скажу: обсуждать эту сторону орнитологии у меня пороха не хватает. Если кратко, то деньги эти и до, и после распада СССР были и остались недостаточными. И вот тут оказывается, что держаться в направлении главного русла, которое где-то впереди (отсюда не видать) вынесет вас к чему-то новому (в науке) и светлому (в ваших ощущениях себя как удачного ученого), довольно сложно. Во-первых, не ясно, где главное направление: одни уважаемые ученые влекут за собой молодежь в одну сторону, другие — в другую, этих уважаемых (пока, по молодости) ученых мужей или дам много, так что можно заплывать в тихий, заросший ряской омут, можно застрять в лабиринте проток, а можно взять неверный ориентир и плыть так, чтобы берег был всегда справа, — при таком способе некоторое число участников плавает по кругу, так как в ряде случаев рядом оказался пусть большой, но все же остров.

Откажемся от этих сложных аллегорий. Молодой человек, вовлекшись в орнитологию, оказывается в специфическом научном пространстве, в котором: а) много народу, и уже давно много, поэтому все «легкие» вопросы уже разобраны и в разной степени разрешены; б) часть пасущихся на этой травке ученых считаются главными, маститыми и авторитетными, а при общей большой численности орнитологиче-

ской популяции соответственно велико число и этих авторитетов; в) имеется масса публикаций на самые разные орнитологические темы, поэтому начинающий орнитолог регулярно попадает в ситуацию, когда он, выполнив свое первое исследование, с некоторым опозданием понимает, что просто продублировал исследование, уже выполненное и опубликованное другими; г) из-за большого числа участников уже придумано и внедрено много разных методических фокусов, позволяющих посмотреть, например, на то, что происходит у птиц внутри, не повреждая их, измерить температуру в насиживаемом яйце, высчитать, сколько килокалорий тратит самец на пение в начале и в конце периода размножения, какова социальная структура группы, и многое другое. То есть оказывается, что трудно найти вопрос, который еще не освоен коллегами, — а ведь начинающему специалисту интересно делать что-то новое, свое, выдуманное именно им. А тут, с одной стороны, все порасхватили, с другой — создали большой запас публикаций, не освоив которые, вы не узнаете, что занято, а что нет, да еще наизобретали методик, в том числе сложных, не освоив которые, вы не будете котируются как профессионал.

Вынужден высказаться и по поводу пункта б) из предыдущего абзаца. Не знаю, как за рубежом, а в наших условиях — что до 1991 г., что после — обилие маститых «лидеров» имело и имеет свой совершенно определенный отрицательный аспект: лидер в целом, не из-за личного коварства или других низких качеств, а в силу устройства финансирования и администрирования науки, нацелен на то, чтобы его ученики и последователи его не переросли. И эту интересную тему я позволю себе отложить до лучших времен, отметив лишь итог — за 20 лет активного вращения в отечественной орнитологической среде я накопил сведения о единичных случаях существования у нас настоящих орнитологических «школ». Имеются в виду такие места, в которых у того или иного действительно крупного специалиста были бы ученики, причем не один или два «любимых», а, так сказать, слой за слоем. При этом отличить «школу» от случайно похожих на нее комбинаций довольно просто (беру патент!): основатель школы, Учитель с большой буквы, во-первых, радуется тому, что ученики его перерастают и обходят по числу публикаций, положению в научном сообществе и даже по положению на административной лестнице, а во-вторых — ученики в каких-нибудь направлениях действительно перерастают Учителя. Для этого, как понятно, Учитель должен иметь совершенно определенные человеческие качества, которые в отечественной науке и, конечно, в отечестве

в целом, уж почти сто лет не поддерживаются активно проводимым неестественным отбором. Но и это — не моя тема.

Я же попытаюсь вернуться к своей магистральной идее: завлеченные сладкоголосым пением в орнитологический Эдем многочисленными начинающими орнитологи сталкиваются на его территории с необходимостью проявлять качества, которых на входе от них никто не требовал. От померещившейся легкости не осталось почти ничего, надо выбирать свой путь, постараться отличить действительно интересно работающего, мыслящего и при этом по-человечески надежного научного руководителя от трепача и надувалы (у последних значительно больше времени на «охмурение» молодежи, тогда как первые в норме заняты под завязку), проявить реальный интерес к предмету, достаточный для борьбы с обширной литературой (с каждым годом ее поток нарастает!) и для освоения уже изобретенных разнообразных и не всегда простых методов. Орнитология оказывается плоха именно своей «легкостью». Ну, если не «плоха», но «трудна» уж точно, причем трудна несколько неожиданным для клиента образом.

К чему приводит перечисленный букет взаимодействующих между собой и с окружающей средой факторов? К тому, что далеко не все плавсредства, втянутые в этот водоворот, разлив, лабиринт или дельту, находят главный или хотя бы второстепенный, но фарватер. Кроме тех, кто совсем сходит на берег, остается еще много тех, кто так и плещется у самого устья, описывает круги, дрейфует потихоньку куда ветер подует или следует за крупными судами. Наличие описанных выше объективных трудностей приводит к тому, что обязательно возникает прослойка орнитологов, которой по самым разным причинам преодолеть эти трудности не удастся. Они, если перефразировать одного из самых остроумных моих наставников, «сделали из своей работы свое хобби». Как и в начале карьеры, они получают приятные ощущения, следя за птицами, находя гнезда или фотографируя пернатых, но не двигают науку вперед, не «находятся в авангарде, на переднем крае науки», как об этом писали в советское время, когда многое обсуждалось в нескольких воинственных терминах. Они — в арьергарде, дополняют известное ранее новыми деталями, занимаются накоплением новых фактов без их обобщения, решают прикладные задачи. Все это тоже важно, интересно, нужно, в частности помогает охране птиц и природы в целом. Но не похоже на классический образ ученого, открывающего новые рубежи, обобщающего все известные до сей поры факты и оживляю-

щего их новым подходом, неожиданной точкой зрения, выявлением неизвестных ранее закономерностей.

«На Западе» структуру орнитологического сообщества образует небольшое число профессионалов, находящихся на ставках в учреждениях, которые мы у себя называли бы научно-исследовательскими (кстати, а почему надо использовать оба термина вместе? — вопрос для домашней работы, т.е. для размышлений), и огромная армия любителей, наблюдающих за птицами в свободное от работы время. У нас такие любители тоже есть, но их немного, а все остальные числятся профессионалами. Как мы уже высчитали, среди них есть те, кто не преодолел многочисленных трудностей, отделяющих любительскую орнитологию от ее научной части. Так что у нас обратная картина — среди профессионалов на самом деле остаются замаскированные любители. За рубежом (опять же, не везде, а в развитых орнитологических державах) профессиональные орнитологи в типовом случае трудятся, как бобики, — при имеющейся безработице на их место стоит длинная очередь жаждущих подменить нерадивых или просто медлительных работников. А «любители» подтягиваются к их уровню, так что общий вектор направлен на повышение качества работ — прямой результат отточенной веками системы более-менее свободной и относительно равной конкуренции. У нас орнитология для большинства профессиональных орнитологов превратилась в увлечение, которое не бросают только из-за любви к нему: число профессионалов, получающих достаточный объем финансов за занятия наукой, ничтожно. В типичном случае они заняты чем-нибудь еще, чтобы иметь возможность сидеть на ставке орнитолога и заниматься любимым делом. При этом надо очень сильно любить это дело либо, наоборот, быть ленивым и безразличным, в том числе и к собственному положению, других вариантов продержаться в профессии я как-то не вспомню, если не считать наличия такого источника финансов, на который не приходится тратить времени (финансовая поддержка от родственников и знакомых кролика).

А еще у нас, как и во многом другом, есть своя, сугубо российская, трудность. Я не шучу и не подтруниваю. Действительно есть, и очень серьезная. Большая. Такая же большая, как наша территория. Собственно большая территория и представляет собой проблему. Взгляните на карту (административную) Евразии, не забывая о разнице в принципах организации сообществ орнитологов у нас и в Европе. И что мы видим? В Европе, при их малой территории, ты-

сячи и тысячи орнитологов (профессионалов и высококачественных любителей). В России на несколько сотен орнитологов (пусть на тысячу, даже и с небольшим) — миллионы км². На некоторых из этих «квадратов» еще не ступала ни одна нога орнитолога. По моим очень грубым подсчетам, на одного активно интересующегося птицами человека в Великобритании приходится клочок земли размером менее чем 2 км², в Германии — территория площадью 75 км², в Москве и Московской области — 313 км², а в России в целом — 8500 км². Поэтому в Европе, где научные орнитологические наблюдения надо считать начавшимися приблизительно в середине или в конце XIX века, т.е. немногим ранее, чем в России (первая сводка по фауне птиц Российской империи опубликована М.А. Мензбиром в 1893–1895 гг.), быстро завершился фаунистический этап (описание того, какие птицы где живут) и начался период собственно биологических работ. Видов не так много, на небольшой территории быстро удалось установить то, кто из них где обитает, и начались долговременные исследования различных вопросов видовой биологии — от размножения до линьки и от поведения до экоморфологии. У нас же первый этап (описание фауны) все длится, длится и длится («Лоськов получает мяч, обрабатывает, обрабатывает, обрабатывает... Не смог обработать» — из комментария футбольного матча). Нам предстоит еще долго обследовать наши северные и восточные территории, передвижение по которым затруднено, полярное или северное лето коротко, население птиц относительно обеднено и за счет низкой плотности «растянуто» на много километров плюс состав фауны относительно сильно колеблется год от года из-за нестабильных погодных условий. И не прошел еще затянувшийся этап географических открытий, не один и не двое наших коллег еще напишут множество статей, поражая читателей данными о встречах птиц в сотнях километров от известных мест их обитания или размножения. Так что к перечисленным выше соблазнам и трудностям, наваливающимся на юного орнитолога, добавляется еще один — «ветер дальних дорог», стремление к неизведанному, кочевки, делящиеся порой всю жизнь, осмотр все новых и новых территорий — порой новых для науки, но чаще — для наблюдателя. Велика наша страна, и еще никому из орнитологов не удалось побывать во всех ее уголках и увидеть все виды населяющих ее пернатых. По этому кругу можно двигаться вечно (особенно если «вечность» — всего лишь наша коротенькая жизнь), и нельзя сказать, что эта дорога безлюдна.

Эта затянувшаяся сага позволяет сделать довольно простой вывод — не так проста орни-

тология, как может показаться на первый взгляд. Начиная орнитолога, посмотрев на эту науку с ее изнаночной стороны, сможет сделать для себя полезные практические выводы, т.е. заранее представить себе некоторую ловушку, ожидающую любителя побродить с биноклем для собственного удовольствия в случае его устройства на работу на должность орнитолога. Впрочем, во-первых, это пока мнение одного, отдельно взятого орнитолога — попробуйте поговорить с другими, и почти наверняка услышите много других мнений, возможно даже — полностью противоположных. Во-вторых, «бродить в полях, ничем не беспокоясь» и рассматривать пернатых может любой, нет нужды становиться для этого профессионалом (с формальной точки зрения). В третьих — многие проблемы имеют сходное звучание и в других отраслях биологии, просто у автора нет соответствующего опыта, он еще не был ни ботаником, ни энтомологом, ни эндокринологом. Более того, он продолжает заниматься птицами и не готов (опасается?) прямо ответить на вопрос о том, почему он выбрал именно это направление. Заподозрить можно что угодно — от бравого «Иду на грозу» и не смущаюсь ни одной из перечисленных трудностей до банального «Так получилось» по первоначально, а потом уже неохота было переучиваться и переориентироваться. Похоже, что лектор не готов изложить что-либо связно и свежо по этому поводу. Видимо, ему не до конца понятно, почему и как он стал орнитологом, а гадать об этом перед терпеливыми слушателями, бормоча: «С одной стороны ..., но с другой стороны ...» — не хочется. Поэтому переходим ко второй части лекции, тем более что она обещает быть интереснее первой.

Часть 2. И к чему это приводит

И пропал казак...

Н.В. Гоголь, «Тарас Бульба»

Итак, после окончания обучения в университете и работы в Зоологическом музее в качестве экскурсовода и младшего научного сотрудника отдела орнитологии, в 1989 г. по приглашению познакомившегося со мной еще «на картошке» Л.П. Корзуна (он был у нас начальником отряда) я более чем на два года убыл во Вьетнам, в распоряжение Совместного Советско-Вьетнамского Тропического центра. Именно — в качестве орнитолога. Не могу не поразмышлять о состоявшемся повороте: получилось, что я оказался недостаточно целеустремленным, чтобы продолжать начатое еще студентом изучение славковых

птиц Палеарктики (камышевки, сверчки, пересмешки и проч.), но достаточно авантюрным (смелым? легкомысленным?), чтобы впервые в жизни выехать за границу, окунуться в совершенно неизвестный климат, ландшафт, в гущу тропического леса (это после работы с птицами, живущими в двухмерном пространстве — в тростниках и высокотравье), о котором при отсутствии энциклопедического образования и просто начитанности знал очень мало, и при этом не представлять себе временных рамок заезда: сначала речь шла про один год, потом, почти без предисловий, — про второй, а потом началась такая политическая свистопляска, что уже никто и понятия не имел о будущем нашей славной организации, ставшей из Советско-Вьетнамской Российско-Вьетнамской. Но что же это лектор все рефлексировал о былом и своих думах? Пора перейти к главной теме — к почти внезапному попаданию выросшего в умеренных широтах натуралиста в зеленый тропический то ли ад, то ли рай.

А помнишь, как все начиналось?

«Машина времени», А.Макаревич

Для наших читателей слова «первый выезд» — это почти пароль. Сделаем поправку: имеется в виду первый выезд не на станцию «Гжель» или «Скоротово», а в тропический лес. Видели бы вы нас с Андреем Кузнецовым и Мишей Серебряным числа примерно 26-го мая 1989 г., во время нашего первого выезда в лес Ма Да, произрастающего в 80 км к северо-востоку от Сайгона (или Хошимина)! Романтика времен Пржевальского и Миклухо-Маклая ушла в прошлое. Ни гортанного крика погонщиков верблюдов, ни парусного ялика — первый выезд в тропический лес происходил на автобусе «ПАЗ» желто-рыжего цвета. За рулем — товарищ Чунг, с нами в автобусе смешанная команда экологов и тропикостойщиков — специалистов, занимающихся вопросами о том, через сколько месяцев, недель или дней приходит в негодность наша военная техника после размещения ее в тропическому лесу на десятом градусе северной широты. И почти вся администрация Тропического центра, уникальной по своей структуре и функциям организации, основанной в 1987 г. академиком В.Е. Соколовым. Но мы, экологи, чувствуем себя в автобусе главными. Потому что цель выезда — ознакомиться с тропическим лесом и выбрать место для постройки полевой станции, а также потому, что мы тут самые молодые, нам от 26 до 30 лет. Это можно определить невооруженным глазом — мы так дергаемся и так жадно вглядываемся в окрестности, что буквально притягиваем к себе удивленные взгляды мирных

вьетнамцев, бредущих или катящихся по своим делам на велосипедах по обочине шоссе. Когда же на горизонте возникает зеленая полоска, мы окончательно входим в штопор, и к моменту остановки на противоположном от леса берегу реки мы уже с ног до головы — в полевом оборудовании: мирные ботаники сжимают гербарные сетки и саперную лопатку, на мне висит патронташ, бинокль, фотоаппарат и собранное и готовое к использованию ружье (до сих пор надеюсь на то, что оно хотя бы было незаряженным). Именно так мы проводим час на жаре в ожидании парома, после чего оказывается, что нас ждут в районной администрации для традиционно неторопливых и обстоятельных переговоров за чашечкой круто заваренного зеленого чая. Ружье приходится зачехлить, чай горчит, зеленая полоска леса оказалась жидкой рошцей из высаженных сотрудниками лесхоза акаций и эвкалиптов.

Но все когда-нибудь кончается. После всевозможных проволочек, уже с разряженным ружьем и спрятанным в рюкзак фотоаппаратом, мы все-таки доезжаем до леса. Наш «ПАЗик» уверенно, но не быстро катится по красной дороге, которая почти не пылит после начавшихся уже дождей, вокруг мелькает довольно унылые плантации, вырубки и отдельные группы крупных деревьев — и только примерно через час автобус ныряет на небольшую лесную дорогу, катится по нескольким лужам и останавливается под сомкнутыми кронами уходящих куда-то вверх деревьев. Мы — в лесу. Первых шагов, увы, не помню. Очнулся, сидя на корточках и разглядывая торчащий из земли на несколько сантиметров росток, точнее — корешок, на который был нанизан коричнево-розовый «плодик», в свою очередь продолжающийся вверх тонким росточком и листочком. Мимо, теперь кажется — с вытаращенными глазами, ломились ботаники. На мой вопрос, не орхидея ли это, они скорчили две презрительные рожи и молча углубились в чашу. Это теперь я знаю, что передо мной было проросшее и начавшее укореняться семечко лаврового дерева — такие семена были обычны в том числе под гнездами птиц-носорогов, заботливо расселяющих их по лесу. Следующее чудо не заставило себя ждать: на досковидном корне, в 40–50 см над землей, была замечена группа носух — ярко окрашенных насекомых, слегка напоминающих бабочек со сложенными «плащом» крыльями и действительно длинным, загнутым вверх хоботком. Уверившись, что сказка началась, я начал пытаться наблюдать за птицами, и первым на меня вылетел бородастик — небольшая, с дрозда, но гораздо менее стройная птица с мощным клювом и короткими, но цеп-

кими лапами. Ничего особенно яркого — зеленые верх и низ, темноватые пестрины на груди и брюхе, витиеватый, но опять серо-зелено-белый узор на физиономии. Несколько прыжков по тонким веткам, две секунды на вертикальной поверхности ствола (бородастики — одно из семейств дятлообразных) — и отлет в лесную чашу. За ней последовала встреча со славкой-портнихой — крошечной птичкой на высоких ногах, с длинноватым изогнутым клювиком и торчащим вверх и вперед относительно длинным хвостом. При этом тельце ее настолько миниатюрно, что кажется, будто оно, в отличие от клюва, головы, ног и хвоста, еще не выросло. Поскакав несколько секунд по «чепыге» (термин не научный, но удачно применяемый для обозначения чащи из лиан, кустов, древесного подроста и другой мелкой и густой поросли на опушках и вдоль лесных дорог, т.е. там, куда попадает солнце), она затерялась в гуще листьев. Процесс, как говорится, пошел.

Идет он и по сей день. Не только описывать каждую встречу, но даже и просто перечислять все выезды, заезды, вылазки и экспедиции, я не буду. Попробую передать вам несколько главных впечатлений, возникших, утвердившихся и в конце концов впитавшихся в мое орнитологическое сознание после нескольких лет «чистого» лесного тропического времени. При этом я, конечно, буду многое пропускать, перескакивать от вопроса к вопросу, т.е. вести рассказ примерно в том непредсказуемом ритме, в котором проскакивают перед орнитологом наблюдения за лесными тропическими птицами. Важные открытия сменяются при этом то длительными антрактами (да-да, в тропическом лесу можно простоять 20 минут и не увидеть, а иногда — и не услышать ни одной птицы), то повторами, а чаще — слишком быстрыми проходами артистов через сцену, при которых ни смысла реплик, ни значения эпизода зрителю уловить не удастся.

Я говорил, что птицы хорошо видны? Но только не в толще крон, самые верхние из которых находятся где-то на высоте 50 метров (мы пока будем обсуждать равнинные тропические леса) и могут быть не видны с земли. Между ними, образующими первый, разреженный, ярус (рисунок 3), и поверхностью почвы (которой на самом деле нет — есть поверхность земли), располагается еще до трех ярусов, образованных сверху сомкнутым пологом второго яруса (тут кроны расположены уже «плечом к плечу»), пониже — разреженными деревьями третьего яруса, а еще ниже — тем, что мы бы назвали кустарником, а ботаники называют подростом. Нормальных кустарников в сомкнутом тропи-



Рисунок 3. Нечастая ситуация — хорошо видна крона дерева первого яруса. Равнинный лес на юге Вьетнама.

ческом лесу нет, их роль до некоторой степени выполняют молодые деревца, достигающие высоты 2–5 м и тоже, конечно, не сомкнутые. Нет и травяного яруса, если мы не вышли на поляну, образовавшуюся после падения крупного дерева и еще нескольких, упавших при этом, соседних деревьев. Нет в типичном случае и почвы — все, что упало, то довольно быстро пропало благодаря деятельности сапрофагов, и гумусового слоя не образуется. Правда, тут вмешивается правильное чередование сухого (декабрь–апрель) и дождливого (май–октябрь или ноябрь) сезонов. То, что падает на землю в период дождей, довольно быстро плесневеет, «поедается» грибами, вмывается в грунт, и там органику доедают черви. К концу дождливого сезона практически все подметено, можно ходить по чистому грунту (рисунок 4). Листья, плоды, сучья, падающие на дно тропического леса в сухой сезон, несколько месяцев остаются сухими, к февралю начинают шуршать под ногами, лес становится несколько более прозрачным из-за того, что на это время часть деревьев верхних ярусов сбрасывает листву, а насекомым в среднем живется хуже, чем при периодическом увлажнении, поэтому многие из них малоактивны, проводят это время в укрытиях или в виде неактивных фаз жизненного цикла. Если уж мы увлеклись сравнением влажного и дождливого сезонов, то можем еще вспомнить о том, что в конце сухого сезона обычно плодоносят многие деревья, имеющие обычно крупные плоды, — как будто для того, чтобы семена вскоре, после начала дождей, могли прорасти. Растения с мелкими плодами, в том числе съедобными для птиц, в основном сосредоточены на опушках и в лесных «окнах» (полянах), пик их плодоношения смещен на период активной вегетации и быстрого роста этих пионерных пород, т.е. на середину и конец влажного сезона. Мы, может быть, вспомним о

них, когда речь пойдет о питании птиц. А чтобы закончить с метеорологией, отметим, что зимой лишь немногим прохладнее, чем летом: на юге Вьетнама мой личный рекорд холода составил $+18^{\circ}\text{C}$ ночью в середине января. Про температуру на солнце лучше не вспоминать, тем более что почти никто из птиц старается на такие места в середине дня не выскакивать, а для ориентировки можно отметить, что температура под пологом леса сохраняется почти как в оранжерее — от $+24^{\circ}\text{C}$ ночью до $+27^{\circ}\text{C}$ днем (при почти постоянно высокой влажности!). А вот там, где полог нарушен, температура поверхности земли днем начинает сильно расти — до $+30^{\circ}\text{C}$ и выше, в зависимости от степени нарушенности полога. Так что в целом сомкнутый высокоствольный многоярусный лес работает как сохраняющий постоянную температуру и влажность агрегат.

Раз уж мы увлеклись описанием леса, то вспомним и о таком привычном по книгам, но крайне проблематичном для реально работающих в нем ботаников свойстве, как огромное разнообразие видов деревьев при в целом небольшом числе растений каждого вида на конкретной лесной площади. Утверждение о том, что легче найти растения 50 или 100 разных видов, чем 50 или 100 растений одного вида, оказывается вполне справедливым. Добавляет ботаникам головной боли и то, что, стоя на земле, часто трудно или даже невозможно рассмотреть, какие же листья растут на осматриваемом дереве. И уж совсем неприятно определять деревья по цветам, поскольку для некоторых приходится дожидаться периода цветения по два-три года, не говоря уже о том, что при таких погодных условиях разные растения даже одного вида могут цвести почти в любое время. Да, цветы, плоды и листья могут лежать у вас под ногами — но надо еще определить, с какого из 10–15 возможных деревьев они упали. Так что ботаник с биноклем — вполне нормальная картина. Или с ружьем: он осторожно подкрадывается к дереву и ловко отстреливает нужную ветку. Удача? Нет, ветка застревает далеко наверху ...



Рисунок 4. Под пологом тропического леса, юг Вьетнама.

Итак, к птицам, а то слушатели в задних рядах уже задремали. Мы остановились на том, что они плохо видны в тропическом лесу. Этому отчасти способствует то, что они, оказывается, далеко не так ярко окрашены, как нам бы хотелось и как казалось по прочитанным в детстве книгам. Многие виды выглядят совершенно невзрачно, другие, как те же бородастики или листовки (небольшое семейство воробьиных птиц, эндемичное для Индо-Малайской зоогеографической области), в целом окрашены в зеленые тона, но на «лице» каждый вид имеет собственный яркий узор. Немало птиц с расчленяющей окраской — птица-носорог *Anthracoceros albirostris* хотя и крупнее ворона, но полностью теряется в солнечных бликах, дробящихся в кронах деревьев, за счет сложно чередующихся участков черного и белого оперения. Вполне хорошо «прячутся» и те птицы, которые окрашены в яркие, но тоже занимающие лишь отдельные части тела тона (например, трогоны). Дополнительно помогает им скрываться от наблюдателей то, что многие виды ведут малоактивную жизнь: не занимаются деятельным обследованием крон в поисках корма, а ждут, пока он сам на них налетит, т.е. охотятся из засады. Богатство и разнообразие членистоногих, в первую очередь — насекомых и пауков, в тропическом лесу превосходит все наши самые смелые фантазии, так что «запасы» летающих или активно лазающих насекомых оказываются достаточными для того, чтобы не гоняться за ними, а поджидать, когда они окажутся рядом с охотником. Так охотятся многие лесные птицы, в том числе довольно крупные (кукушка *Phaeocephalus tristis*), иногда «тяжеловесные» (рогоклювы — представители семейства примитивных воробьинообразных птиц *Eurylaimidae*) или, напротив, «легкие на подъем» крупные мухоловы (трогоны, дронго). Наконец, даже крича, многие лесные птицы остаются незаметными, поскольку в тропическом лесу то ли за счет особого тембра голосов многих видов, то ли за счет сложно организованного пространства трудно определить источник звука, даже если он находится совсем рядом. Но, конечно, в целом малую заметность птиц тропического леса я склонен объяснять общим обилием хищников. Можно сказать и по-другому. Среда настолько насыщена разнообразными соседями, что, во-первых, многие из них ориентируются на добычу других животных, и значит — опасны, а во-вторых — никогда не знаешь, кто, с какой стороны и каким способом на тебя охотится (более того — неизвестно даже, кто тебя сейчас видит). Хищники такие разные, что универсальных способов побега или защиты от них

нет. Остается одно — как можно меньше попадаться им на глаза. Так что не от орнитологов постоянно стараются скрыться лесные птицы, а от всех хищников сразу.

Эти способности особенно рельефно проявляются около гнезд. Опять же — как будто для нас — птицы, даже находясь неподалеку от гнезда с яйцами или птенцами, никак не проявляют ни беспокойства, ни повышенной активности (между прочим — тепло, можно и не согревать яйца или птенцов в течение долгого времени). Порой такое «повышенное спокойствие» как раз может свидетельствовать о том, что тут что-то неладно. Птица то чешется, то почти дремлет, а сама в это время следит за крупным и не очень привычным ей объектом с биноклем и рюкзаком, «окопавшемся» в опасной близости от гнезда. Конечно, если вы подошли слишком близко, то она просто скроется и будет наблюдать за вами издали, т.е. тайно от вас. Если вы уже знаете, где расположено гнездо, то иногда даже не удается определить, чье оно. Если вы рядом — хозяйева не приближаются, если отошли подальше — вам не видно гнезда. Есть, конечно, и другие варианты поведения, но описанный случай — вполне типичный.

Не удержусь от соблазна рассказать об одном варианте поведения у гнезда, прекрасно иллюстрирующем отточенность приемов по его сохранению от врагов. Речь пойдет об одном из видов лесных бьюль-бюлей — *Alophoxus ochraceus* (рисунок 5а). Это птицы средних для воробьиных размеров, покрупнее овсянки и поменьше скворца. Они могут считаться примером общей повышенной «заметности», несколько нетипичной, как мы уже понимаем, для птиц тропического леса. Они практически весь год проводят в парах, часто сопровождаемых уже подросшими птенцами, регулярно обращают на себя внимание резкими трескучими криками и вскоре приобретают у наблюдателя репутацию типичнейших элементов лесного подпологового пространства (третий и четвертый растительный ярус, 2–10 м от земли). Как и другие фруктоядные птицы (см. ниже), они часто посещают кроны деревьев с некрупными плодами, где тоже хорошо заметны за счет частых коротких перелетов и регулярных переключек. Однако, наблюдая за их поведением у гнезда, я отметил любопытные штуки, известные мне по литературе для центральноамериканских эуфоний (мелких конусоклювых воробьиных птичек). Начнем с момента, когда самка насиживает кладку. В это время, как и практически у любых «нормальных» птиц, самец находится хотя и неподалеку, но все-таки не рядом с гнездом, и ведет себя так же тихо, как самка. Наконец наступает момент,

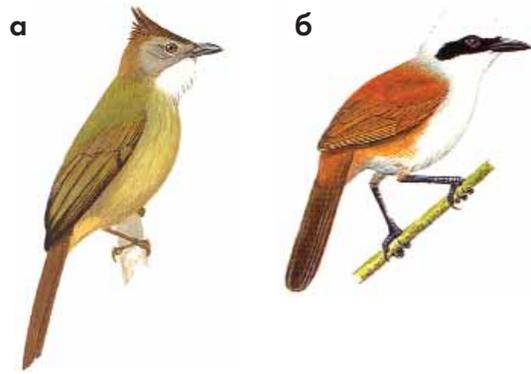


Рисунок 5. (а) — Бюль-бюль *Alophoxus ochraceus*; (б) — белохохлая тимелия *Carrulax leucolophus*, Вьетнам. Из Robson, 2000.

когда самке пора подкрепиться, и она тихо выскальзывает из гнезда, отлетает на 15–20 м, а уже там начинает активно переключаться с самцом и приступает к кормежке — чаще всего летит к ближайшему фруктовому дереву (отметим, что ситуация, при которой корм не надо искать и за ним не надо гоняться, конечно достаточно выгодна для птицы, которая заинтересована в скорейшем возвращении в гнездо если не для обогрева кладки, то для ее защиты). Сфокусируем свое внимание на возвращении самки в гнездо: пара, нарочито громко вопя, перемещается в целом в сторону гнезда, но при этом не прямо, а галсами. Потом источник криков начинает несколько удаляться от гнезда, но я-то вижу, что самка, тихо перелетая, приближается ко мне и уже усаживается в гнездо. А самец издает еще несколько особо громких криков и тоже смолкает. Так что наблюдатель, а в типовом случае — хищник, ориентируясь на крики самца, искусно отвлекается от места его настоящего расположения. Общая крикливость в «обычной жизни» контрастирует с полной молчаливостью и повышенной скрытностью самки у гнезда, дополнительно маскируемыми отвлекающими маневрами самца.

В целом, как уже было сказано, для орнитолога, воспитанного в умеренных широтах, повышенная до предела скрытность даже относительно крупных тропических лесных птиц около гнезд оказывается большой новостью и требует некоторой привычки. Нелегко перестраивать и другие стереотипы, сложившиеся вне тропической зоны. По-другому выглядит сезонность в жизни пернатых. Да, осенью появляются, а весной исчезают наши, палеарктические, мигранты — деревенские ласточки, синие соловьи, пеночки-зарнички или ширококлювые мухоловки. Кстати, немногие из них держатся в это время в лесу — гораздо привычнее видеть мигрантов на

опушках, в небольших рощах, на плантациях и в придорожной чепыге, т.е. в биотопах, именуемых вторичными. Не знаю почему, но сомкнутый, высокоствольный, сложно организованный лес их не привлекает — возможно, потому, что заметно отличается по каким-то параметрам (структура, освещенность, иное распределение кормов?) от тех биотопов, в которых они гнездятся. Впрочем, и тут есть интересные моменты, например зимняя территориальность. То, что наши дальневосточные синие соловьи занимают на зиму определенные территории, недавно было отмечено в Малайзии. Но читать про это — одно, а столкнуться с этим феноменом самому — все-таки нечто другое. Шутка ли — в начале марта 1991 г. я поймал в паутинную сетку (один из обычных методов кольцевания, мечения и изучения птиц) именно того самца синего соловья, которого окольцевал прошлой зимой не только в том же лесу Ма Да около нашей полевой станции, но и вынимал я его тогда из той же самой сетки! Птица летом посетила Якутию или Кунашир и вернулась на юг Вьетнама, чтобы быть вновь пойманной не далее чем в 3 м от места прошлогодней поимки. Про то, что птицы умеют возвращаться в уже освоенные ими места, мы, по итогам возвратов птиц к местам гнездования, знаем хорошо. Но они могут использовать свои навигационные способности и на обратном пути, при поиске полюбившихся и хорошо освоенных зимних квартир.

Большинство местных птиц в равнинных тропических лесах должны называться настоящими резидентами, т.е. оседлыми видами, что тоже подтверждается кольцеванием и последующими отловами меченых птиц. Например, одна мелкая тимелия (семейство Timaliidae; максимальное разнообразие — в горах Юго-Восточной Азии), весьма похожая на небольшую славку и относящаяся к виду *Malacopteron cinereum* (рисунок 6), за 4 года была поймана около того же стационара 5 раз. Живя постоянно на одной территории, птицы, очевидно, очень хорошо ее изучают, запоминают и используют «исхоженную» ими вдоль и поперек «квартиру» наиболее эффективно. Представьте себя на их месте, и станет вполне очевидным, что вы будете хорошо знать, где лучше укрыться от дождя, где легче собирать тот или иной корм, где тут наиболее удобное место для размещения гнезда. Я уверен (хотя не очень понимаю, как это доказать тем, кто в таких местах не бывал), что многие обитатели тропического леса — настоящие домоседы, с закрытыми глазами ориентирующиеся в сложном для нас трехмерном пространстве тропического леса, поскольку знают на своей территории каждый сантиметр.



Рисунок 6. Окольцованная стандартным алюминиевым кольцом и помеченная индивидуально синим пластиковым колечком тимелия *Malacopteron cinereum*; юг Вьетнама, заповедник Кат Тиен, декабрь 2002 г.

Плавное течение нашей лекции регулярно уводит нас то в одну, то в другую сторону, но я помню, что речь шла о сезонности в жизни птиц. Мы хорошо знаем, что весна, т.е. начало периода гнездования птиц, в наших широтах — самое шумное время. Почти все виды птиц, приступая к размножению, активно поют: самцы рекламируют себя и свои территории в расчете на привлечение самок, а заодно предупреждают соседей о том, что территория занята, одновременно устанавливая ее границы. Тропический же лес даже по утрам может быть неожиданно тихим и как будто немного опустевшим. И дело не только в желании птиц не обнаруживать себя, но и в совершенно (нет, лучше «заметно») отличающейся периодичности сезонных явлений. Чем ближе к экватору и чем более равнинной будет посещаемая вами местность, тем более выровненными в годовом цикле будут температурные условия, так что ритм годовым изменениям в жизни птиц задает смена дождевого и сухого сезонов. Казалось бы, все достаточно просто — один сезон удобен для размножения одних видов, другой — других. И отчасти это справедливо: каждая группа птиц относится к этим факторам по-своему, и в целом получается, что, например, мухоловки в равнинных лесах гнездятся в основном в мае-июле, «по дождю», а некоторые тимелии, наоборот, только в сухой сезон. Но постепенно ситуация стала выглядеть все более запутанной: гнездование у бьюль-бюля *Alophoixus ochraceus*, которое было отмечено уже в декабре и как будто совпадало с началом сухого сезона, оказалось растянутым до июля (разгар дождевого сезона). Белохохлые тимелии *Garrulax leucolophus* (рисунок 5б) — птицы размером с крупного дрозда, самые стайные птицы леса Ма Да и одни из самых заметных (из-за периодических хоровых выступлений сразу нескольких

птиц из группы), после находки четырех гнезд (рисунок 7) в мае и июне были записаны в типичных приверженцев гнездования в дождливый сезон. Скопившийся на земле за время сухого сезона опад к этому моменту увлажняется, населяющие этот опад и посещающие его обитатели других стаций из числа членистоногих оживают, и, казалось бы, из-за повышенного обилия корма эти в основном наземные птицы получают хорошую кормовую базу для выращивания потомства. Отмечу, что в разнообразии событий, происходящих с орнитологом в тропическом лесу ему, как и любому зоологу и ботанику, хочется нащупать хотя бы несколько устойчивых закономерностей. Выявив такие «островки стабильности и понимания ситуации», можно сопоставлять с ними другие данные и как-то ориентироваться в навалившемся на тебя разнообразии. И только со временем, когда один такой островок за другим заливает приливом из новых и новых фактов, не укладывающихся в предыдущую схему, начинаешь понимать, что реальная картина все-таки сложнее, чем предполагалось. Вот и белохохлые тимелии буквально в последний мой визит на юг Вьетнама подложили нам с более молодым коллегой очередную «свинью». Паша должен был (и успешно выполнил этот план) заниматься частной жизнью нескольких видов тимелий равнинного леса, для чего в первую очередь следовало найти как можно больше гнезд. В марте, пока мы недолгое время работали вместе, эти поиски были нашим главным делом. С одними видами это удалось лучше, с другими хуже, а белохохлые тимелии были отложены на май-июнь, когда, по моему примерно трехлетнему опыту, у них должны были появиться гнезда. Я даже показывал Паше небольшую и, как показалось, недостроенную или, скорее, несколько разрушенную за несколько месяцев после окончания гнездового периода постройку на невысоком дереве (примерно в 5 м



Рисунок 7. Гнездо белохохлой тимелии с кладкой, отложенной двумя самками; юг Вьетнама, лес Ма Да, май 1994 г.

над землей), сопровождая показ рассказом о сроках гнездования белохохлых тимелий и о том, что гнездо по размерам и конструкции могло бы принадлежать именно им. Слегка посожалев о том, что гнездо попало нам не вовремя, мы сконцентрировались на поисках гнезд уже упоминавшихся мелких тимелий, малакоптеронов, а в середине марта (разгар сухого сезона) Паша обнаружил, что из «нашего» гнезда уже вылетают птенцы белохохлых тимелий, которые и не думали ждать начала сухого сезона. Обнаружение еще нескольких подобных фокусов у других видов заставило отказаться от представлений о четких сезонных закономерностях в сроках размножения лесных птиц и прийти к простой мысли о том, что каждый вид заслуживает сначала детального изучения, а уж потом — вписывания в какую-нибудь гипотезу или теорию. Тем более, что и внутри отдельного вида разброс сроков гнездования может быть очень существенным. Голуби, например, вовсе гнездятся круглый год, а нектарницы ведут себя еще более замысловато. Эти «дублиеры» колибри в тропическом поясе Старого Света тоже в основном зависят от такого ресурса, как нектар, в связи с чем птицы одного и того же вида успевают гнездиться дважды в году, в периоды наиболее активного цветения, при переходе от дождливого сезона к сухому и при обратной смене климата, т.е. весной и осенью. А если заняться вопросом детально, да еще с индивидуальным мечением птиц, которых тогда можно будет узнавать «по именам» на расстоянии, то результаты будут еще более странными, а может быть и совсем неожиданными. А как связано с гнездованием пение? Увы, только некоторые виды имеют четко выраженные сезоны повышенной вокальной активности. Большинство оседлых видов делит территории и образует пары без явно выраженного периода пения. Есть варианты: почти совсем не петь (знакомство самцов и самок происходит за счет визуальных контактов, а как они друг друга находят — мы знаем плохо; может быть они знакомы «с детства?»); петь редко и неактивно; петь, наоборот, почти постоянно — видимо, объявляя соседям о том, что территория занята; петь активно, но очень недолго и только в строго определенный период суток, как будто используя известный сородичам звуковой канал («выходим на связь в 5 ч 45 мин»). Так что случай, когда на неоднократно посещавшемся вами участке, где данный вид не пел и не был замечен, вдруг оказывается гнездо с подросшими птенцами, — не такая уж большая редкость.

Пытаясь понять то, как же живут птицы в тропическом лесу, мы не можем обойти стороной вопрос об их трофических (пищевых) связях.

Если размножение конкретных видов все-таки происходит непостоянно, а у конкретных пар — тем более, то питаются птицы почти непрерывно. «Мы видим маленьких совят, когда не спят — они едят...» Это в гораздо большей степени относится к воробьиным птицам, особенно — к птицам мелких размеров. Как известно, уровень обмена у птиц — самый высокий среди современных животных, можно даже сказать — предельно высокий: в полете они нагреваются до +44 °С, выше уже некуда — начнут сворачиваться белки. В целом, конечно, я несколько сгущаю краски. Например, птицы, которые кормятся плодами, очень быстро набирают достаточное число килокалорий и получают дополнительные «запасы» свободного времени. Окружающая температура близка к оптимуму, поэтому не надо тратить килокалории на самообогрев. Далее, птицы в тропическом лесу летают достаточно мало, обычно из кроны в крону, так что затраты энергии на полет (самое энергетически емкое действие — оно примерно в 10 раз «дороже», чем просто сидение на ветке) в среднем не столь высоки. И, наконец, периоды активной кормежки приурочены к наименее жарким утренним и вечерним часам, причем пик утренней активности заметно выше, поскольку птицы с ночи оголодали и стараются максимально быстро наесться. К тому же в дневное время и под пологом леса становится достаточно жарко, так что нередко удается видеть птиц с открытым клювом, — не имея потовых желез, они вынуждены охлаждаться в том числе и таким способом. Так что на самом деле основные наблюдения за птицами в тропическом лесу проводятся в утренние и вечерние часы, а днем и у пернатых, и у орнитологов наступает сиеста. Впрочем, если хватает терпения побродить с биноклем и в это время, то нет-нет, да и заметишь что-нибудь интересное. Просто частота таких регистраций в дневные часы сильно снижается. Сказанное, впрочем, не относится к самым мелким птицам — нектарницам (семейство Nectarinidae; рисунок 8) и цветоедам (семейство Dicaeidae; рисунок 9). Возможно, эти семейства даже родственны друг другу, хотя внешне их сходство сводится лишь к яркой, «конфетной», окраске и мелким размерам (масса всех цветоедов и большинства нектарниц не превосходит 7–8 г). В отличие от нектарниц, имеющих классический для нектароядных птиц длинный и в разной степени изогнутый клюв, цветоеды имеют коротенькие клювики различной толщины — от чуть утолщенного шильца у пьющих нектар до почти вьюркового, короткого и толстого (высокого) — у фруктоядных видов, выщипывающих мякоть из плодов фикусов.

И те, и другие продолжают активно носиться по кронам и в разгар жары, поскольку, как и бурозубки, имеют из-за крошечных размеров относительно очень высокий расход энергии и просто не могут долго обходиться без корма. С точки зрения биоэнергетики, эти крошки должны еще и перегреваться при полете. Судя по имеющимся на сегодня данным, спасает их от перегрева биохимический механизм, специально остужающий эти микроскопические летательные аппараты. Примечательно, что механизм этот требует большого расхода воды, — и мы видим, что как раз эти птицы кормятся жидким кормом: нектаром или полужидким содержимым мякоти мелких плодиков. Как это часто бывает, и не скажешь, какая особенность развивалась раньше и способствовала развитию другой, комплементарной. Очевидно, стоит говорить о развитии всего комплекса сцепленных признаков, а уж как такие комплексы формируются — это пока загадка, одна из самых интересных в биологии.

Если же попытаться окинуть мысленным взором все разнообразие трофических гильдий

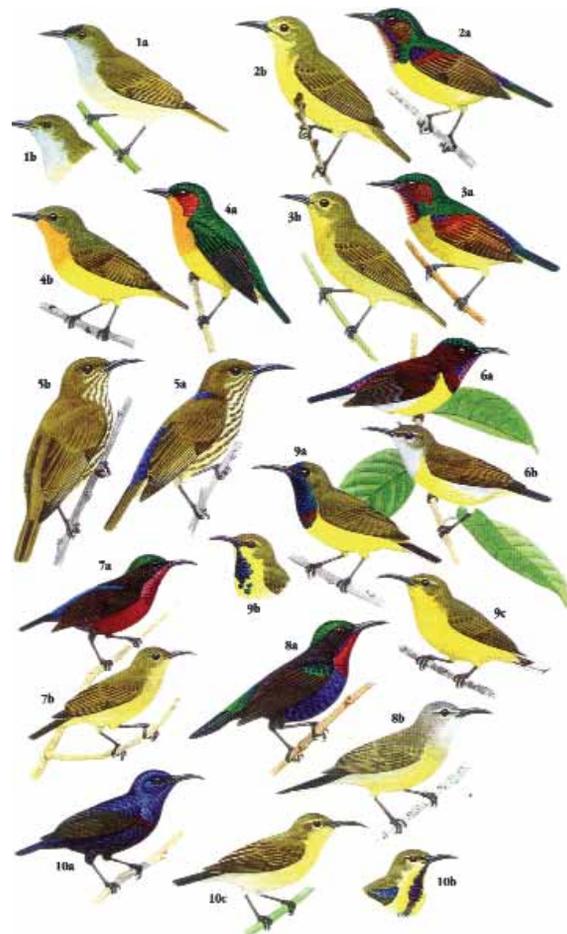


Рисунок 8. Некоторые нектарницы (сем. Nectarinidae) Вьетнама. Из Robson, 2000.



Рисунок 9. Цветоеды (сем. Dicaeidae) Вьетнама. Из Robson, 2000.

птиц, населяющих равнинные леса юга Вьетнама, то картина получается следующей. Начнем с соотношения потребителей различных кормовых ресурсов. Типы этих ресурсов мы разделим на мелкий животный корм (в первую очередь членистоногие — насекомые и пауки, плюс некоторое количество других наземных и древесных беспозвоночных — моллюсков, дождевых червей, многоножек и др.); мякоть плодов (именно мякоть, без косточек и семян); нектар; позвоночные животные (несколько формальное выделение — для большинства хищников разница между крупным насекомым и лягушонком или ящерицей совершенно не принципиальна); семена (на этот раз именно самое ценное и самое защищенное в растительной пище, т.е. эндосперм); вегетативные части растений (редкость, но все-таки есть единичные случаи поедания свежих листиков или корневищ); цветы (тоже крайне редкий вариант, скорее экзотический пример, чем реальное устойчивое потребление этого ресурса). Три последних варианта используются буквально несколькими видами

птиц, никогда не образуют заметной доли в их рационе (может быть, за исключением корневищ, которые могут поедать фазановые птицы), и обсуждать их мне здесь не хочется. Так что главные ресурсы, на долю которых приходится 99% кормовых объектов тропических лесных птиц, — это мелкие беспозвоночные, мелкие и средних размеров позвоночные, мякоть плодов и нектар.

Членистоногих даже не очень интересно обсуждать. Они отмечены в рационе всех лесных птиц, и у подавляющего большинства из них составляют весь рацион или его абсолютно большую часть. Скорее интересно поговорить о тех немногих представителях пернатых, которые ориентированы на насекомых в меньшей степени, чем на другие объекты. Крупные хищники, в число которых в тропическом лесу, помимо собственно дневных хищных птиц (это почти исключительно представители семейства ястребиных) и сов, входят птицы-носороги, крупные кукушки из родов *Centropus* и *Phaenicophaeus* (1 вид *Ph. tristis*), опушечный вид бенгальская сизоворонка *Coracias benghalensis*, а также несколько видов врановых птиц, более всего напоминающих сорок и соек, поедают немало насекомых и других беспозвоночных. Некоторые некрупные совы и дневные хищники должны считаться практически полностью насекомоядными видами. Однако в поведении перечисленных хищников присутствует и такой элемент, как целенаправленная охота за относительно крупными объектами, вылавливание больных или поврежденных животных, специализированная охота на крупную относительно их собственных размеров добычу, разорение гнезд и т.п. Также почти полностью отказываются от потребления членистоногих такие специализированные фруктояды (поедатели мякоти плодов), как некоторые группы воровьиных птиц — голуби и, в меньшей степени, бородастики и птицы-носороги, а из воровьиных — некоторые скворцы (*Gracula religiosa*, *Ampelopsis coronatus*), цветоеды (*Dicaeun agile*, *D. chrysorrheum*) и, в еще меньшей степени, некоторые бюль-бюли и ирена (*Irena puella*). Но и перечисленные птицы нет-нет, да и «прихватят» некоторое количество животных кормов, особенно в период кормления птенцов. Удивляет не это, а то, что в их рационе членистоногие играют не более важную роль, чем другие корма. Пожалуй, рекордсмены в этом отношении — зеленые голуби из рода *Treron* и более крупные лесные голуби из рода *Ducula*. В их рационе животные корма действительно играют крайне незначительную роль, приближающуюся к нулевой. Наконец, среди нектароядных птиц, даже имеющих явные морфологические черты

специализированных потребителей этого жидкого, богатого сахаром растительного корма, тоже нет видов, отказавшихся от питания членистоногими. Можно сделать вывод, что белковая пища нужна всем — не только о килокалориях, богато представленными в нектаре и мякоти плодов, заботятся пернатые, но и о специфических аминокислотах, которые получают из животной пищи.

Да, тропический лес должен, просто обязан быть заполнен членистоногими, что и демонстрируют все более многочисленные работы по экологии тропических насекомых. Потрясающее разнообразие видов (несколько тысяч видов жуков на одном дереве — неплохо?!), заполнение всего пространства леса, огромная биомасса — все это, конечно, «на руку» птицам, способным, как никто другой, кроме летучих мышей, осваивать все пространство леса. Но вот интересные данные: один француз подсчитал частоту успешных схватываний корма насекомоядными птицами, кормящимися на поверхности субстрата (кроны деревьев) во Французской Гвиане, т.е. в типичных тропиках Нового Света, и во Франции в период максимального обилия там таких насекомых (т.е. в гнездовой период). И что же? В тропическом лесу эффективность сбора такого корма мелкими насекомоядными птицами оказалась в 10 раз ниже, чем во Франции! Поскольку результат его ошеломил, он несколько раз проверял и перепроверял его — результат не изменился. Остается признать, что условия сбора корма для тропических лесных насекомоядных птиц отнюдь не такие комфортные, как в умеренных широтах. Не погружаясь в длительный анализ литературы и сложные выкладки, отмечу, что главное объяснение состоит, на мой взгляд, в следующем: в тропическом лесу с его относительно стабильными климатическими условиями и огромным разнообразием микробиотопов, используемых насекомыми, вполне естественно видеть огромное разнообразие видов этих животных. В результате сообщество насекомых тропического леса формирует свою собственную сложную экологическую пирамиду, в которой, благодаря очень широкому основанию, достаточно много этажей — а значит, на огромное число растительных видов приходится соответствующее и тоже немалое число хищников. В этом микромире с плотно упакованными экологическими нишами главный вклад в контроль численности вносят не абиотические (как в умеренных широтах и тем более на Крайнем Севере), а биотические факторы. Проще говоря, разнообразие и обилие хищников приведено в хорошее соответствие с разнообразием и численностью их жертв, сообщество насекомых (с включением в него многочислен-

ных и в основном хищных пауков) регулирует само себя, и «лишнего» корма, на который могли бы позариться другие потребители, остается относительно (относительно!) мало. А ведь, помимо птиц, свой вклад в преследование бедных крошек вносят и другие потребители — многочисленные ящерицы и змеи, для которых доступны вся толща крон и, разумеется, поверхность грунта, на земле к ним добавляются хищные диплоподы, некоторое участие в вакханалии принимают летучие мыши, да и наземные млекопитающие всегда готовы полакомиться членистоногими (впрочем, именно насекомоядных млекопитающих в равнинных лесах маловато). Так что вклад птиц в потребление данного ресурса может оцениваться примерно в десятые доли процента. Им достаются крошки со стола членистоногих-хищников, и эти крошки еще надо поискать.

Я твердо придерживаюсь выбранной линии и не собираюсь окончательно запутывать вас еще и рассуждениями о тропических горных лесах, но при обсуждении данного пункта должен отступить от этого правила. Только для того, чтобы подчеркнуть — в равнинных лесах главным из хищников, контролирующих численность «мирных» насекомых, являются, без всяких сомнений, муравьи. Они обильны, разнообразны, на каждом дереве представлены ансамблями из нескольких десятков видов (без преувеличения, в равнинных тропических лесах каждое дерево — это муравейник), причем ансамбли эти имеют вид сложных иерархических систем. Пишут о доминирующих видах и о группах видов, представляющих собой их сателлитов, причем у каждого из видов-доминантов имеется своя «свита». И вот, сильно упрощая реальную картину, мы при подъеме в горы видим, что в какой-то «момент Ч» климатические условия, постепенно меняясь, конфигурируются в неприятное для муравьев соотношение «влажность × холод». Выше этого барьера начинается почти катастрофическое снижение разнообразия, обилия и контролирующей роли муравьев в сообществе насекомых. Зато «расцветают» такие группы, как двукрылые, жуки и ряд других. У них начинаются сезонные колебания численности (зимой им тоже прохладно и мокро), но в целом ситуация, в том числе и для птиц, заметно меняется. Однако разбираться в ней мы не станем, а еще раз повторим — в равнинных лесах членистоногие для птиц отнюдь не являются легкой добычей, что и показали итоги исследования, с упоминания которых я начал этот раздел.

Насекомоядные птицы вынуждены ориентироваться либо на описанное выше ожидание момента, когда на них наконец-то налетит или

набежит достойная их ожиданий добыча (особенно яркий пример таких хищников-засадчиков — рогоклювы), либо на активный поиск и ловкую поимку или ловкое изъятие из субстрата мелкой живности. Упоминание о том, что эта добыча старается всеми силами затруднить хищникам свое обнаружение и схватывание, звучит вполне банально. За ними еще надо побегать. В результате насекомоядные птицы должны быть признаны настоящими, высокопрофессиональными, т.е. высокоспециализированными, мастерами по поиску и добыче мелких жертв. И добывать их, в отличие от ситуации, в которой находятся крупные дневные хищные птицы, надо не по 3–4 в день, а по 10–20 и более в час, т.е. почти бесперебойно. Естественным эволюционным ответом на такое положение вещей становятся специализация отдельных видов и групп насекомоядных в направлении виртуозного использования отдельных кормовых (кормодобывающих) стратегий. Одни подкарауливают, другие без устали осматривают субстрат, третьи вскрывают укрытия членистоногих, четвертые за счет мелких размеров зависают у кончиков веточек и листьев или даже могут цепляться за них на 1–2 секунды, пятые лазают по стволам, шестые долбят кору и землю, и так далее. Логичным выглядит также объединение хищников разных специальностей в смешанные стаи насекомоядных птиц (показательно, что фруктоядные птицы в такие стаи не объединяются). Я с большим усилием удержусь от того, чтобы не начать подробно обсуждать всякие вкусные вещи, связанные с поведением птиц в таких стайках, — скажу только, что это действительно взаимовыгодное объединение, базирующееся не только на том, что птицы разных видов не мешают, а часто помогают друг другу добывать корм, но еще и на том, что это постоянно действующий центр обмена информацией о хищниках, о кормных местах, о направлении перемещений в конкретный момент времени. Я не сказал о том, что смешанной стайкой называется группа птиц разных видов, перемещающихся на относительно близком друг от друга расстоянии по одному и тому же маршруту (хочется сказать — по согласованному маршруту) относительно долгое время. Определение не абсолютно жесткое, но тот, кто видел осенью и зимой смешанные стаи синиц нескольких видов, к которым присоединяются поползны, пищухи, королики, ополовники и дятлы, меня поймут.

Воспев профессионализм насекомоядных птиц, ориентированных на различные способы добычи своих мелких жертв, я теперь должен компенсировать внимание к специализации вниманием, наоборот, — к всеядности. Уже

говорилось о том, что в лесу полно самых разных хищников и что, выражаясь более научно, экологические ниши здесь очень плотно упакованы. А это значит, что практически ни одно из животных (не буду спекулировать по поводу растений и грибов) не может себе позволить «поднять голову», т.е. сильно размножиться и заметно увеличить свою численность. Как только тот или иной ресурс оказывается хоть немного более доступным и обильным, чем другие, — на нем тут же фокусируется повышенное внимание хищников (= потребителей). Как с грибниками: на рынок несут много белых — и грибники почти бессознательно ориентируются на те места, где должны расти эти грибы. Соседи волокут из лесу маслята — и мы бежим на прогретую сосновую опушку. В результате сообщество хищников совместно, большой командой, составленной из специалистов по тем или иным охотничьим приемам, держит под контролем разнообразные жертвы, быстро «срезая» начинающие выделяться над местностью островки обилия того или иного ресурса.

Если бы у нас было время и место еще на пару лекций, то мы могли бы обсудить вопрос о том, что первобытный человек, возможно вышедший когда-то из тропического леса или по крайней мере, населявший такие леса в один из периодов своей истории, был по своей сути всеядным собирателем. Он, как и по сей час действуют некоторые племена, перемещался по лесу небольшими стайками, которые то собирали плоды, то копали сочные корневища, то разоряли птичьи гнезда, то ловили рыбу, покушались на гнезда пчел, прочесывали отмели и мелководья, прихватывали попавшихся по дороге ящериц и змей и, наконец, охотились на что-нибудь более существенное. И становились при этом все более сообразительными, как это происходит с современными собирателями различного корма из числа птиц — воронами и чайками, ведь собирательство — это готовность действовать не по шаблону, а каждую секунду быть готовым к решению совершенно новой задачи, действовать, как говорят, по обстановке. Возвращаясь к птицам тропического леса, подчеркну, что само богатство видов, населяющих эти сложные экосистемы, «работает» против появления доступных, «легких», ресурсов, и прямо-таки подталкивает птиц к тому, чтобы становиться всеядными.

В итоге мы видим, что на фоне всеобщего увлечения потреблением насекомых многие птицы (до трети списочного состава) в различной степени разнообразят меню мякотью плодов, примерно одна десятая от общего числа видов в данном орнитокомплексе (речь по-прежнему идет о равнинных лесах юга Вьетнама)

потребляет нектар, и еще до 15% от общего числа видов составляют птицы, использующие более двух типов кормов — беспозвоночных, позвоночных и плоды, иногда с дополнением семян и вегетативных частей растений, а в других случаях — членистоногих, мякоть плодов и нектар. Идея всеядности, так сказать, витает в воздухе (рисунок 10).

Завершая «пищевую» тему, надо все-таки напомнить и о том, что такое феномен фруктоядности. Под фруктоядностью понимается ситуация, при которой птицы, поедая плоды, переваривают только их перикарп, оставляя семена неповрежденными. Такой характер питания и взаимодействия кормовых растений с потребителями их плодов приводит к ряду интересных последствий. Во-первых, он считается полезным для растений в том отношении, что фруктоядные птицы оказываются разносчиками семян, которые в противном случае все или практически все оказывались бы под кроной материнского дерева. Такой разнос уже сам по себе имеет положительный эффект — молодые деревца не конкурируют с родительским деревом за свет и питательные вещества (как бы им это удалось?), а будучи унесенными, могут колонизировать новые, в том числе более удобные для прорастания, места (рисунок 11). В нескольких работах удалось показать и прямой положительный эффект от прохождения семян через пищеварительную систему птиц: за счет некоторого разрушения оболочек такие семена лучше прорастали. Но и без такой прямой помощи со стороны птиц косвенная эволюционная выгода от разноса семян привела к образованию если не симбиоза, то по крайней мере положительной обратной связи между фруктоядными птицами и растениями, плоды которых они поедают. Получается, что если членистоногие «кровно заинтересованы» в том, чтобы скрываться от потребителей, то у растений, напротив, постепенно получают преимущества те,



Рисунок 10. Буробокая белоглазка *Zosterops erythropleura* — представитель семейства белоглазковых (*Zosteropidae*), потребляющих и членистоногих, и мякоть плодов, и нектар.



Рисунок 11. Молодое растение из рода *Trema* (сем. *Ulmaceae*), имеющее мелкие, съедобные для птиц плоды, выросло на пне на недавней вырубке; центральная часть Вьетнама, природный район Ке Банг, июль 1999 г.

кто в наиболее удобной форме «предлагает» данный кормовой ресурс крылатым потребителям. Ягоды для удобства проглатывания должны быть округлыми или овальными и полностью или совсем гладкими, должны иметь мягкие и довольно тонкие оболочки, лучше, чтобы их было относительно удобно собирать (неплохо, например, иметь не очень прочное крепление плодика к черешку) и искать («покрасим холодильник в красный цвет»). Чем мельче плоды, тем шире круг их потребителей, однако в таком случае и семена имеют малые запасы питательных веществ, а это уже минус при прорастании. Тогда начинают бороться две тенденции — семена лучше укрупнять, а вот питательную (а может быть — кто знает — и очень вкусную, аттрактивно действующую на птиц) оболочку лучше уменьшить. Пусть птицы стараются склевать как можно больше плодов в единицу времени и таким образом будут увеличивать вероятность попадания хотя бы немногих семян в оптимальные станции. И, представьте, эти правила работают. Подавляющее большинство съедобных для птиц растений имеет как раз такие плоды, какие мы только что обсуждали (рисунок 12). Есть, правда, и второй вариант, и тоже очень эффективный и показательный. По всему миру, во всех тропиках широко распространены разнообразные виды фикусов, знакомых некоторым из нас в виде инжира. Относительно мягкие плоды с питательной мякотью, начиненной множеством мелких семян, не менее привлекательны для птиц, чем округлые ягоды. Кто может (птицы-носороги, голуби, бородастики) — заглатывает эти ягоды целиком. В каждой — сотни семян, так что все подготовлено к их эффективному и широкому рассеиванию. Кто не может поступать столь радикально — отщипывает небольшие кусочки мякоти и тоже получает «в нагрузку» хотя бы несколько семян. Поскольку птицы основное время суток проводят в кронах, постольку и помет их, пардон-с, будет попадать на ветви и кору деревьев. Мелкие семена, оказавшись в трещинах и щелях коры, в чашечке эпифитного папоротника или в каком-то другом укромном уголке, начнут прорастать, запускать корни в кору дерева-хозяина — и вскоре мы смо-



Рисунок 13. Съедобные для птиц плоды небольшого дерева *Euricoma longifolia* (сем. Simaroubaceae) на разных стадиях созревания.

жем видеть полупаразитическое растение, растущее на приютившем его дереве-хозяине. Нет, никаких особенных травм «хозяину» фикусы, кажется, не наносят. Но они, постепенно обрастая такие деревья, в конце концов опутывают их сетью переплетающихся корней и побегов, тянущихся вверх и вниз, заслоняют от солнца крону хозяина своей листвой и в конце концов приводят его к гибели. За что и получили полуофициальное название «деревья-душители», или «удушители», как неудачно писал в своих статьях один наш знакомый. Как видим, этой жизненной форме растений необходимы агенты по разному семенного материала — птицы, а также менее разнообразные, но многочисленные крыланы.

Взаимовыгодное «сотрудничество» между птицами и растениями со съедобными для них плодами имеет еще несколько интересных аспектов, но мы вынуждены закругляться. Лекция и без того затянулась, а нам еще есть что обсудить, так что отложим ее продолжение до следующего раза. А пока — подведем некоторые итоги ее сильно растянувшейся второй части.

Нам, аборигенам умеренных широт с их бедноватыми лесами и резкими сезонными сменами климата, просто в силу постоянного пребывания в такой обстановке постепенно начинает казаться, что такая ситуация — нечто вроде «нормы», что оно типично, что именно с ним надо сравнивать другие ситуации. Понятно, что это — результат географии нашего биологического, зоологического, орнитологического становления и воспитания. Если бы мы ходили в биокласс, а потом в университет, в Малайзии или Панаме, то наше биологическое образование в большей степени соответствовало бы реальной картине мира. Мы бы с детства воспринимали тропики как норму, а ельник, березняк или южную тундру — как бедные жизнью частные случаи. И, возможно, этот подход был бы

более справедливым хотя бы потому, что центр биологического разнообразия животных и растений, а также районы с наиболее комфортными для них условиями расположены, конечно, на юге, у экватора.

Поэтому биолог, в частности — орнитолог, оказавшись в тропическом лесу, вынужден в определенной степени начать все сначала. Можно даже кратко обозначить этапы его эволюции. Начав с удивления, если не сказать — с потрясения, от обилия новизны, он старается перевести ситуацию в привычное для себя русло и описать доставшуюся ему для исследования орнитофауну в привычных ему терминах (статус, численность, гнездование, питание и т.д.). Некоторое время кажется, что это удастся сделать: отдельные виды становятся все более понятными, «непонятные» как бы отступают на задний план, и приходит некоторое успокоение — появилась почва под ногами. Однако, если продолжать копать глубже, накапливать материал, обращать внимание на детали, то к вам постепенно вернется тревога. Факты начинают все реже и хуже совпадать с имеющимися гипотезами и выводами, противоречия нарастают, идеи, возникшие в первые месяцы работы, оказываются оторванными от реальности.

Начинается самый интересный этап: погружение в детали, попытки досконально разрешить пусть небольшой, но конкретный вопрос. И вот тут, по-моему, исследователь доходит до нужной кондиции: понимает, вживается, глубоко погружается, всеми фибрами чувствует если не все, то уже многие детали жизни очень сложной экосистемы тропического леса. Экосистемы, в которой бок о бок живут и взаимодействуют в формате «каждый с каждым» принципиально больше животных и растений, чем мы можем себе представить. Об этих взаимодействиях уже известно немало, но в будущем нам обязательно откроются очень странные, занятые и неожиданные варианты таких взаимоотношений.

Мы добрались до конца лекции, и тут у читателей, возможно, возникло ощущение некоей недосказанности, невыполненных обещаний и общей неудовлетворенности. Одно непонятно, другое намечено пунктиром, третье показалось не очень достоверным. Вот и хорошо — будем надеяться, что из-за этой неудовлетворенности вам захочется почитать и послушать про тропический лес еще что-нибудь.

Как «реставрировали» ковдскую церковь

Е. Кудрявцева



Елена Кудрявцева,
5-й выпуск биокласса,
школа № 57 (1980 г.),
закончила кафедру эмбриологии
Биофака МГУ (1986 г.), к.б.н., научный
сотрудник Университета
Калифорнии, США,
elena.kudr@gmail.com

Посвящается Галине Анатольевне

В начале 1990-х гг. в селе Ковда Мурманской области началась история, которая, увы, не закончена, и которая точно отражает весь комплекс проблем, касающихся сохранения русской деревянной архитектуры. Каждый сохранившийся пример такой архитектуры совершенно уникален и бесценен, ибо непрерывная культурная традиция строительства деревянных церквей, часовен и колоколен на Руси утрачена. Ситуацию в какой-то мере можно сравнить с тем, что было во времена татаро-монгольского ига, когда за 80 лет русские не возвели ни одной каменной церкви. Те старые храмы, что эти 80 лет пережили, послужили источником вдохновения для следующих поколений, никогда не видевших, как их строили. Они определили преемственность русской архитектуры (Рапопорт, 1993). Деревянное зодчество сейчас в похожем положении — нет тех плотницких артелей, нет той страны, той русской деревни, нет той церковной культуры, которые породили это зодчество. Все, что мы можем и должны делать, — это сохранять то, что уцелело. Сохранять, чтобы было у чего учиться, на что оглянуться.

До недавнего времени таким уцелевшим чудом был Свято-Никольский деревянный храм в поморском селе Ковда на берегу Кандалакшского залива Белого моря. Небольшая по размеру клетская церковь с отдельно стоящей колокольней, предположительно — XVII век. В конце XIX века ансамбль был обшит тесом. Обшивка защищала от дождя и ветра, не портя пропорции строения. В обшивке храм был белым и очень заметным, праздничным. Надо сказать, что ковдская церковь совершенно удивительно впи-

сана в окружающий ландшафт. Она видна с озера, с реки, с дороги — еще за 3 км до села. Ее хорошо видно с моря, несмотря на то, что с северо-востока она прикрыта скалой. Ковдский залив заполнен множеством мелких островов и корг. На сколько-нибудь большом корабле не везде и пройдешь. Относительно безопасный путь, так называемый Большой Ковдский рейд, проходит ближе к северному берегу и резко поворачивает к деревне уже в самом конце. Как только лодка выходит из-за острова Овечий и поворачивает к Ковде, то первое, что видишь, — силуэт храма и колокольни, как бы вырезанный на фоне неба. Особенно это важно в сумерках, когда дома могут совершенно сливаться с берегом, а храм все еще прекрасно заметен на фоне чуть более светлого вечернего неба.

После революции церковь, конечно, закрыли, однако после войны по просьбам местных жителей в ней возобновили службы. И уже в хрущевское время закрыли окончательно. Наиболее ценные иконы вывезли, но многое из убранства и утвари еще оставалось внутри. В 1970-х, когда наша биологическая станция «Наш Дом» начала свою жизнь в Ковде, церковь была постоянно заперта, охраняемая бдительным сторожем. В те годы относительного покоя никто из нас даже ни разу не бывал внутри. Мы любовались ее сказочным обликом, совершенно не представляя себе Ковды без нее.

В 1989 г. началась реставрация ансамбля, которую поначалу все восприняли исключительно положительно. Ситуация изменилась, когда стали очевидны те странные и страшные формы, которые эта реставрация приняла. Церковь начала таять на глазах. Прелестная легкая ограда была уничтожена. Обшивка сорвана и уничтожена. Исчезли пол и крыльцо. На изумленный вопрос: «Что же здесь такое предполагается?» выяснилось, что предполагается, как выразились реставраторы, «полная переборка с восстановлением типичного облика церкви XVIII века».

Церковь ковдская оказалась, видимо, нетипичной, к тому же какие-то ее части перестраивались (а как бы им не перестраиваться за столько веков), поэтому, чтобы восстановить чистоту образа, необходимо ее разобрать до основания, а затем, конечно, собрать, но подправить. Поздние наслоения, а иногда и более ранние следы, если

они не вписываются в концепцию XVIII века, подлежат уничтожению. Следы разобранных в прежние времена частей здания, а также ясное понимание того, как строили в XVIII веке, позволяют реставраторам нарисовать точную картину того, какой была тогда ковдская церковь. Вот она, эта картина, и встанет здесь, вместо имеющейся церкви. А основанием для срочного начала полной переборки служит аварийное состояние храма. Реставраторы института «Спецпроектреставрация» Ирина Семенова и Алексей Смышляев, подготовившие проект и ведущие работы, утверждали, что церковь прогнила насквозь и стоять больше не может.

Оставляю временно в стороне анализ правомерности предложенного подхода с исторической и художественной точки зрения. Оставляю пока в стороне то впечатление, которое произвела на ковдчан разборка их храма. Первый вопрос, на который мы попытались ответить, прежде всего самим себе: действительно ли церковь в таком ужасном состоянии, что просто не может быть сохранена?

С помощью многочисленных писем протеста, которые подписывали как московские биологи, так и местные жители, министерских комиссий и телевидения, а также благодаря вмешательству такого очевидного авторитета, как Дмитрий Сергеевич Лихачев, переборку удалось приостановить. Стояли брошенные строительные леса вокруг полуразрушенного храма. Автор статьи вместе с аспирантом кафедры низших растений биофака МГУ и ученицей Галины Анатольевны Асей Литвинцевой и помощниками из числа школьников биологического класса, а также при постоянной моральной поддержке самой Галины Анатольевны Соколовой, начали свое независимое микологическое обследование Свято-Никольской церкви в Ковде.

Грибы

Гниение древесины, приводящее к ее быстрому разрушению, вызывает очень специализированная группа микроорганизмов, так называемые дереворазрушающие грибы. Природа наделила их особой системой ферментов, позволяющей разлагать и употреблять в пищу супертвердую целлюлозу или даже целлюлозу в комплексе с лигнином. Это основные компоненты, придающие древесине твердость. Очень мало организмов способны усваивать эти вещества. Еще термиты, например, но на севере они не актуальны.

Роль дереворазрушающих грибов в природе огромна. Благодаря их деятельности земля не

завалена погибшими деревьями, а энергия и вещество возвращаются в общий кругооборот. Однако некоторые из этих грибов способны поселяться на деревянных постройках и — в буквальном смысле — съедать их. Наиболее активный и опасный из таких дереворазрушителей, серпула плачущая (*Serpula lacrymans*), в подходящих условиях всего за несколько лет может привести новую постройку в негодность. Но, как показывает опыт, именно в подходящих условиях. В неподходящих — рост гриба сильно замедлен или вообще невозможен.

Факторы, способствующие быстрому росту грибов, — это прежде всего влажность. Вода абсолютно необходима грибу для жизнедеятельности. Это плюсовая температура хотя бы часть года. Зимнее вымораживание убивает гриб, но с приходом тепла он быстро восстанавливается из спор или остатков мицелия, если условия благоприятствуют развитию. Быстрее разрушается свежая древесина, сохранившая легкоперевариваемые вещества. Поэтому новая постройка, будучи зараженной, имеет больше шансов погибнуть. Быстрее разрушается древесина, содержащая низкий процент смол. Именно поэтому лес предпочитают рубить зимой, когда содержание смол максимально.

Как мы и ожидали, церковь не была свободна от грибов (Kudryavtseva, Litvintseva, 2000). На стенах ковдского ансамбля нами было обнаружено три вида дереворазрушающих грибов:

1. *Serpula lacrymans* (Wulf.: Fr.) Schroet; серпула плачущая,
2. *Coniophora puteana* (Schum.: Fr.) P. Karst; кониофора,
3. *Coriollinus serialis* (Fr.) Murr; кореулелус.

Места обнаружения грибов и все очаги поражения были нанесены на побревенные схемы церкви и колокольни (см. схемы церкви на рисунке 1). В каждом случае определялась глубина деструкции древесины. Анализ очагов выявил следующее:

- 1) Наиболее агрессивная серпула обнаружена на нижних венцах здания, которые сильно разрушены. Однако она по каким-то причинам почти нигде не поднимается выше второго венца.
- 2) Отдельные маленькие пятна серпулы и кониофоры обнаружены на балках крыши и вызваны скорее всего протечками. Однако поражения локальны и неглубоки.
- 3) Два больших пятна глубоко разрушенной древесины в северной стене трапезной и в ризнице связаны с наличием печей (цифры 1 и 2 на рисунке 1). Стена рядом с печью регулярно прогревалась, а остывая, конденсировала влагу, что в сумме создавало идеальные условия для гриба.



Рисунок 1. Схемы, показывающие очаги деструкции древесины на ковдской церкви.

Зоны грибкового поражения затемнены, степень поражения соответствует степени затемнения.

4. На северной стене снаружи обнаружен мицелий и слабообразованные плодовые тела кореолилуса. Однако, этот гриб — слабый разрушитель, и глубокой деструкции он не вызвал.

Осматривая наиболее пораженные северные стены, мы обнаружили небольшие стесы, сделанные в XIX веке при установке обшивки. Их поверхность была абсолютно чистой. За все это время грибница с соседних участков на них не распространилась. Это означает, что за прошедший век, пока церковь стояла под обшивкой, деструкция стен практически не увеличилась.

Мы также обследовали заброшенный дом священника (XIX век) и некоторые обитаемые дома в деревне. На 2–4 нижних венцах этих строений были найдены многочисленные молодые плодовые тела серпулы и активно растущий

мицелий. А плодовые тела, найденные в церкви, были совсем немногочисленны и невелики по размеру.

Стало ясно, что более новые постройки в деревне поражены значительно сильнее, чем старинная церковь. Скорость гниения старых бревен почему-то очень низка. Ситуация меняется рядом с печами. Но ковдская церковь почти всегда была летней, зимой не отапливалась. Печи в ней установили только в советское время, и два наиболее крупных очага разрушения — прямое следствие этого новшества.

Грибы живут внутри дерева и не всегда заметны. Чтобы увидеть, кто обитает на бревнах, мы использовали влажные камеры. Кусочек дерева помещался в закрытый сосуд, где поддерживалась высокая влажность, или же прямо на

кусок стены натягивалась пленка, и под нее ежедневно добавлялась вода. Через несколько дней в таких замечательных условиях все грибы выползают на поверхность.

На 90% взятых с церкви образцов нами был обнаружен плесневый гриб триходерма зеленая (*Trichoderma viride*). Дереворазрушающие грибы — далеко не единственные микроорганизмы, поселяющиеся на дереве. Еще это лишайники, плесневые грибы, одноклеточные водоросли, бактерии. Часть этих организмов использует дерево просто как субстрат, а энергию получает за счет фотосинтеза. Другая часть питается за счет первых. Дереворазрушающие грибы переваривают древесину, но в свою очередь могут являться объектом питания для других микроорганизмов. Все вместе они образуют биоценоз. Плесневый гриб триходерма зеленая не способен эффективно разлагать целлюлозу, однако он заинтересован в жизненном пространстве на древесине и очень хорошо умеет за это пространство бороться. Работами микологов (Рипачек, 1967; Bettucci *et al.*, 1988; Bruce, Highley, 1989, 1991) было показано, что триходерма способна подавлять рост многих опасных дереворазрушающих грибов, в том числе серпулы и кониофоры, обнаруженных в Ковде. Она выделяет яд глиотоксин (Weindling, Emerson, 1941), который препятствует росту дереворазрушающих грибов. Глиотоксин очень стоек и может накапливаться в древесине. Также было показано, что гифы триходермы при непосредственном контакте с гифами серпулы убивают последние и, видимо, используют в пищу (Murmanis *et al.*, 1988).

На помещенных во влажную камеру образцах мы наблюдали, как сначала появлялся типичный мицелий кониофоры или серпулы, он начинал расти. Однако очень скоро рядом обнаруживалась активно растущая триходерма. Через несколько дней зона триходермы увеличивалась, а зона дереворазрушающего гриба начинала уменьшаться. Через 1–2 недели мицелий дереворазрушающего гриба исчезал, оставалась одна триходерма. И во влажной камере, и под пленкой на стене, в условиях без искусственного подогрева, победа всегда была за ней.

Сообщество микроорганизмов на стенах ковдской церкви очень старо. Ясно, что грибы поселяются почти сразу после постройки. Их мельчайшими спорами пропитано все вокруг, а известно, что свежее дерево заражается легче. По-видимому, это сообщество очень устойчиво. Рост опасных грибов угнетен температурно-влажностным режимом и другими членами биологического сообщества. Такое состояние можно определить как естественную консервацию дерева.

Безусловно, уничтоженная обшивка храма способствовала его сохранности. Это подтверждают и стесы, сделанные под обшивку, да и просто наблюдения за домами в деревне. Их обязательно стремятся обшить. Церковь была целиком обшита в конце XIX века, когда появились пилорамы и доски стали относительно дешевы. Но и до того, когда каждая доска вытесывалась топором и была очень дорога, северная стена собственно церкви была все же обшита. Эта старая обшивка обнаружилась, когда реставраторы сняли более новую.

Однозначный вывод нашей работы — оснований для срочной переборки храма просто нет. Починить крышу, поменять нижние венцы, провести замены в прогнивших участках возле печек. Никогда больше печей в храме не устанавливать. Восстановить обшивку. Восстановить внутреннее убранство. Продолжить изучение исторического прошлого. Возродить храм как духовный центр. Вот вкратце самая разумная программа на будущее.

Однако жизнь стала развиваться совсем по другому сценарию, и летом 1993 г. мы имели несчастье проверить некоторые наши теории относительно жизни грибов. Реставрационные работы возобновились. Работы на это раз вело карельское ТОО «Реставрация» по документации все той же «Спецпроектреставрации». Консультировала работы архитектор Елена Ополовникова. Колокольню разобрали за шесть дней. Многие детали были сломаны. Часто попросту распилены электропилой при разборке, так как разнять хитроумные крепления, признанные ветхими, реставраторы не сумели. Также они отпилили те части бревен, которые посчитали наиболее сгнившими. И эти распилы выявили удивительный факт. Трухлявые снаружи и, кажется, совсем негодные старые бревна оказались в очень хорошем состоянии внутри (рисунок 2). Самое поразительное, что они сохранили смолистый запах. Возможно, сыграло роль и то, что для строительства был использован отборный лес. Брошенные в мокрую траву, эти старинные бревна покрылись просто зарослями триходермы. Однако, в течение нескольких лет, что мы имели возможность наблюдать за ними, дереворазрушающие грибы на них не появились.

Образ

Судьба ковдской колокольни видится особенно трагичной в свете того, что она была, конечно, в лучшем состоянии, чем церковь. Перебирать ее не было вообще никакой необходимости. Колокольня была разобрана (а пра-



Рисунок 2. (а) — церковь без обшивки, но до разборки (1992 г.); (б) — двойная главка ковдской церкви; (в) — колокольня до разборки (1992 г.); (г) — спил старого бревна из колокольни; (д) — образец с северной стороны трапезной (наиболее поврежденной), находящийся во влажной камере 10 дней: мицелий триходермы (1) вытесняет дереворазрушающий гриб кониофору (2).

вильнее сказать — сломана) и несколько лет пролежала на земле. Потом ее все же собрали. Но то, что мы все получили взамен, уже не может называться произведением искусства и историческим памятником. Была изменена конструкция шатра. Он был двойным, очень аккуратно и точно сделанным, и очень хорошо резонировал звук колокола. «Уникальная, неизвестная по другим памятникам народной деревянной архитектуры конструкция резонатора представляла собой прикрепленную к стропилам внутреннюю

тесовую обшивку, ограниченную плоским потолком, устроенным на уровне 2/3 высоты шатра» — читаем у карельского реставратора Евгения Вахрамеева.

Для реставраторов это оказалось слишком сложным. Они не смогли повторить работу старых мастеров, шатер стал однослойным, изменил свою форму, и теперь колокол на другом берегу реки уже не слышно, а раньше было слышно. Старые столбы, на которых лежал шатер, зачем-то были растесаны и украшены

игривыми дыньками. А строгие, очень красивой линии подзоры шатра, придававшие его силуэту схожесть с цветком-колокольчиком, исчезли.

Не берусь судить, возможно, новое строение больше соответствует «научному» представлению о «типичной колокольне XVIII века», но очевиден результат, который были вынуждены признать и сами реставраторы, и комиссия из Министерства культуры, — гибель замечательного памятника в результате реставрации. «Пренебрежение историческими слагаемыми облика памятника, выраженными в деталях звонницы и шатра, привело к его искажению, созданию малозначительного, безликого образа», — пишет реставратор Евгений Вахрамеев (Вахрамеев, 1998).

План переборки церкви также предусматривает «восстановление ее в облике XVIII века». Лишь один яркий пример. Главка ковдской церкви совершенно особенная, двойная. Большая — плосковатая, как чаша, а над ней — маленькая, более заостренная. Единственную похожую я видела на Ильинской церкви в Суздале. Галина Анатольевна Соколова говорит, что главка эта заставляет ее вспомнить о Марии с младенцем — она несет его, а он несет на себе крест. Возможно, есть другие толкования, но ясно уже, как глубоко символичны части храмовой архитектуры. Если главку делают по-особенному, значит хотят что-то этим сказать. Это осмысленно. Надо ли говорить, что проект переборки предполагал заменить ковдскую главку традиционной луковицей.

Колокольню зачем-то удлиннили на несколько венцов, что нарушило пропорции ансамбля. Кроме того, настоящая колокольня была слегка наклонена в сторону церкви, как и церковь — в сторону колокольни. Почти невероятно, что это

случайность. Тем более что наклонена только церковь от повалов, а главка стоит прямо. Наклоны подчеркивали единство ансамбля. Линии, проведенные от крестов колокольни и церкви, пересекались где-то высоко в небе.

Посмотрите на фотографии русских деревянных церквей. Они все такие разные, несмотря на вполне ограниченный круг используемых конструкций. Но соотношение объемов, линии, силуэт — абсолютно уникальны в каждом конкретном случае. Каждая имеет свое лицо. Эта архитектура имеет черты скульптуры. Для нее характерно тонкое чувство пропорций, прежде всего — пропорций места. Церковь в него не вдвинута, она из него вырастает. Как все живое, она не абсолютно правильна по форме и подстраивается к месту. Надо ли говорить, что перебранная колокольня все свои удивительные наклоны утратила.

Кроме того, ковдский храм просто недостаточно изучен. Ведь даже с его датировкой происходит полная неразбериха. Разные источники дают совершенно разную информацию. Чаще всего фигурирует дата 1705 г. Но церковь могла быть построена и раньше. Один из первых ее исследователей искусствовед Игорь Шургин считает, что собственно церковь могла появиться в 1597 г., а 1705 г. — дата появления колокольни (Шургин, 2001). Так все-таки — когда? Для ответа требуются дальнейшие исследования, но скоро, возможно, исследовать будет уже нечего.

«Типичное строение XVIII века» вряд ли добавит много информации об историческом прошлом.

В 2005 г. реставрация опять возобновилась. Ведут ее опять Карельские реставрационные мастерские, руководит работами реставратор



Рисунок 3. (а) — Ковдская церковь в обшивке до начала реставрации (1980-е гг.); (б) — церковь, вид с той же точки после переборки колокольни (конец 1990-х гг.).



Рисунок 4. Ковдская церковь, лето 2006 г.

Татьяна Вахрамеева. На этот раз разобрана трапезная. Трапезная конструкционно не связана с церковью, только поэтому церковь еще цела. Без всякой переборки в ней заменены нижние венцы, что в деревянных строениях делается регулярно. Это, безусловно, положительный факт, но он не умаляет потери трапезной. Опять же — уничтожен церковный пол, слегка восходящий к алтарю. (Интересно, сколько раз я употребила слово «уничтожен»? Сколько раз должна буду еще употребить?)

Ансамбль, как единое целое, то, что было так ценно именно в случае ковдской церкви, утрачен. Речь теперь может идти лишь о сохранении отдельных его элементов. Есть надежда, что хватит здравого смысла и такта не разломать характерную ковдскую главку. Хотелось бы сохранить хоть что-то от навсегда утраченной красоты. Хотелось бы надеяться, что работы все-таки будут доведены до стадии восстановления обшивки и внутреннего интерьера. Что будет восстановлена ограда. Хотелось бы верить, что что-то останется. Однако пока происходящее в Ковде свидетельствуют об обратном — трапезная разобрана, деньги как раз кончились. В лето 2006 г. ничего сделано не было. Крыша открыта, детали церкви разбросаны вокруг и зарастают травой. Всё. Никто больше ни за что не отвечает.

К несчастью, все случившееся очень типично и касается не только ковдской церкви, это — подход! Ни минуты не сомневаясь в собственных силах, реставраторы стремятся все переделать «как было», при этом подгоняют реальность под свои представления. А на деле — просто хотят получить высокооплачиваемый проект. Отсюда все идеи о необходимости срочной тотальной переборки. А тем самым уничтожается то, что

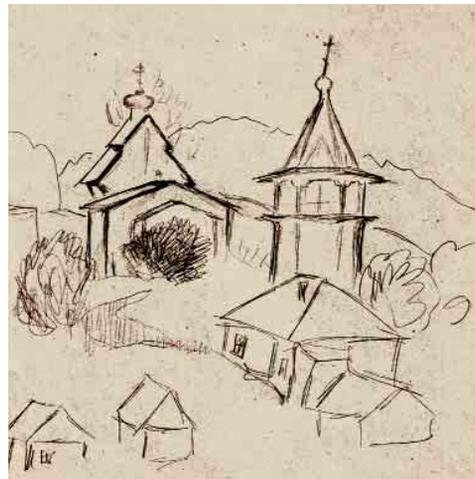
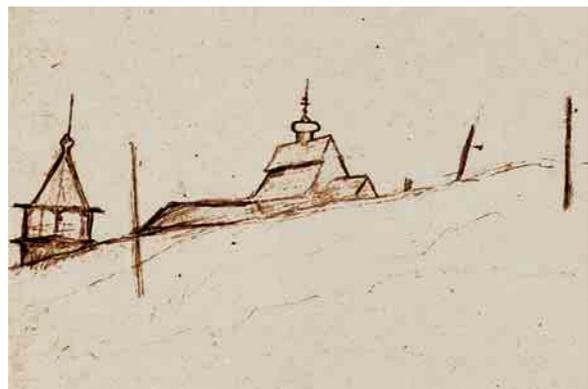
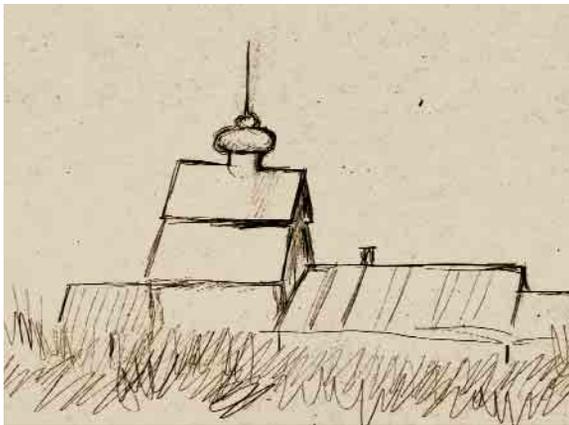
есть — подлинник — документ, свидетельствующий о прошлом, живое произведение искусства, запечатленное в дереве душа народа. В случае ковдской церкви парадоксальным образом именно реставрация, а не советская власть, пожар и общее небрежение погубила исторический памятник.

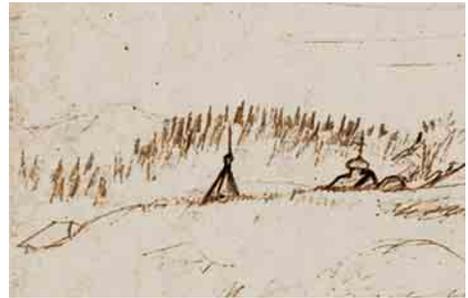
Картинки на память

Колокольня была разобрана в 1993 г., а осенью 1992 г. я ходила вокруг еще целого храма и пыталась зарисовать его с разных сторон. Зарисовать так, чтобы запомнить особенности архитектуры ковдского храма так, как я их вижу. Рисунки эти несовершенны. Выполнены большей частью на колене или вообще стоя. Обычные рабочие зарисовки. Единственное, что придает им цену, — они оказались последними. Поэтому я решила собрать их и приложить к этой статье в качестве небольшого днерожденного подарка, просто на память.

Литература

- Вахрамеев Е.В.** 1998. Концепция реставрации архитектурного комплекса в поморском селе Ковда. — Петрозаводск: Изд-во Петрозаводского Гос. ун-та.
- Раппопорт П.А.** 1993. Древнерусская архитектура. — С.-Петербург.
- Рипачек В.** 1967. Биология дереворазрушающих грибов. — М.: Лесная промышленность.
- Шургин И.Н.** 2001. Беззащитные шедевры. Русское деревянное зодчество. — М.
- Beffucci L., Lupos S., Silvas.** 1988. Growth control of wood rotting fungi by nonvolatile metabolites from *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* // *Cryptogimie. Mycol.* 9(2): 157–165.
- Bruce A., Highley T.L.** 1989. Decay resistance of wood removed from poles treated with *Trichoderma* // *Doc. N°IRG/WP/1386 Inter. Res. Group on Wood Pres.*
- Bruce A., Highley T.L.** 1991. Control of growth of wood decay Basidiomycetes by *Trichoderma* spp. and other potentially antagonistic fungi // *Forest Prod. J.*, 41(2).
- Murmanis L.L., Highly T.L., Ricard J.L.** 1988. Hyphal interaction of *Trichoderma harzianum* and *Trichodemna polysporum* with wood decay fungi // *Material and Organismen*, 23(4): 271–297.
- Kudryavtseva E.I., Litvintseva A.P.** 2000. The role of natural conservation of wood in preservation of wooden architectural monuments // *American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA.* 116-130.
- Weindling R., Emerson O.H.** 1941. The isolation of a toxic substance from the cultural filtrate of *Trichoderma* // *Phytopathology*: 31.





Картинки на память. Ковдская церковь, 1992 г.



Картинки на память. Ковдская церковь, 1992 г. (окончание).

Почему мы любим ES cells?

Е. Кудрявцева

Эмбриональные стволовые клетки — ES cells (от Embryonic Stem cells), как их гораздо привычнее называть, — впервые были получены в 1981 г. (Evans, Kaufman, 1981). Получили их из раннего эмбриона мыши, взятого на стадии еще до имплантации в стенку матки (3–4 дня после оплодотворения). Чтобы немного понять, кто они и откуда, надо сказать сначала два слова о раннем развитии млекопитающих.

Как вы, конечно, знаете, все многоклеточные организмы начинают свою жизнь с одной клетки, и наш класс млекопитающих тут не исключение. Однако есть несколько характерных, свойственных млекопитающим, особенностей. Первая — им не нужно иметь много желтка в яйцеклетке. Эмбрион будет получать всю пищу от матери. Надо запастись ему совсем немного на самое первое время, пока контакт с материнским кровотоком еще не установлен, поэтому яйцеклетка млекопитающих — относительно небольшая клетка с прозрачной цитоплазмой. Однако вторая особенность млекопитающих — это то, что в эволюции наши предки (рептилии) были яйцекладущими и имели огромную яйцеклетку, набитую желтком (вспомните хорошо знакомое куриное яйцо). Поэтому требовался целый штат клеток, которые были нужны в основном для того, чтобы управиться со всей этой массой еды, и для того, чтобы создать зародышу приемлемые для жизни условия, отделив его от желточного склада. Эти внезародышевые клетки потом просто отмирали, так как после рождения были не нужны. Таким образом, у высших позвоночных только часть потомков яйцеклетки войдет в состав взрослого организма, а другая часть им в развитии послужит, а потом погибнет. Млекопитающие, как высшие позвоночные, сохранили это деление на зародышевую и внезародышевую части, несмотря на то, что утратили огромные запасы желтка.

После оплодотворения яйцеклетка млекопитающих начинает делиться — сначала на две клетки, потом каждая из дочерних клеток еще на две, и так далее, пока не получится плотный комочек из клеток — морула. Далее клетки в моруле реорганизуются — они выстраиваются так, что образуют шарик, наполненный внутри

жидкостью. Шарик этот называется бластоцистой — похож на бластулу, как у морского ежа, например, да не совсем бластула! Если присмотреться, видно, что с одной стороны стенка этого шарика толще (рисунок 1). В этом месте клетки лежат не в один слой, а в несколько. Оказалось, что будущий организм будет образовываться только из клеток этого утолщения (их называют внутренней клеточной массой), а все остальные клетки — это внезародышевая часть. Можно сказать, что клетки внутренней клеточной массы плюрипотентны — они дадут начало всем типам клеток, которые появятся в организме.

Вот именно эти клетки и были выделены Эвансом и Кауфманом в культуру. Очень тонким капилляром они прокололи стенку бластоцисты мыши и, контролируя свои действия под микроскопом, отсосали несколько клеток из внутренней клеточной массы. Понятно, что несколько клеток, помещенных в чашку Петри со средой, имеют очень мало шансов выжить, если это не

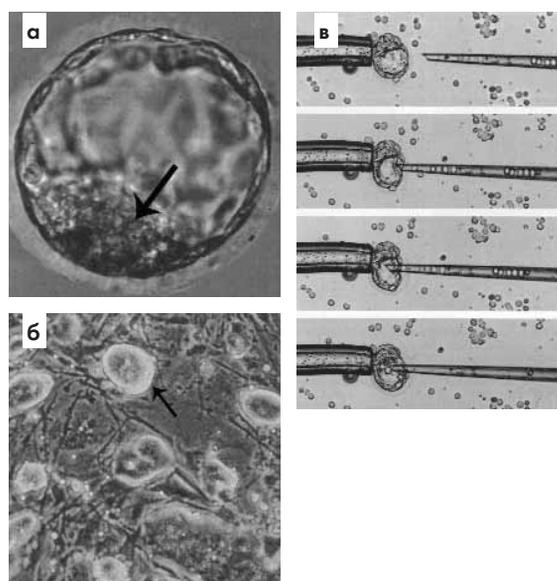


Рисунок 1. Бластоциста и стволовые клетки.

(а) — бластоциста; стрелкой отмечена внутренняя клеточная масса; (б) — эмбриональные стволовые клетки (отмечены стрелкой), растущие на подложке из облученных эмбриональных фибробластов; (в) — подсадка эмбриональных стволовых клеток в бластоцисту (из *Methods in Molecular biology*, v. 158, *Gene Knockout protocols*).

раковые клетки, конечно. Нормальные клетки любят жить среди себе подобных. Поэтому клетки из бластоцисты были помещены на слой эмбриональных фибробластов. Фибробласты были специально облучены такой дозой рентгена, что они могли жить 1–2 недели, продуцировать ростовые факторы, но не могли делиться. Прием с фибробластами сработал, и клетки из внутренней клеточной массы бластоцисты начали делиться в культуре. Клетки эти стали называть эмбриональные стволовые клетки (ES cells).

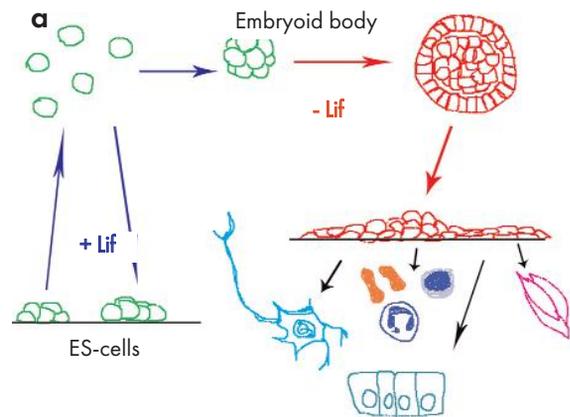
ES клетки растут очень быстро и выглядят, как плотные группы очень мелких клеток, между которыми трудно разглядеть границы (рисунок 2). Их необходимо часто пересаживать, часто менять среду, им необходим определенный набор ростовых факторов, большинству линий необходимы фибробласты в качестве подложки. Кроме того, при пересадке их необходимо каждый раз разбивать до единичных клеток. Оказалось, что если соблюдать эти простые правила, то эмбриональные стволовые клетки можно поддерживать в таком состоянии очень долго и нарастить в огромных количествах.

Но если взять из культуры несколько этих клеток тонким капилляром и проделать обратную операцию — проколоть стенку бластоцисты и прибавить их к внутренней клеточной массе, то они будут приняты там как родные, начнут развиваться во всех возможных направлениях.

Как мы это знаем? А вот как — мы можем эмбриональные стволовые клетки пометить. Причем пометить не временно, а постоянно. В тот момент, когда они растут в культуре, можно внедрить в них чужеродную ДНК. Не буду описывать, как это делается, тем более что способов несколько. Важно, что это возможно, — так же, как для других клеток в культуре.

Теперь представим, что эта чужеродная ДНК кодирует какой-либо цветной белок. Зеленый флуоресцентный белок, например. Поставим ген зеленого белка под сильный промотор (регуляторный участок, управляющий транскрипцией). Выберем такой промотор, чтобы он работал во всех типах клеток. Введем ДНК зеленого белка под сильным промотором в ES клетки. Известно, что в некотором проценте случаев эта чужеродная ДНК встраивается в геном клетки. Подождем немного и отберем только те клетки, в геном которых эта ДНК встроилась. Обычно для этого вместе с геном зеленого белка в геном клетки встраивают ген устойчивости к антибиотику.

Возьмем зеленые ES клетки и подсадим их в бластоцисту без метки. Все это происходит еще на стадии до имплантации, поэтому такой «сборный» эмбрион (его называют химерой)



б
Pit-1
EB 2-7-14



в

EB 2-7-14

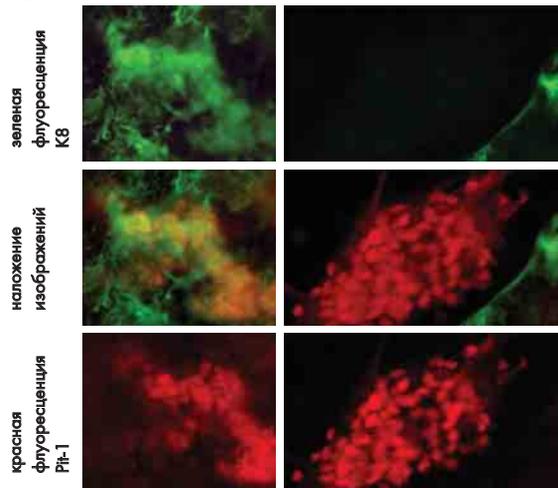


Рисунок 2. Поведение эмбриональных стволовых клеток в культуре.

(а) — схема, иллюстрирующая поведение эмбриональных стволовых клеток в культуре; (б) — пример дифференцировки клеток, образовавшихся из эмбриональных стволовых. Через 3 недели после образования эмбрионных тел (EB, embryoid body) некоторые клетки синтезируют транскрипционный фактор Pit-1 (темно-коричневая окраска ядер), который синтезируется только в гипофизе и совершенно необходим для его развития; (в) — пример, показывающий, что потомки ES клеток повторяют нормальный ход событий. Такая же 3-недельная культура была покрашена смесью флуоресцентных антител на Pit-1 (красный цвет, ядра) и K8 (кератин 8) (зеленый цвет, цитоскелет). Видно, что эти два белка в большинстве случаев находятся в разных клетках. В нормальном развитии клетки зачатка гипофиза сначала синтезируют кератин 8, однако к моменту включения Pit-1 он выключается. Наиболее яркие Pit-1-положительные клетки на правых фотографиях совершенно не синтезируют K8.

можно подсадить другой мышке, и он будет развиваться нормально. Когда такой эксперимент был поставлен, то зеленые клетки были обнаружены среди всех тканей и органов мышонка, развившегося из химерного эмбриона. Это значит, что клетки, которые мы размножаем в культуре, по-прежнему эмбриональные, т.е. могут развиваться. И главное — они плюрипотентны, т.е. могут развиваться в любом направлении.

Когда выяснилось, что все вышеописанное можно сделать в реальности, это открыло очень широкие возможности для исследований. Если вы можете внедрить в организм ген зеленого белка, то вся эта технология сработает и с любым другим геном, который вам по какой-то причине интересен. Более того, если первое поколение мышей — это химера, где часть клеток несет встроенный ген, а часть нормальные, то во втором поколении можно получить мышью, все клетки которой будут со встроенным белком. Ведь эмбриональные стволовые клетки плюрипотентны, они превращаются во все клеточные типы, в том числе и в будущие половые клетки, которые становятся гаметами.

Такие мыши со встроенной чужой ДНК называются трансгенными. Появление технологии получения таких мышей во многом определило развитие биологии в последние 20 лет. Ведь вы можете встроить интересующий вас ген под сильным промотором и посмотреть, что будет происходить, если гена больше, чем надо. Вы можете сломать этот ген бессмысленной вставкой и посмотреть, что случится, если ваш ген отсутствует. Вы можете включить ген только в определенной ткани, если поставите его под специфический промотор, работающий только в этой ткани. Вы можете изучать, как работают различные участки, регулирующие экспрессию гена, если соедините эти регуляторные кусочки с тем же зеленым белком, а потом посмотрите, где и когда начнут появляться зеленые клетки. Наконец, можно сделать регулируемый промотор, который будет активен только при добавлении определенного вещества. И вы сами будете решать, когда ген включить, а когда — выключить.

Однако, как становится понятно, это еще далеко не всё, что эти замечательные клетки могут дать науке. Давно было известно, что клетки эти очень капризны, и поддерживать их — мука. Чуть что — они начинают дифференцироваться прямо в чашке Петри, без всякой подсадки в эмбрион. Забыл пересадить вовремя, не разбил на одиночные клетки при пересадке, не добавил нужных ростовых факторов — и, пожалуйста, они уже во что-то превратились! Если же дать им агрегировать в комочки и не

разбивать каждые два дня, то через несколько дней в образовавшейся культуре можно обнаружить очень многие типы клеток.

Конечно, первыми бросились в глаза клетки сердца, т.к. примерно через 10–12 дней они начинают сокращаться. Но также можно видеть нервные клетки с длинными отростками, которые куда-то целеустремленно прорастают; клетки миотубулы поперечно-полосатых мышц; гладкие мышечные клетки; кость; хрящ; клетки крови; клетки печени. Создается впечатление, что поищите то, что вам надо, — и найдете. Удалось найти даже такие специализированные клетки, как яйцеклетки и сперматозоиды. Я в моей работе искала клетки гипофиза — и нашла.

Эмбриональные стволовые клетки подтверждают свою плюрипотентность и в культуре. Причем с момента, когда их оставляют в покое и дают возможность агрегировать, они в общих чертах повторяют последовательность событий в развитии зародыша. Сначала включаются более ранние гены, потом — более поздние. Но структурная организация зародыша оказывается полностью утраченной. Клетки в результате такого развития получаются «правильными», однако сложены они совершенно неправильно, и ничего похожего на нормальный зародыш не получается. То же самое происходит, если недифференцированные клетки подсадить взрослой мышью.

Они не понимают сигналов во взрослом организме, продолжают бешено делиться и дифференцироваться во все стороны, и превращаются в опухоль. Из-за этого их качества давать опухоли при трансплантации очень долго интерес к их способностям дифференцироваться в культуре был невелик. Сейчас эта ситуация стала меняться.

Во-первых, накопились данные о том, что дифференцированные клетки, получаемые из эмбриональных стволовых клеток в культуре, — «правильные», т.е. это реально существующие типы клеток, которые могут функционировать правильным образом. Во-вторых, эмбриональные стволовые клетки удалось получить не только из эмбрионов мыши, но и от других млекопитающих, в том числе и из человеческого эмбриона. Естественно, в трансгенных экспериментах человеческие клетки никто не проверял, но они очень неплохо дифференцируются в культуре. Возникает надежда: не можем ли мы использовать такие, полученные в культуре, клетки для трансплантации? Ведь очень многие страшные болезни на деле обусловлены преждевременной гибелью определенного типа клеток: болезнь Паркинсона, например, когда погибает определенный тип нейронов, или диабет, когда умирают клетки, продуцирующие инсулин.

Проблема с такими подсаженными клетками та же, что и при любой трансплантации органов. Иммунная система найдет и убьет чужие клетки. Но можно попробовать обойти и это ограничение. Показано, что если ядро из соматической клетки (не гаметы) пересадить в цитоплазму яйцеклетки, то побеждает цитоплазма. Ядро начинает вести себя, как ядро яйцеклетки. Можно взять яйцеклетку, вынуть из нее ее собственное ядро, заменить его на ядро, взятое из ткани больного, дать яйцеклетке развиваться до стадии бластоцисты (это прекрасно происходит в культуре), получить из нее линию ES клеток с геномом нашего больного и вырастить нужные клетки для трансплантации. Такие эксперименты идут в лаборатории Джоржа Дали из Гарварда. Причем, если у вас есть проблемы с использованием человеческих яйцеклеток, то рассматривается другая возможность. Ведь яйцеклетки были найдены среди клеток, образовавшихся из ES в культуре. Может быть они тоже пригодны для репрограммирования соматических ядер?

Еще одна трудность — при развитии ES клеток вы имеете все типы клеток сразу. Несколько больше, чем вам бы хотелось. Вы хотели бы получить, например, дофаминовые нейроны. Они здесь, пожалуйста. Но как отделаться от клеток печени, сердца и хряща? Можно — и многие исследователи это делают — попытаться подобрать набор регуляторных молекул, которые заставят большинство клеток развиваться в нужном направлении. Однако популяцию 100%-ной чистоты все равно получить не удастся.

Есть другой подход — можно попытаться нужные клетки из смеси отобрать. Выберем ген, который экспрессируется только в нужных нам клетках. Найдем область ДНК, которая необходима для его правильной работы. Соединим ее все с тем же зеленым белком. Теперь зеленый

белок будет экспрессироваться там же, где и ген, характерный для данного типа клеток. Встроим полученную конструкцию в геном эмбриональных стволовых клеток. Дадим этим клеткам возможность дифференцироваться. Если мы всё сделали правильно, то через некоторое время в общей неразберихе мы начнем видеть зеленые клетки. Они-то нам и нужны. Сейчас существует специальная машина, которая может из суспензии отделить зеленые клетки от незеленых. Конечно, это очень тонкая операция. Дифференцированные клетки очень нежные. Одно могу сказать: некоторые ученые в настоящее время вполне добились успеха с некоторыми типами клеток. Значит, это возможно.

Одна из самых интересных особенностей ES клеток — их феноменальная «жажда превращений». Как работает этот мотор? Что подвешивает клетку в столь неустойчивое положение, из которого она готова «покатиться» в любую сторону? Ведь гаметы — это очень специализированные клетки, приспособленные природой для определенной работы — встретиться, слиться, объединить генетический материал. За несколько последующих делений их потомки обретают плюрипотентность, которую затем неуклонно теряют в процессе развития. И только некоторые «избранные» в какой-то мере сохраняют это удивительное качество. Я имею в виду стволовые клетки, сохранившиеся во взрослом организме. Но это уже несколько другая история. Не менее интересная.

Литература

Evans M.J., Kaufman M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos // *Nature*, 292: 154–156.

Белки, которые потрясли мир

Е. Богданова, Ю. Лабас*, А. Гордеева*, С. Лукьянов



Сергей Лукьянов,
5-й выпуск, школа № 57
(1980 г.), закончил кафедру
эмбриологии Биофака МГУ
(1985 г.), д.б.н., член-корр.
РАН, зав. лабораторией в
Институте биоорганической
химии РАН, luk@ibch.ru



Екатерина Богданова,
8-й выпуск (Микробоссы),
школа № 520 (1986 г.),
закончила кафедру
молекулярной биологии
Биофака МГУ (1993 г.),
к.б.н., научный сотрудник в
Институте биоорганической
химии РАН, katya@ibch.ru

Цвет и свет

Окружающие нас вещества способны поглощать и отражать свет. Ту часть спектра, которую вещество отражает, мы видим и воспринимаем как цвет. Например, всем известный хлорофилл поглощает красную и синюю части спектра, а отраженный им зеленый цвет определяет зеленую окраску листьев на деревьях.

Некоторые вещества способны не только поглощать, но и испускать свой собственный свет. Это явление называется люминесценцией. Когда же люминесценцию производят вещества из живых организмов — биолюминесценцией.

Впервые биолюминесценция была описана в 1761 г. Тогда по приказу короля датский военный корабль вез из Копенгагена в Смирну научную экспедицию. Одним из ее участников был

зоолог Форскол. Однажды в начале марта, когда корабль плыл по Северному морю, пассажиры заметили в воде странное свечение. Причиной оказались небольшие, с крупную монету величиной, медузы, «способные светиться внутри». Форскол выловил несколько таких медуз и поместил их в ведро. Если медуз тревожили, они ярко светились зеленым фосфорическим светом. Форскол заспиртовал несколько экземпляров медуз и записал по-латыни в своем походном дневнике: «При раздражении и гибели светятся». С этой записи началась история исследований эквореи (*Aequorea*), как позже назвали этот род медуз (от лат. «aqua» — вода, рисунок 1).

Медуза экворея далеко не единственный способный к биолюминесценции организм. Известны более тысячи биолюминесцентных видов. Это бактерии, динофлагелляты, радиолярии, грибы и подвижные многоклеточные животные разных типов — от беспозвоночных до рыб. Большинство светящихся существ — обитатели морских глубин, но есть среди них и наземные (отдельные виды грибов, земляных червей, улиток, многоножек и насекомых). Пресноводных биолюминесцентных видов по невыясненным еще причинам практически нет, кроме одной новозеландской улитки и нескольких видов бактерий.

Колонии бактерий, высшие грибы и некоторые другие организмы светятся непрерывно (статически). Такой свет привлекает животных, что способствует попаданию бактерий в нового хозяина и распространению спор грибов. Однако большинство биолюминесцентных организмов, включая медузу экворею, генерируют короткие (0,1–1,0 сек) световые вспышки в от-

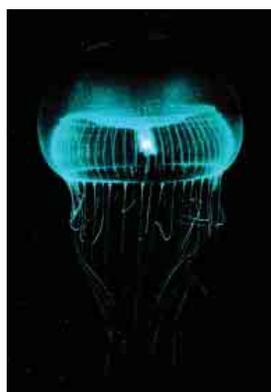


Рисунок 1. Светящаяся в темноте медуза рода экворея.

*Юлий Александрович Лабас, к. б. н., ведущий научный сотрудник Института биохимии им. А.Н. Баха РАН и Анна Викторовна Гордеева, аспирантка того же института, — специалисты в биолюминесценции. Они не имеют отношения к биоклассу, но приняли участие в написании этой статьи.

вет на внешние раздражения. Эти вспышки чаще всего предназначаются для отпугивания хищников или быстро движущихся животных, способных механически повредить субтильный светящийся организм (медузу, гребневика и т.п.) при случайном столкновении. В других случаях свет используют для внутривидовой коммуникации — как сигнал, привлекающий особи другого пола (например, у светляков). У некоторых глубоководных рыб над ртом имеется подвижный отросток — «удилище», а на нем — световая приманка для жертвы. Другие рыбы используют свои светящиеся органы для освещения ближнего пространства и т.д.

Как появились биолюминесцентные системы

Еще Ч.Дарвин отметил, что происхождение биолюминесценции очень непросто объяснить теорией естественного отбора. Полезный эффект свечения всецело связан со зрительным восприятием животных; следовательно, оно должно быть хорошо заметным. Кроме того, если возникают световые вспышки, то они должны с момента своего появления быть приурочены ко вполне определенным поведенческим ситуациям, например сопровождать двигательную реакцию, вызванную приближением хищника. Иначе от свечения никакой пользы не будет. Здесь нет места постепенному переходу за счет отбора от сверхслабого свечения, свойственного всему живому, но выявляемого только приборными методами, к более яркому. Ведь ниже порога видимости не будет никакого отбора.

Следовательно, у некоторых несветящихся видов время от времени должны случайно возникнуть мутанты, ярко светящиеся непрерывно или при каких-то вполне определенных обстоятельствах, например при испуге (что повышает шансы на выживание). Только так может начаться процесс естественного отбора, приводящий к дальнейшему усовершенствованию биолюминесцентной системы.

Заметим в этой связи, что у многоклеточных животных обычно излучает свет не все тело, а только определенный тип клеток, так называемые фоточиты, сгруппированные обычно в специализированные органы свечения — фотифоры, которые у некоторых рыб и кальмаров устроены очень сложно. В ряде случаев эти органы светятся непрерывно из-за обитающих в них симбиотических светящихся бактерий. В прочих случаях свечение импульсное. Оно бывает внутриклеточным или секреторного типа. Послед-

нее возникает при смешении выбрасываемых из организма веществ, покрывающих его светящейся слизью или образующих в воде «световое облако».

Субстраты — люциферины и ферменты — люциферазы

Еще в 1885 г. французский ученый Дюбуа показал, что в биолюминесцентной реакции участвуют термостойкий субстрат, люциферин, и разрушающийся при нагревании фермент люцифераза. У разных организмов субстраты и ферменты, ответственные за биолюминесценцию, совершенно разные. Названия их чисто условные. Всего насчитывается больше 30 различных биохимических вариантов биолюминесценции, независимо возникших в ходе эволюции у различных организмов.

У некоторых светящихся организмов за свечение ответственны стойкие комплексы люциферина и люциферазы — фотопротеины. В таких комплексах люциферин временно или постоянно слит в одно целое с люциферазой.

Роль кислорода и антиоксидантное происхождение биолюминесцентных систем

Что же служит непосредственной причиной свечения?

Для свечения всегда необходим молекулярный (O_2) или атомарный кислород. У атома кислорода имеется несколько нестабильных возбужденных состояний. Переход атомов из возбужденного в устойчивое состояние сопровождается испусканием инфракрасных фотонов. Свечение же организмов обычно синее или зеленое. Это достигается суммированием энергий одновременного перехода из возбужденного состояния в основное двух или более атомов кислорода при одновременном разрыве $O-O$ - и $C-C$ -связей в так называемой диоксетановой перекиси. Диоксетановая перекись — нестойкое соединение. Она образуется и тут же распадается в процессе окисления субстрата — люциферина молекулярным кислородом или активными формами кислорода (АФК).

АФК — это анион с одним электроном на внешней орбите (супероксид), перекись водорода, синглетный кислород, крайне агрессивный окислитель — гидроксил-радикал и др. Они играют громадную роль в жизни организмов. Это «полуфабрикат» и «брак» дыхательных процессов, в которых нормальный конечный продукт — восстановленный кислород с четырьмя электро-

нами на внешней орбите в составе молекулы воды. Опасность АФК обусловлена их высокой способностью окислять «что попало» в живом организме: ДНК и РНК, белки и жиры и т.д.

Для защиты от АФК организмы вынуждены постоянно потреблять и синтезировать разнообразные вещества — антиоксиданты (витамины С и Е, каротиноиды и т.п.), а также ферменты, из которых главные — супероксиддисмутаза (преобразователь супероксида в перекись водорода) и каталаза (преобразует перекись водорода в воду).

Однако в умеренных количествах АФК нужны для жизнедеятельности и образуются посредством специальных ферментов (НАДФН-оксидазы и др.). АФК секретируются белыми кровяными тельцами для уничтожения микробов. Кроме того, они участвуют в регуляции клеточного деления, в запуске «запрограммированной смерти» клеток — апоптоза, в управлении тонусом кровеносных сосудов и во многих других жизненно важных процессах.

Мы специально затронули этот сложный вопрос, потому что работы последних лет показали: практически любой люциферин и многие люциферазы имели «добиолюминесцентную» функцию защиты организма от АФК. Эти субстраты и ферменты продолжают выполнять такую функцию у ближайших несветящихся родичей биолюминесцентных организмов. Достаточно оказалось одной малой «поломки» исходной (окислительной) реакции, чтобы в ходе ее появилось хорошо заметное свечение. Возник новый признак — биолюминесценция. Его закрепил естественный отбор. Пока природой таких предполагаемых нами мутаций никто специально не занимался. Само их обнаружение — дело будущего.

Активируемые ионами кальция фотопро-теины

Вернемся, однако, к экворее. В 1961–1962 гг. американские ученые Джонсон и Шимомура выделили из нее способный к свечению белковый комплекс, состоящий из белка — люциферазы (названной экворин) и имидазолпиразинового производного — люциферина, который назвали целентеразином (от *Coelenterata* — кишечнополостные). Оказалось, он светится в присутствии свободного кальция и некоторых других двух- или трехвалентных катионов (но не магния, который это свечение ослабляет). Позже нашли похожие белки в колониальных гидроидных полипах *Obelia longissima* и *O. geniculata*, гребневиках, радиоляриях. Белок из полипов обелий (*Obelia*) был назван обелин.

Во всех случаях оказалось, что светится комплекс люциферазы с перекисью предварительно присоединенного к ней и ею же окисленного люциферина (у всех вышеупомянутых организмов это целентеразин). В момент присоединения кальция к люциферазе пространственная структура (конформация) этого белка изменяется так, что он утрачивает связь с перекисью люциферина. Перекись при этом теряет стабильность и превращается в окисел, попутно отделяя CO_2 и испуская синий свет.

Яркость такого свечения достаточно велика. В связи с этим вскоре после выделения экворина родилась идея использовать этот белок и другие ему подобные (например, обелин) как индикаторы свободных ионов кальция во всевозможных клетках.

В 1967 г. английские ученые Эшли и Риджуэй с помощью стеклянного микроэлектрода впрыснули экворин в гигантское мышечное волокно морского желудя (сидячего морского ракообразного). Используемая установка позволяла одновременно регистрировать мембранный потенциал клетки, ее свечение, создаваемое впрыснутым экворинном, и натяжение. Так было обнаружено, что именно ионы кальция, цитоплазматическая концентрация которых повышается в 10 и более раз при электрическом раздражении клетки, запускают мышечное сокращение.

В дальнейшем сотни новых работ показали, что ионы кальция запускают самые разные клеточные процессы: мышечные и немышечные сокращения, выброс нейромедиаторов в синаптическую щель, всевозможные виды секреции и т.д. Были синтезированы новые флуоресцирующие индикаторы Ca^{2+} и других ионов, проникающие, в отличие от светящихся белков, сквозь клеточную мембрану. Однако начало этой новой эре положили, несомненно, светящиеся белки экворин и обелин.

Зеленый флуоресцентный белок GFP

Еще Джонсон и Шимомура, выделяя экворин, отметили, что экворея светится зеленым светом с максимумом интенсивности при длине волны 508 нм. Между тем выделенный экворин излучает синий свет с максимумом при 465 нм.

Оказалось, что кроме экворина в фотогенных тканях медузы присутствует другой белок. Возбуждаясь под действием синего или ультрафиолетового излучения, этот белок испускает зеленый свет — флуоресцирует. За это свойство белок назвали зеленым флуоресцентным белком (GFP — от green fluorescent protein, рисунок 2).

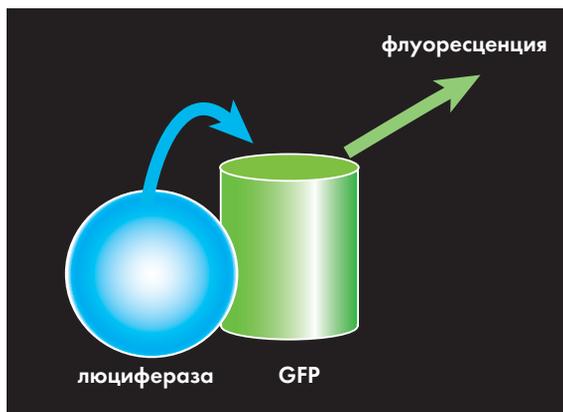


Рисунок 2. Зеленый флуоресцентный белок GFP — часть биолюминесцентной системы медузы *Aequorea victoria*. Синий свет экворина возбуждает GFP, и он продуцирует зеленую флуоресценцию.

Ген GFP был клонирован в 1992 г. Чуть позднее получили белок в виде кристалла. Оказалось, что молекула GFP укладывается в структуру, напоминающую бочку с одиннадцатью так называемыми бета-складками — завернутыми винтом вертикальными прутьями. «Дно» и «крышку» образуют альфа-спиральные участки того же самого белка. А внутри этой конструкции спрятана флуорофорная часть (хромофор).

Хромофор формируется самой же полипептидной цепью в ходе автокаталитических реакций дегидрогенизации (отнятия двух атомов водорода) и окисления молекулярным кислородом остатка аминокислоты — тирозина. Окисленный тирозин реагирует с другой аминокислотой в той же цепи — глицином. В результате возникает система так называемых сопряженных связей, способная к флуоресценции. Она поглощает «ультрафиолетовые» или «синие» фотоны и испускает в ответ фотоны с меньшей энергией, соответствующие сине-зеленому свету (рисунок 3).



Рисунок 3. Кристаллическая структура GFP: бочка, внутри которой образуется хромофор.

Но не только уникальная структура и способность к флуоресценции привлекли внимание исследователей. GFP оказался уникальным инструментом для прижизненного мечения клеток и клеточных структур. Введение гена GFP в клетки большинства организмов от бактерий до высших млекопитающих и растений приводило к тому, что клетки начинали светиться зеленым светом при облучении ультрафиолетом. Ведь для того, чтобы внутри молекулы GFP сформировался и начал светиться хромофор, не требуется никаких внешних добавок (кофакторов или субстратов), нужен только молекулярный кислород (рисунок 4).

Вскоре GFP стал чрезвычайно популярен как прижизненный маркер. К 2002 г. общее число работ с применением GFP как генетического маркера превысило 9000.

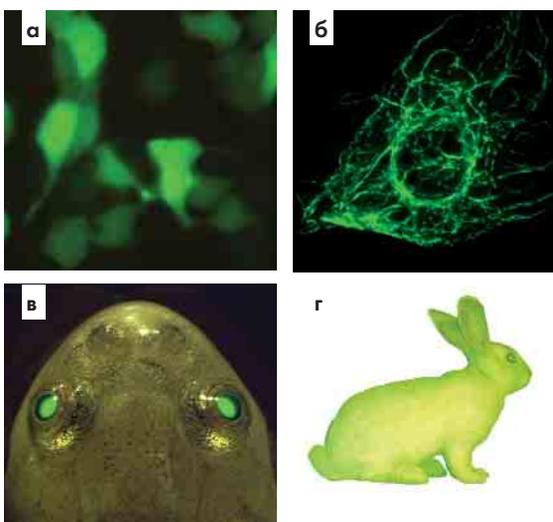


Рисунок 4. Мечение с помощью GFP. (а) — мечение клеток; (б) — белков; (в) — органов; (г) — тканей.

Разноцветные флуоресцентные белки

Вскоре после появления GFP возникло желание одновременно окрашивать сразу несколько структур или белков в клетке, следить за их взаимодействиями. Однако, хотя подобные GFP белки и были описаны у ряда светящихся представителей двух классов кишечнополостных животных — гидроидов (*Aequorea*, *Obelia* и др.) и кораллов (морское перо *Renilla*), не было клонировано больше ни одного гена. К тому же все описанные белки были зелеными.

Попытки создать мутанты GFP с измененными спектральными свойствами привели лишь к частичному успеху: были созданы слегка более голубой и слегка более желтый варианты, однако

одновременное их отслеживание в клетке было сопряжено с понятными трудностями — спектры этих белков отличались не настолько сильно, как хотелось.

Прогресс в расширении цветовой палитры тормозило сложившееся убеждение, что все GFP-подобные белки обязательно встроены в биолюминесцентные системы как преобразователи синего света. Мысль о том, что они могут функционировать совсем в иных качествах, выполняя совершенно другие функции, и при этом вовсе не обязательно быть «зелеными» и «флуоресцирующими», долго никому не приходила в голову.

Осенью 1998 г. в работу включилась наша исследовательская группа. Один из участников проекта и соавтор этой статьи Ю.А. Лабас обратил внимание, что классы кишечнополостных Hydrozoa и Anthozoa, у которых обнаружены GFP, разошлись еще в глубоком докембрии. Следовательно, весьма вероятно, что все эти организмы унаследовали GFP от общих неболюминесцентных предков. В то же время крупные подвижные животные с хорошо развитым зрением — рыбы, головоногие моллюски, высшие раки (т.е. потенциальные враги, а значит, и эволюционный повод обретения биолюминесценции) — появились не ранее кембрийского периода. Стало быть, у GFP-подобных белков, как и у других компонентов системы свечения (люциферинов, люцифераз и т.д.), могли быть какие-то добиолюминесцентные функции. Тогда почему бы им ни сохраниться и по сей день?

В самом деле: у целого ряда несветящихся (не способных к биолюминесценции) коралловых полипов, живущих в морских аквариумах Московского зоопарка и у любителей, при освещении ультрафиолетом или голубым светом появляется яркая флуоресценция. У некоторых — это яркая зеленая флуоресценция, напоминающая флуоресценцию GFP эквореи. Так, например, флуоресцируют кончики щупалец актинии *Anemonia majano*. У других коралловых полипов флуоресценция — желтая, оранжевая или ярко красная (рисунок 5).

Большинство ученых полагали в то время, что за флуоресценцию неболюминесцентных коралловых полипов ответственны какие-то низкомолекулярные солнцезащитные «пигменты». А вдруг это не так?

Сколь ни безумными казались эти мысли, мы начали поиск таких белков. Сначала выделили матричную РНК (мРНК) из ярко окрашенных участков тела шести разных видов мягких кораллов — в первую очередь из флуоресцирующих кончиков щупалец актинии *A. majano*. Потом



Рисунок 5. Флуоресценция и окраска неболюминесцентных коралловых полипов.

получили из мРНК кодирующую ДНК (кДНК) и попробовали «выловить» из нее молекулы, сходные по нуклеотидной последовательности с геном зеленого белка эквореи. «Ловлю» осуществляли с помощью праймеров — синтезированных одноцепочечных кусочков этого гена, способных заякорить на себе комплементарную цепь ДНК. Для такой цели синтезировали участки в 20–25 нуклеотидов, интуитивно показавшиеся самыми консервативными в гене GFP из эквореи *Aequorea victoria*. «Пойманный» ген пересадили в геном кишечной палочки. И она заблестала ярким зеленым цветом!

Вскоре мы узнали от известного московского аквариумиста А.Романько, что в его морском аквариуме живет *Ricordia yuma* — удивительная дискосома (дискосидная актиния без щупалец), которая при синем освещении флуоресцирует ярким красно-оранжевым цветом (у других дискосом он сине-зеленый). Само собой разумеется, мы заподозрили, что и у этой дискосомы есть белок, подобный GFP. Далее дело пошло быстрее. Сравнивая последовательность GFP и нового белка из *A. majano*, легче было конструировать праймеры для поиска новых вариантов. И вот не прошло и трех месяцев, как в нашей

коллекции появились не только зеленые, но и желтые и даже красные флуоресцентные белки.

Гены вновь открытых белков и GFP из *A. victoria* оказались гомологичными, но степень идентичности соответствующих им аминокислотных последовательностей не превышала 40%. Это, конечно, не так уж мало, если учесть, что ветви кораллов и гидроидов разделились примерно полмиллиарда лет назад! Однако вероятность поймать праймером фрагмент гена с полным совпадением нуклеотидов при первой попытке Михаила Матца (8-й выпуск биокласса) не превышала вероятность выигрыша в «Спортлото». Но — чудо. Иначе не скажешь. Одним словом, в самом начале охоты за генами белков, подобных зеленому флуоресцирующему, всем участникам сопутствовало фантастическое везение.

В дальнейшем работа стала почти рутинной. И вот ее сенсационный результат: за большинство флуоресцентных и даже обычных окрасок (а это все цвета радуги!) несветящихся видов кораллов ответственны вовсе не разнородные низкомолекулярные «пигменты» и их комплексы с белками, как полагали ранее, а своеобразные белки одного семейства с GFP. У них одинаковые или очень близкие молекулярная масса, число аминокислотных остатков (229–266) и, что куда важнее, их третичная структура. Та же самая бочкообразная молекула и, главное, сходным образом устроенный хромофор.

Но только ли у коралловых полипов окраска и флуоресценция определяются GFP-подобными молекулами? Ведь и многие медузы вовсе не способные к биолюминесценции обладают окраской или флуоресценцией. Чтобы ответить на этот вопрос, мы предприняли поиск окрашенных или флуоресцирующих веществ у разных медуз. В результате были клонированы гены

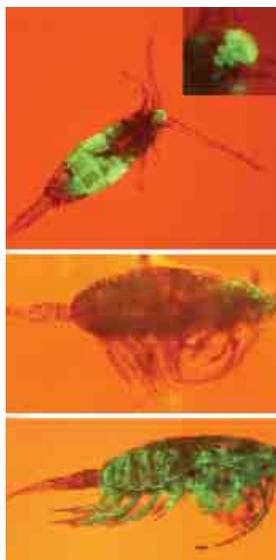


Рисунок 6. За флуоресценцию веслоногих рачков-копепод ответственны GFP-подобные белки.

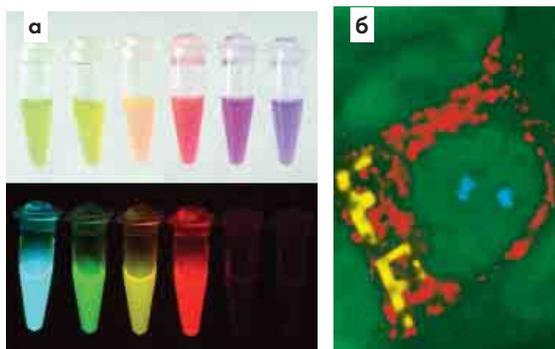


Рисунок 7. Разноцветные GFP-подобные белки коралловых полипов.

(а) — Коллекция очищенных рекомбинантных белков при обычном освещении (вверху) и их флуоресценция (внизу); (б) — многоцветное мечение клеточных структур с помощью разноцветных флуоресцентных белков: зеленый флуоресцентный белок окрашивает цитоплазму клеток; митохондрии окрашены с помощью необратимо активированного красного разжигающегося белка (о котором речь пойдет ниже), связанного с сигналом локализации в митохондриях; синий цвет получен за счет экспрессии химерного белка, состоящего из флуоресцентной метки и фибрилларина (белок, локализующийся в ядрышках). Буквы «FP» (желтый псевдоцвет) были получены путем обратимого разжигания флуоресценции красного разжигающегося белка (до его необратимой активации).

новых флуоресцентного желтого и нефлуоресцентного (окрашенного) красного белков. А вот синяя окраска края тела медузы корнерота, оказалось, не имеет никакого отношения к GFP. За нее ответственен комплекс белка уникальной структуры и неизвестного пока низкомолекулярного соединения.

Однако настоящей сенсацией стало клонирование генов GFP-подобных белков, ответственных за ярко-зеленую флуоресценцию небиолюминесцентных морских веслоногих рачков из семейства Pontellidae (рисунок 6).

Происхождение этого белка у организмов, столь неродственных кишечноротовым, пока остается загадкой.

Новые флуоресцентные белки и качественно новые возможности

Открыв цветные белки, мы получили возможность наблюдать в одном и том же объекте биосинтетическую активность сразу нескольких разных генов, различаемую по цветам флуоресценции (рисунок 7). Аналогично, появилась возможность наблюдать за развитием сразу нескольких клеточных клонов, вводя в них матричные РНК GFP-подобных белков разного цвета. Так, наш коллега А.Г. Зарайский инъецировал мРНК двух цветных белков в эмбрион шпорцевой

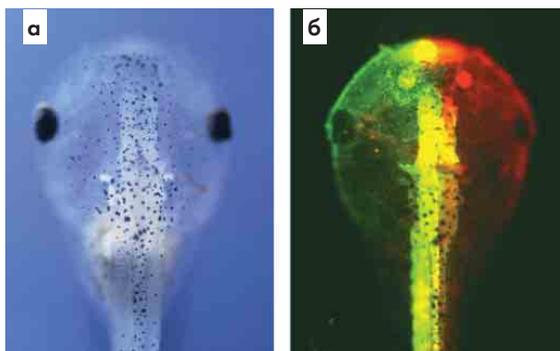


Рисунок 8. Головастики шпорцевой лягушки, экспрессирующей флуоресцентные белки из коралловых полипов.

На стадии восьми бластомеров синтетическая РНК, кодирующая два флуоресцентных белка, была заколота в два (правый и левый) дорсальные бластомеры эмбриона. Фотографии были сделаны через неделю на стадии головастика при: (а) — обычном освещении; (б) — под флуоресцентным биноклем (компьютерное наложение фотографий зеленой и красной флуоресценции).

лягушки на стадии восьми бластомеров: красного (от *Ricordia yuma*) — в левый спинной зачаток и зеленого (от *A. majano*) — в правый. Левая половина выросшего головастика стала красной, а правая — зеленой. Их разделяла «желтая» полоса посередине тела, где смешивались цветные клетки (рисунок 8).

Однако одним лишь расширением цветовой палитры дело не ограничилось. С появлением новых флуоресцентных белков открылись принципиально новые возможности для слежения и манипуляции с живыми клетками и белками.

Флуоресцентный таймер

Оказалось, что некоторые флуоресцентные белки коралловых полипов (одни были найдены в природе, а другие получены путем введения точечных замен в последовательности природных белков) меняют цвет флуоресценции в течение времени. Первый такой белок, названный флуоресцентным таймером, сначала продуцировал зеленую флуоресценцию, которая постепенно, по мере созревания белка, заменялась на красную.

Это удивительное свойство позволяет отслеживать изменение экспрессии генов во времени. В клетке экспрессия различных генов регулируется специальными последовательностями ДНК — промоторами. Промоторы опознаются специальной группой клеточных белков — регуляторов транскрипции, — которые могут активировать или подавлять экспрессию гена. Известны промоторы, которые активированы всегда и во всех клетках, другие работают только в клетках определенного типа, третьи активируются лишь в определенный момент развития организма.

Если поместить последовательность ДНК, кодирующую белок-таймер, под промотор какого-нибудь гена, регуляцию экспрессии которого надо изучить, и ввести полученную конструкцию в клетку, то при активации промотора появится сначала только зеленая флуоресценция. Затем постепенно зеленая форма белка будет переходить в красную, и клетка станет желтой. Она будет желтой, пока будет работать промотор, однако вскоре после его инактивации, уровень зеленой флуоресценции начнет падать. Отслеживая уровень зеленой и красной флуоресценции в клетке можно рассчитать время начала и остановки работы промотора.

Фотоактивируемые и фотопереключаемые белки

Другое удивительное открытие касается флуоресцентных белков, которые меняют свои флуоресцентные свойства при облучении светом определенной длины волны. Первым был открыт разжигающийся красный белок из *Anemonia sulcata*.

При экспрессии этого белка в клетке он не флуоресцирует, а дает малиновую окраску. Однако при освещении зеленым светом белок разгорается и начинает светиться красным светом. Разжигание природного белка было обратимым, и флуоресценция быстро исчезала (рисунок 9а).

Чуть позднее мы получили мутантный белок, который был способен как к обратимому, так и необратимому разжиганию. Необратимо разожженный белок можно хранить в течение долгого времени — он сохраняет флуоресцентные свойства. На рисунке 9б показана пробирка с таким активированным белком, сфотографированная через год после того, как на него посветили зеленым светом.

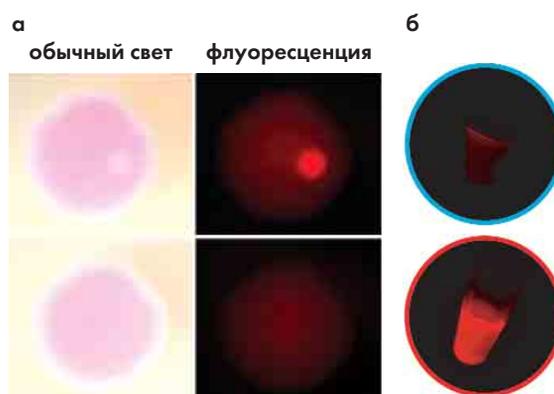


Рисунок 9. Разжигающийся красный белок.

(а) — Экспрессия в кишечной палочке. На верхней панели показана колония, участок которой был освещен зеленым светом. В нем видна яркая красная флуоресценция. На нижней панели — та же колония через 5 мин. Флуоресценция погасла. (б) — Необратимое разжигание. Вверху — неактивированный белок; внизу — через год после разжигания.

Как оказалось, почти из любого флуоресцентного белка можно получить мутант, способный менять свои свойства при облучении. Вот только свойства у этих белков самые разные. Так из GFP и его ближайших гомологов из близких видов медуз, а также из GFP-подобных белков некоторых кораллов были получены фотопереключаемые производные.

При освещении светом определенной длины волны эти белки меняют цвет своей флуоресценции. К таким белкам относятся, например, PS-CFP — белок, меняющий цвет флуоресценции с голубого на зеленый под действие ультрафиолетового света, и Dendra — способный к фотоконверсии из зеленого в красный (рисунок 10).

Фотоактивируемые и фотопереключаемые белки стали очень популярными инструментами для отслеживания перемещения клеток, клеточных органелл и белков в системах *in vivo*. На рисунке 11 показано, как белок PS-CFP позволил проследить в режиме реального времени обмен содержимым между двумя клеточными эндосомами.

Известно что, при гетерогенной экспрессии допаминовый транспортер попадает в эндосомы. Для исследования того, могут ли эндосомы обмениваться своим содержимым, последовательность гена PS-CFP была пришта к последовательности, кодирующей допаминовый транспортер, и экспрессирована в эукариотической клеточной линии. Далее химерный белок был «перекрашен» в некоторых эндосомах. Теперь мы получили возможность наблюдать под флуоресцентным микроскопом за перекрашенными эндосомами и их взаимодействием с остальными эндосомами (другого цвета) внутри живой клетки.

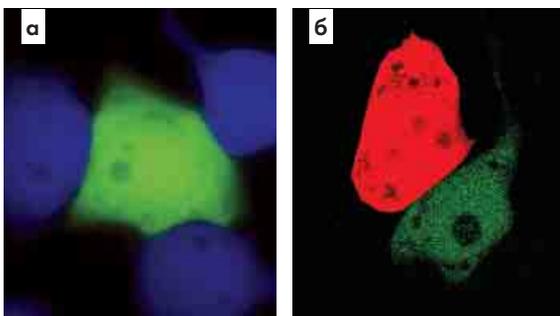


Рисунок 10. Белки, меняющие цвет флуоресценции при облучении.

(а) — белок PS-CFP, экспрессированный в клетках млекопитающих. В центральной клетке флуоресценция была изменена с помощью облучения ультрафиолетовым светом.

(б) — белок Dendra в клетках млекопитающих. Одна из клеток была облучена синим светом (она имеет красную флуоресценцию).

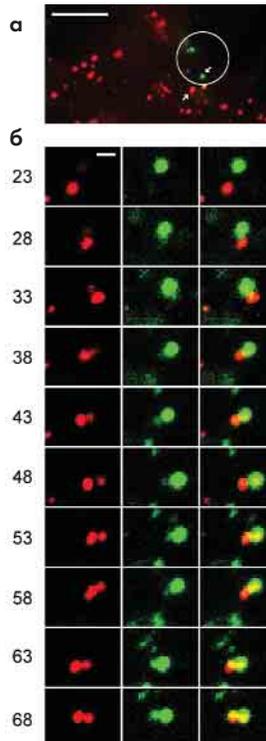


Рисунок 11. Обмен содержимым между двумя эндосомами в клетке.

(а) — PS-CFP был активирован с помощью прицельного облучения в двух эндосомах (обведены). Шкала — 10 μm . Стрелками показаны эндосомы, за которыми велось наблюдение;

(б) — сигналы, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа в ECFP- и FITC-каналах (фильтры для слежения за голубой и зеленой флуоресценцией), показаны красным и зеленым псевдоцветом соответственно. В третьей колонке — результат наложения изображений, полученных в ECFP- и FITC-каналах. Слева указано время, прошедшее со времени активации PS-CFP (мин). Шкала — 1 μm .

Белок-киллер

Еще одним новым инструментом, представляющим интерес для исследователей, стал белок, способный под действием света производить АФК. Как правило, GFP-подобные белки не обладают таким свойством, ведь, возможно, одной из их функций была (и остается?) защита от АФК. Однако при проверке множества белков из нашей коллекции, как природных, так и мутантов, для одного было показано, что он становится токсичным для клеток при облучении светом определенной длины волны.

Мы использовали простой тест: гены, кодирующие флуоресцентные белки, вводили в кишечную палочку и освещали культуру светящихся бактерий светом разных длин волн. При этом измеряли количество живых бактерий до и после облучения.

Флуоресцентный мутант красного окрашенного белка из антмедузы, облучение которого в клетках бактерий приводило к их массовой гибели, получил название KillerRed (красный киллер). Проверка показала, что его индуцируемая светом токсичность действительно определяется продукцией АФК. Иными словами, найденный нами белок оказался *фотосенсетайзером*. При облучении зеленым светом он терял способность флуоресцировать и начинал производить АФК.

Все ранее известные фотосенсетайзеры (молекулы, облучение которых светом определенной длины волны приводит к выделению АФК) — химические соединения. Очевидно, что

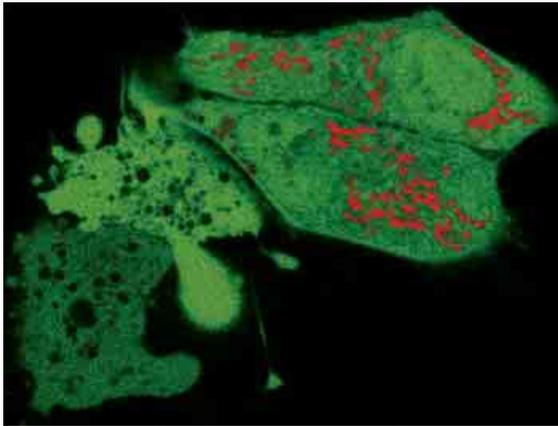


Рисунок 12. Направленное убийство клеток с помощью белка KillerRed, экспрессированного в митохондриях. Две нижние клетки были облучены зеленым светом. Это привело к обесцвечиванию белка KillerRed в митохондриях и клеточной смерти (сравните с двумя верхними клетками, которые не подвергались облучению).

возможности их введения в клетки и связывания с биологическими молекулами ограничены.

В отличие от химических аналогов, KillerRed является генетически кодируемым фотосенситайзером, его можно непосредственно экспрессировать в клетке. Можно также сконструировать молекулу ДНК, которая будет кодировать так называемый химерный белок, состоящий из молекулы KillerRed и любого клеточного белка-партнера.

Однако зачем это нужно? Существует такой подход к исследованию функции белков в клетке или роли клетки в организме: исследуемый объект инактивируется каким-либо образом, и исследователь наблюдает, к каким изменениям в системе приводит такая инактивация.

KillerRed позволяет направленно инактивировать клетки или белки прямо внутри живой сформированной системы. Достаточно просто посветить в нужное место. При этом может быть, например, инактивирован белок в какой-

либо части клетки или единственная клетка в организме (это важно, например, при выяснении клеточной судьбы в ходе развития).

На рисунке 12 показаны клетки, которые экспрессируют белок KillerRed, связанный с сигналом локализации в митохондриях. Две клетки наверху — необлученные. Митохондрии клеток обладают красной флуоресценцией за счет накопления в них белка KillerRed. Зеленый цвет цитоплазмы клеток определяется другим флуоресцентным белком-маркером, который позволяет следить за клетками после облучения зеленым светом (как вы помните, флуоресценция KillerRed при этом пропадает). Это видно на примере двух нижних клеток, которые подверглись направленному облучению. Красная флуоресценция отсутствует, а клетки имеют совершенно другую форму. Активация KillerRed в этих клетках увеличила продукцию АФК. А повышение концентрации АФК в митохондриях является сигналом для включения механизма апоптоза (программируемой клеточной смерти).

Заключение

Возможности применения флуоресцентных белков для исследования живых систем не ограничиваются приведенными выше примерами. Уже сегодня активно идет разработка биосенсоров, основанных на создании флуоресцентных белков, меняющих спектральные характеристики при взаимодействии с важными для жизни клетки веществами (например, Ca^{2+} , H_2O_2 , NO). Еще более захватывающие перспективы открываются при использовании фотоактивируемых белков для создания нового поколения световых микроскопов, с разрешающей способностью выше теоретического предела в $1/2$ длины волны. Но эти разработки еще слишком молоды, чтобы оценить их реальное значение для исследователей.

Митохондрии, митохондриальная ДНК и соматические митохондриальные мутации: имеют ли они отношение к старению?

К. Храпко



Константин Храпко,
5-й выпуск биокласса,
школа № 57 (1980 г.),
закончил Химфак МГУ
(1985 г.), к.х.н., профессор в
Медицинской Школе Гар-
вардского университета,
khrapko@hms.harvard.edu

Митохондрии — клеточные органеллы ответственные за тканевое дыхание — потомки симбионта древних эукариот, большая часть генома которого была перенесена в геном клетки-хозяина, возможно, чтобы избежать высокого уровня мутаций, характерного для митохондрий. Однако перенести геном полностью не удалось, и остаток этого генома — современная митохондриальная ДНК (мтДНК) — аккумулирует с возрастом большое количество мутаций, которые к тому же склонны к внутриклеточной клональной экспансии, так что их участие в процессе старения представляется весьма вероятным. Однако, хотя митохондриальная теория старения была сформулирована более 30 лет назад, она до сих пор ждет подтверждения. Мы обнаружили очень высокий уровень мутаций митохондриальной ДНК в пигментных нейронах черной субстанции, т.е. той области мозга, которая бывает поражена при болезни Паркинсона. Мы подозреваем, что эти мутации могут иметь отношение к «сенильному паркинсонизму» — синдрому, широко распространенному среди пожилых людей.

Митохондрии и дыхание. АТФ и радикалы

Митохондрии — клеточные органеллы, окруженные двойной мембраной и содержащие собственную ДНК, — имеются почти во всех эукариотических клетках. У митохондрий большое число разнообразных функций, из которых основная — производство АТФ путем окисли-

тельного фосфорилирования. Детали этого процесса очень интересны, но для последующего обсуждения важны только некоторые общие его аспекты.

Окислительное фосфорилирование — многоступенчатая окислительно-восстановительная реакция, в которой участвуют несколько ферментов (называемых электронно-транспортной цепью, или митохондриальными комплексами I, II, III и IV), находящихся на внутренней мембране митохондрии. Эти ферменты последовательно передают друг другу электрон, полученный тем или иным способом из органических молекул, пищи. Каждый последующий фермент связывает электрон немного сильнее, чем предыдущий, поэтому при каждой передаче освобождается небольшая порция энергии (т.е. электрон теряет энергию). Последний из ферментов, комплекс IV, передает четыре обессиленных таким образом электрона и четыре иона водорода молекуле кислорода и превращает ее в две молекулы воды. Таким образом митохондрии осуществляют окисление органического вещества кислородом, т.е. тканевое дыхание.

Многоступенчатая система ферментов нужна для того, чтобы разбить слишком большую энергию, которая бы выделилась, если бы электрон отправить прямо кислороду, на маленькие порции, удобные клетке. Эти небольшие порции энергии ферменты цепи частично используют для выталкивания ионов водорода из митохондрии в пространство между двумя мембранами. В результате, внутри митохондрии среда щелочная, а в межмембранном пространстве — кислая. В этом разделении запасается энергия (ведь если смешать кислоту и щелочь, выделится тепло). А потом еще один фермент, комплекс V, пускает протоны обратно внутрь митохондрии (т.е. смешивает немного кислоты и щелочи), но делает это так аккуратно, что тепло почти не выделяется, а энергия используется для фосфорилирования АДФ до АТФ и запасается теперь в высокоэнергетической фосфатной связи.

Для последующего обсуждения необходимо иметь в виду, что окислительное фосфорилиро-

вание — довольно токсичный процесс. Ведь электроны, путешествующие по электронно-транспортной цепи, могут взаимодействовать с молекулярным кислородом не только там, где это должно происходить (в комплексе IV). В этом месте созданы условия для полного и безопасного восстановления кислорода до воды. В других местах цепи электрон тоже изредка может оказаться захваченным кислородом (вместо того, чтобы, как положено, быть переданным на следующую ступень цепи). Такой захват неспаренного электрона приводит к образованию активных радикалов, способных реагировать с любыми органическими молекулами в клетке, включая ДНК, белки и жиры. Естественно, что эти опасные побочные реакции особенно легко происходят тогда, когда электронная цепь перегружена электронами, например если какой-нибудь нижестоящий фермент цепи инактивирован ингибитором или мутацией.

Происхождение и деградация митохондриального генома

По-видимому, митохондрии произошли от древних симбиотических бактерий, которые жили внутри примитивных одноклеточных эукариотов. Отсюда и двойная мембрана (симбионт, наверное, был окружен клеточной мембраной), и ДНК митохондрий. В ходе коэволюции, вероятно, оказалось, что многие процессы, необходимые симбионту, могут выполняться белками клетки хозяина, а соответствующие бактериальные гены за ненадобностью могут быть (и были) вырезаны. Другие гены, которых у клетки-хозяина не было, видимо, были перенесены из митохондриальной ДНК в ядерную. Постепенно генов в ДНК симбионта (теперь уже ставшего, конечно, органеллой) становилось все меньше и меньше. Почему клетке был выгоден такой перенос генов, точно не известно. Возможно (и мы обсудим это позже), что ДНК в митохондриях слишком подвержена мутациям (например, из-за кислородных радикалов электронно-транспортной цепи), так что заключенную в ней информацию надежнее хранить в ядре клетки. Казалось бы, митохондриальная ДНК должна была бы исчезнуть совсем, но процесс переноса генов в ядро остановился около 800 миллионов лет назад, когда в митохондриальной ДНК все еще оставалось чуть больше десятка белок-кодирующих генов. Интересно, что все 13 генов, оставшиеся в мтДНК животных (у растений и дрожжей все немного иначе), кодируют трансмембранные

субъединицы комплексов I, III, IV, и V, т.е. субъединицы, которые погружены в митохондриальную мембрану.

Почему же именно эти 13 генов остались в мтДНК? По-видимому, дело в том, что, будучи трансмембранными, эти белки содержат весьма гидрофобные (жирные) последовательности аминокислот, которые крайне неохотно вылезают из гидрофобного же окружения мембраны в водную среду. Если бы гены этих белков оказались в ядре, то соответствующие полипептиды приходилось бы протаскивать через наружную митохондриальную мембрану (в которой они, конечно же, пожелали бы накрепко застрять) и межмембранное пространство и дальше встраивать во внутреннюю мембрану. Вероятно, древние эукариоты из нашей эволюционной ветви не нашли способа решить эту (чрезвычайно сложную) задачу.

Как бы то ни было, раз внутри митохондрий остались гены, то нужен аппарат их экспрессии — транскрипция и трансляция. Все белки, осуществляющие митохондриальную транскрипцию и трансляцию, кодированы в ядре и импортируются в митохондрию. Однако, по-видимому, имеются трудности с доставкой в митохондрии РНК, так что все РНК-компоненты трансляции (транспортные и рибосомные РНК) тоже кодированы в мтДНК. В результате генетический код митохондрий оказался независимым от кода клетки. А так как структурных генов в мтДНК так мало, то не исключена возможность изменения кода (так как число необходимых поправок в случае изменения смысла кодона может быть невелико и не смертельно). И действительно, код митохондрий слегка отличается от универсального, причем разные ветви эволюционного дерева приобрели разные изменения. Скажем, у хордовых четыре кодона соответствуют другим аминокислотам/стоп сигналам, чем у иглокожих. У обеих групп по четыре отличия от универсального кода (два общих, произошедших еще до того как хордовые разошлись с иглокожими, и по два различных, произошедших после расхождения (Saccone *et al.*, 2002).

Итак, митохондриальная ДНК кодирует (используя нестандартный код) 13 белков, 2 рибосомальные и 22 транспортные РНК. мтДНК чрезвычайно компактна: все это умещается на 16 000 парах оснований кольцевой молекулы. Кодированные последовательности расположены одна за другой без некодирующих пропусков. Имеется всего одна небольшая (около 1000 оснований) регуляторная область, отвечающая за репликацию и транскрипцию всей мтДНК.

В некоторых типах клеток мутации мтДНК имеются в избытке

Как и всякая ДНК, митохондриальная ДНК подвержена мутациям. Вообще-то, мутации могут происходить или из-за самопроизвольных ошибок ДНК-полимеразы (этот фермент копирует ДНК, имеет ограниченную точность), или из-за того, что копируемая ДНК подверглась химической модификации, так что полимеразы не знает, как копировать модифицированный нуклеотид, и совершает ошибку как бы не по своей вине. Впрочем, ошибки не ограничиваются неправильно скопированными нуклеотидами (точечными мутациями). ДНК-полимераза может в процессе синтеза пропускать участки ДНК, что приводит к делециям. Делеции также могут быть результатом другого процесса — рекомбинации. Как и точечные мутации, делеции могут происходить самопроизвольно, или быть обусловлены модификациями ДНК.

Митохондриальная ДНК находится в непосредственной близости от электронно-транспортной цепи, которая, как мы обсуждали выше, является источником химически активных радикалов. Кроме того, в отличие от ядерной ДНК, мтДНК не защищена гистонами и значительную часть времени при репликации находится в одноцепочечной форме. Все это (и не только это) приводит к тому, что количество химических модификаций в мтДНК значительно выше, чем в ядерной. Это, в свою очередь, приводит к тому, что скорость накопления мутаций в мтДНК существенно выше, чем в ДНК ядра клетки.

Рассмотрим, например, статистику по мутациям, вызывающим наследственные болезни. Митохондриальная ДНК по числу пар оснований составляет всего около 0.001% генома клетки, но доля болезней, вызываемых мутациями мтДНК, составляет примерно 1% от всех наследственных болезней. Таким образом, в каком-то смысле оказывается, что пара оснований мтДНК примерно в 1000 раз важнее для здоровья, чем пара оснований ядерной ДНК! Такая огромная разница вызвана отчасти компактностью мтДНК: плотность кодирующих последовательностей в ней примерно в 100 раз больше, чем в ядерной ДНК, а отчасти тем, что скорость накопления наследуемых мутаций в расчете на пару оснований в мтДНК примерно в 10 раз выше, чем в ядерной.

Подавляющее число мутаций, происходящих в ДНК, конечно, не передаются по наследству. Это соматические мутации, которые случаются в ДНК соматических (т.е. неполовых) клеток. Такие мутации могут быть крайне опасными: например, соматические мутации ядерной ДНК

могут вызывать рак. Соматические мутации обычно накапливаются с возрастом, поэтому естественно подозревать, что они могут быть как-то связаны со старением. По некоторым оценкам, скорость накопления соматических мутаций в мтДНК в 100–1000 выше, чем в ядерной ДНК. Это означает (вспомним: ядерный геном в 100 000 раз больше, а митохондриальный в 100 раз компактнее; нужно только все эти числа правильно перемножить/поделить), что общее число мутаций в мтДНК может быть сравнимо (точнее говоря, примерно составляет от 1/10 до равного количества) с общим числом мутаций в ядерной ДНК. Эти оценки очень грубы, но интуитивно, сбалансированное соотношение представляется оправданным. Логика примерно такая: скорости накопления соматических мутаций в мтДНК и ядерной ДНК изменяются практически независимо. И те, и другие мутации приводят к необратимым дефектам в клетках. Поскольку эти дефекты представляют опасность для организма в целом, эволюция будет стремиться снизить скорость накопления мутаций. Однако, если главная проблема — это, скажем, мутации ядерной ДНК, то давление отбора будет улучшать ферменты, ответственные за сохранность ядерной ДНК, а митохондриальные ферменты улучшаться не будут, и наоборот. Так постепенно то одна, то другая система будет подвергаться улучшению, поддерживая приблизительный баланс. Впрочем, я вставил эти рассуждения главным образом для красного словца, они, конечно, слишком неопределенны, чтобы помочь понять, имеют ли митохондриальные мутации отношение к старению.

Более информативен тот факт, что абсолютная частота точечных мутаций митохондриальной ДНК, по крайней мере в некоторых тканях, весьма велика, например в мозге, каждая молекула мтДНК содержит, по некоторым сообщениям, в среднем около двух (!) точечных мутаций, хотя не исключено, что это преувеличение (Khrapko *et al.*, 2006). Учитывая то, что больше половины всех возможных точечных мутаций в мтДНК приводят по крайней мере к замене аминокислоты, это наводит на мысль, что мутации должны играть хоть какую-то роль в состоянии хотя бы некоторых соматических тканей. Впрочем, имеется одно важное обстоятельство, которое необходимо обсудить.

МтДНК мультиплоидна; вредной мутацией стать непросто

В отличие от ядерной ДНК, которая обычно присутствует в двух копиях (диплоидные клет-

ки), мтДНК, как правило, находится в количестве от нескольких сотен до нескольких тысяч на клетку (в этом смысле мтДНК мультиплоидна). Это естественно: в клетке содержится множество митохондрий, а каждая митохондрия обычно содержит несколько копий ДНК. Митохондриальная ДНК, как и ядерная, периодически реплицируется: ведь когда клетка делится, ее митохондрии распределяются, видимо, случайным образом между дочерними клетками, поэтому репликация мтДНК и деление митохондрий (подобно делению бактерий) необходимо для поддержания постоянного числа митохондрий в делящихся клетках. Впрочем, в неделящихся клетках, например нейронах, тоже происходит репликация мтДНК и деление митохондрий. Дело в том, что митохондрии довольно быстро приходят в негодность (видимо, из-за обилия в них кислородных радикалов), после чего их заглатывают и переваривают лизосомы. Как именно это происходит, не совсем понятно, но точно известно, что время жизни митохондрий и мтДНК довольно ограничено (порядка нескольких недель). Поэтому даже в неделящихся клетках митохондриям приходится расти и делиться, чтобы поддерживать постоянную численность.

Таким образом, молекулы мтДНК в клетке можно рассматривать как популяцию, особи которой рождаются, умирают и, конечно, мутируют. Но мутагенез — случайный процесс, и естественно ожидать, что на разных копиях происходят разные мутации. Казалось бы, со временем в клетке образуется невероятно сложная смесь всевозможных мутаций, случайно распределенных по молекулам ДНК.

Интересно, что если бы так было на самом деле, то мутации, несмотря на их огромное количество, были бы совершенно безопасными для клетки. Дело в том, что разные мутации приводят к дефектам разных генов митохондрии. А поскольку разные мтДНК содержат разные мутации, то в то время как некий ген дефектен на одной мтДНК молекуле, в той же клетке находится огромное количество мтДНК, в которых тот же ген не дефектен, а мутации угодили в другие гены. В результате в клетке в целом всегда достаточно недефектных продуктов каждого митохондриального гена, а т.к. митохондрии в клетке обмениваются своими компонентами, то хватает на всех. Вообще говоря, было показано, что именно благодаря такому обмену продуктами между митохондриями (защитный механизм?) мутации мтДНК начинают оказывать влияние на самочувствие клетки только, когда их среднее содержание в клетке превышает 60–90%, в зависимости от типа мутации. Очевидно, что нако-

пление в клетке случайных мутаций не способно обеспечить столь высокий уровень какой-то отдельно взятой мутации (или группы мутаций, инактивирующих один и тот же ген). Такое было бы возможно, если бы мутации определенного типа возникали гораздо чаще остальных («горячие точки»), но в мтДНК мутации распределены более-менее равномерно. Так что же, соматические мутации мтДНК безопасны для клеток и, следовательно, отношения к старению не имеют?

Внутриклеточная популяционная генетика мтДНК: клональные экспансии позволяют мутациям становиться вредными вопреки мультиплоидности

Как это ни удивительно, но если заглянуть в клетку и посчитать находящиеся там мутантные молекулы, то вместо ожидаемой сложнейшей смеси всевозможных случайных мутаций окажется, что почти все молекулы клетки содержат одну и ту же мутацию или группу мутаций, причем молекулы одной клетки содержат один тип мутаций, а молекулы другой клетки — другой (а иногда и никакой). Неужели в одной клетке происходит только один тип мутаций, а в другой — только другой? Это совершенно невероятно. К счастью, имеется более приемлемое (хотя и не очень простое) объяснение.

Позволим себе небольшое отступление: на уединенных северных островах, где небольшие изолированные деревеньки существуют в течение нескольких столетий, можно иногда наблюдать удивительное явление: все жители деревни имеют одну и ту же фамилию. Как же так могло получиться, неужели вся деревня произошла от одного праотца? Скорее всего — нет. Рассмотрим это явление подробнее. Пусть, наоборот, деревня с самого начала была заселена большим числом семей, и все они имели разные фамилии. Если со временем число жителей почти не меняется (деревни эти не разрастались), то в каждой семье в среднем было по два ребенка. Если рождаются две девочки (а это происходит в каждой четвертой семье), то фамилия семьи исчезает, так что в первом же поколении четверть фамилий в деревне исчезнет. В каждом последующем поколении фамилии будут исчезать по тому же механизму, пока не останется только одна. Математический анализ показывает, что чем меньше семей в деревне и чем больше различия в числе детей между семьями, тем быстрее (т.е. за тем меньшее число поколений) одна фамилия захватит всю деревню.

Кстати, подобный процесс лежит в основе важнейшего явления — нейтральной эволюции. Большинство мутаций, которые приобретают живые существа, — нейтральны, они не приводят ни к каким селективным преимуществам и распространяются в популяции не благодаря естественному отбору, а в результате случайного процесса, аналогичного распространению фамилий в деревне.

Вернемся к митохондриям. Поскольку число органелл в клетке примерно постоянно, каждая молекула мтДНК за время между клеточными делениями удваивается в среднем один раз. Но на самом деле удвоение мтДНК — процесс случайный, и некоторым молекулам удается удвоиться несколько раз, а другие не успевают удвоиться и одного раза. Но, как мы знаем, разные молекулы мтДНК содержат разные случайные мутации, совершенно как жители деревни первоначально имеют разные фамилии. Если какая-то мтДНК не успела удвоиться, прежде чем несущая ее митохондрия отправится в сестринскую клетку, то мутация, находившаяся на такой молекуле ДНК, исчезает из митохондриальной популяции данной клетки, подобно тому, как исчезает фамилия семьи, где родились одни девочки. Так что через достаточное число клеточных делений (или через достаточное число полужизней мтДНК, если речь идет о неделящейся клетке) в клетке останется только один тип мтДНК, что и требовалось объяснить.

Заметим, что процесс захвата клетки мутантной ДНК есть не что иное, как чрезмерное разрастание одного клона ДНК (т.е. потомства одной молекулы), поэтому это явление получило название «клональная экспансия» (clonal expansion). Клональная экспансия в том виде, как она описана здесь, не требует какого-либо преимущества одной мутации над другими. Но наличие преимущества (например, мутации в регуляторной области, которые могли бы способствовать более эффективной репликации), конечно, может сильно облегчить экспансию. Предложено несколько механизмов, которые бы могли обеспечить преимущества определенным типам мутаций. Более строгие рассуждения на темы этого раздела, а также литературные ссылки можно найти в (Coller *et al.*, 2002).

Каковы бы ни были механизмы клональной экспансии, наиболее важен для нас тот вывод, что множественность митохондриальных геномов не обязательно защищает клетку от митохондриальных мутаций или что эта защита временная, пока мутация находится в процессе экспансии.

Итак, согласно нашим рассуждениям, в некоторых тканях пожилых людей можно ожи-

дать большого количества клеток, пораженных клональными мутациями митохондриальной ДНК. Что же наблюдается на самом деле? Чтобы ответить на этот вопрос, необходимо провести анализ мутаций индивидуальных клеток. Для этого нужно изолировать отдельные клетки и выделить их ДНК. Все это весьма непросто, и до сих пор лишь небольшое количество тканей было проанализировано таким образом.

Митохондриальные мутации в пигментных нейронах и сенильный паркинсонизм — причина и следствие?

Наиболее интересные результаты получены в результате исследования небольшой области мозга, называемой черной субстанцией (*substantia nigra*). В этой области находится скопление характерных пигментированных нейронов, вырабатывающих нейротрансмиттер дофамин. Их функции лучше всего иллюстрируются тем, что происходит, когда эти нейроны дегенерируют, — при болезни Паркинсона. Типичные симптомы этого заболевания — замедленные движения, тремор, скованность, неустойчивое равновесие. Однако эти признаки характерны не только для болезни Паркинсона: в легкой форме они проявляются у многих пожилых людей, и их встречаемость быстро увеличивается с возрастом и ассоциирована с существенно худшим прогнозом (Bennett *et al.*, 1996). Причины сенильного (старческого) паркинсонизма неизвестны; по-видимому, они могут быть не связаны с причинами классической болезни Паркинсона.

У нас были основания интересоваться митохондриальными мутациями именно в черной субстанции. Во-первых, уже около 10 лет назад было обнаружено, что среди пигментных нейронов черной субстанции с возрастом накапливается много клеток (до 30%), в которых отсутствует или существенно снижено количество по крайней мере одного белка, кодированного в мтДНК, а именно субъединицы комплекса IV. Такой дефект мог быть вызван митохондриальными мутациями. Число людей с повышенной частотой дефектных нейронов сравнимо с числом страдающих сенильным паркинсонизмом (Itoh *et al.*, 1996). Во-вторых, еще раньше было показано, что в черной субстанции содержится больше мутаций мтДНК (делеций определенного типа), чем во многих других областях мозга. Но абсолютное содержание делеций выглядело слишком низким, чтобы объяснить какие бы то ни было дефекты митохондриального метаболизма в пигментных нейронах (Soong *et al.*, 1992).

Естественно, напрашивается гипотеза о том, что, с одной стороны, сенильный паркинсонизм вызывается, хотя бы отчасти, митохондриальными дефектами в пигментных нейронах, а с другой стороны, что дефекты нейронов, в свою очередь, вызываются накоплением делеций в митохондриальной ДНК.

Мы решили для начала проверить вторую часть этой гипотезы, т.е. продемонстрировать, что, во-первых, пигментные нейроны с дефектами митохондриального метаболизма, и только они, содержат высокий уровень делеций митохондриальной ДНК, а во-вторых, что содержание делеций в дефектных клетках достаточно высокое, чтобы вызвать такие дефекты (принято считать, что делеции вызывают проблемы, когда их содержание превышает 60%).

Проверка гипотезы: делеции мтДНК — дефектные нейроны

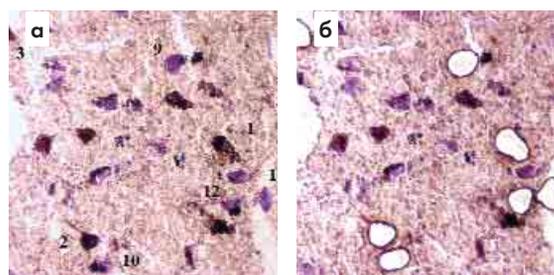
В первую очередь необходимо было различить нормальные и дефектные нейроны. Это достигается гистологическим окрашиванием, основанным на активности одного из ферментов электронно-транспортной цепи (комплекса IV). Нейроны с высокой активностью этого фермента окрашиваются в коричневый цвет, а те нейроны, где фермент менее активен (предположительно из-за клональной делеции мтДНК), остаются почти бесцветными. Чтобы увидеть дефектные клетки, срез ткани дополнительно обрабатывают красителем, который окрашивает все нейроны в фиолетовый цвет (но фиолетовый не может перебить коричневой окраски, поэтому активные нейроны остаются коричневыми). Пример ткани, окрашенной таким образом, приведен на рисунке 1а. Обратите внимание на то, что нейроны разделяются на два класса: «коричневые» (нормальные) и «фиолетовые» (дефектные).

Далее было необходимо изолировать индивидуальные нейроны, нормальные и дефектные. Для этого использовалась лазерная микроскопия. Микроскоп соединен с мощным лазером, а препарат ткани находится на подвижном предметном столике с микроприводом, управляемым компьютером. Выбрав клетку, вы очерчиваете ее на компьютере линией, по которой хотите ее вырезать, дальше включается лазер, и столик движется таким образом, что неподвижный луч лазера обходит клетку по начерченной линии, разрезая всё на своем пути. Клетки оказываются отделенными от остальной ткани узкой прожженной полоской. Затем лазер дает короткий импульс по центру

клетки, и давление света катапультирует ее и забрасывает в подставленную пробирку. Рисунок 1б показывает срез ткани после того, как были катапультированы 7 нейронов.

Наконец, чтобы оценить содержание делеций в каждой из клеток, был использован метод мономолекулярной полимеразной цепной реакции, разработанный специально для этого случая. ДНК каждой клетки сильно разбавлялась, настолько, что в каждую реакцию попадало не более одной молекулы мтДНК. Если попавшая молекула оказывалась полноразмерной, то амплификации подвергались два фрагмента ДНК, а если с делецией — то только один (матрица для второго фрагмента была нарушена делецией). Далее простой подсчет реакций с одним и двумя фрагментами дает оценку доли мутантных мтДНК в клетке. Результат такого эксперимента показан на рисунке 1в.

Как видно на рисунке, дефектные нейроны действительно содержат больше делеций мтДНК. Впрочем, похоже, что практически все пигментные нейроны у пожилых людей содержат какое-то количество делеций, но только в



в

содержании делеций мтДНК на нейрон

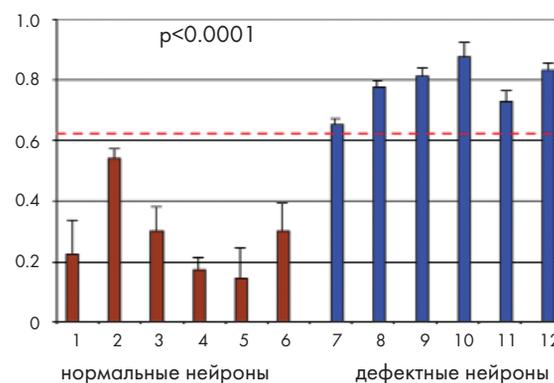


Рисунок 1. Что вызывает дефекты митохондриального метаболизма в пигментных нейронах?

(а) — Срез черной субстанции был окрашен, чтобы выявить клетки с нормальным (коричневые) и дефектным (фиолетовые) митохондриальным метаболизмом. (б) — Клетки были изолированы при помощи лазерной микроскопии.

(в) — В каждой из клеток было определено содержание делеций мтДНК. Легко видеть, что дефектные нейроны содержат больше делеций, чем нормальные. Подробности в тексте.

дефектных клетках их содержание достигает критического уровня (60%). Видимо, как мы и предполагали, делеции мтДНК действительно приводят к митохондриальным дефектам в нейронах. Учитывая, что делеции присутствуют практически во всех клетках, можно ожидать, что со временем большее число клеток набирают критическую массу делеций и становятся дефектными. Кстати говоря (результат независимого эксперимента), как и ожидалось, делеции в пигментных нейронах клональны (каждый нейрон содержит главным образом делецию определенного типа, и разные нейроны содержат разные делеции), так что накопление делеций — это прогрессивный процесс экспансии клонов.

Эта работа была сделана при активном участии Лены Кудрявцевой (5-й выпуск биокласса). Более подробное описание можно найти в статье (Kraytsberg *et al.*, 2006).

Вопросы на будущее

Естественно, что эксперименты, описанные выше, — это только начало работы по выяснению роли мутаций митохондриальной ДНК в старении, в частности старении мозга. Следующий вопрос — действительно ли дефекты митохондриального метаболизма в пигментных нейронах имеют отношение к сенильному паркинсонизму? Мы собираемся сравнить частоту дефектов/мутаций в мозге индивидов, страдавших и не страдавших паркинсонизмом (соответствующие коллекции тканей уже собраны и доступны для исследований). Далее, желательно было бы узнать, в чем именно заключается механизм действия митохондриальных мутаций. Что собственно происходит, когда в клетке образовался клон мутантных митохондриальных ДНК? Видимо, электронная цепь в такой клетке остановится и перестанет производить АТФ. Как ни странно, многие типы клеток от этого не умирают. Более того, зачастую распознать такую клетку можно, только используя специальное гистологическое окрашивание: без него клетка выглядит совершенно нормальной. Дело в том, что есть другой способ получать АТФ, называемый гликолизом, который вполне удовлетворяет базовые нужды клеток. Может быть, нейронам недостаточно удовлетворения только базовых нужд, и гликолиз для них недостаточен, а может быть, механизм совсем другой: например, остановка электронной цепи усиливает производство радикалов и, таким образом, приводит

к интоксикации или нарушению регуляции самих дефектных нейронов или соседних клеток.

Возможно, конечно, что накопление митохондриальных мутаций — это вторичный процесс, непосредственного отношения к старению не имеющий. Впрочем, чтобы закончить наше повествование на оптимистичной ноте (оптимистичной? ... смотря как на это посмотреть...), отметим, что недавно было обнаружено, что в митохондриальной ДНК долгоживущих видов млекопитающих содержится меньше повторов (повтор — это когда одна и та же последовательность ДНК встречается в разных местах генома), чем у короткоживущих. Известно, что именно на повторах в основном и образуются делеции мтДНК, так что это наблюдение наводит на мысль, что делеции все-таки должны иметь отношение к ограничению продолжительности жизни, и, следовательно, старению. Так что не исключено, что вышеописанные исследования имеют смысл.

Литература

С удовольствием пошлю желающим любые из перечисленных ниже статей по электронной почте.

- Bennett D.A., Beckett L.A., Murray A.M., Shannon K.M., Goetz C.G., Pilgrim D.M., Evans D.A.** 1996. Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people // *N. Engl. J. Med.*, 334: 71–76.
- Coller H.A., Bodyak N.D., Khrapko K.** 2002. Frequent Intracellular Clonal Expansions of Somatic mtDNA Mutations: Significance and Mechanisms // *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 959: 434–447.
- Itoh K., Weis S., Mehraein P., Muller-Hocker J.** 1996. Cytochrome c oxidase defects of the human substantia nigra in normal aging // *Neurobiol. Aging*, 17: 843–848.
- Khrapko K., Kraytsberg Y., de Grey A.D., Vijg J., Schon E.A.** 2006. Does premature aging of the mtDNA mutator mouse prove that mtDNA mutations are involved in natural aging? // *Aging Cell*, 5: 279–282.
- Kraytsberg Y., Kudryavtseva E., McKee A.C., Geula C., Kowall N.W., Khrapko K.** 2006. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons // *Nat. Genet.*, 38: 518–520.
- Saccone C., Gissi C., Reyes A., Larizza A., Sbisà E., Pesole G.** 2002. Mitochondrial DNA in metazoa: degree of freedom in a frozen event // *Gene*, 286: 3–12.
- Soong N.W., Hinton D.R., Cortopassi G., Arnheim N.** 1992. Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain // *Nat. Genet.*, 2: 318–323.

Хемобиос океанских глубин

Г. Виноградов



Георгий Виноградов, 6-й выпуск биокласса (Лучшие), школа № 57 (1982 г.), закончил кафедру зоологии беспозвоночных Биофака МГУ (1987 г.), к.б.н., старший научный сотрудник в Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, egor@ocean.ru

От автора

Сначала были звери. Странные, непонятные, таинственные в своих банках. Большие. И я прекрасно знал, что такое биология моря. Залитый парафином лоток, на котором булавками расправлен, расколот Некто, и рядом — матовый отблеск на черном эбонитовом боку бинокля. Запах спирта и формалина. Холодный серый ил в куту трала, сквозь который смутно проступают розовые звезды, и заледеневшие пальцы ощущают их шероховатость и вес... Вместо звезд появились рачки. Смешные, головастые рачки из планктонных амфипод-гипериид. Тонкие стекла препаратов. Неловкие препаровальные иглы в световом кружке микроскопа. Ноги, ноги, ноги, щетинки, пузырьки. Формалинная вонь, ошалевшие, усталые глаза. И заветные буквы «ср. п.» у впервые звучащих имен.

Рачки прятались в каше. В розовой каше, слипшейся, отцеженной, вывалившейся из стакана планктонной сетки. Мелкие, неощутимые твари. Планктон. Не образ — слово. И это слово вдруг развернулось веером, сонмом очаровательных существ, прозрачно светящихся в лучах прожекторов в иллюминаторе подводного аппарата.

И биология моря обернулась потоком этих существ, неспешно скользящих, то реже, то гуще, оседающих на границах вод... и превращающихся в зубчатые диаграммы графиков, в кривые вертикального распределения, и уже эти кривые оказывались впереди, а звери отступали в темноту, становились бледными тенями позади кривых, становились символами, знаками в счетной рамке.

Зато у кривых появился характер, они выгибались, как пляшущие змеи, и узор их танца

являл картины слишком большие, чтоб глаз мог увидеть их так. Падения и взлеты биомассы складывались в нескончаемый дождь погибших тварей, занесенных в убийственно-теплые воды Гольфстрима столкнувшимся с ним Лабрадором, и в стаи красных креветок, жиреющих на этом дожде. Большая и малая продукция наверху, северный перенос вод, отравленные струи гидротермальных плюмов, глобальные круговороты течений и танец жизни вокруг них.

И Океан оказался вихрем, клубком потоков энергии и вещества, лентами скользящих вдоль материков, замкнутых в кольца круговоротов, низвергающихся в бездну и отражающихся от неожиданно близкого дна. И в этом вихре клубящихся потоков несутся маленькими огоньками, мелькают перед взглядом и уносятся прочь искорки организмов.

Вначале были звери...

В глубинах ночных океана,
Куда не дотянемся мы,
Из черного дна неустанно
Крутые восходят дымы...
А.Городницкий

An endless multitude of forms appear,
Some grim, some frail, some beautiful, some queer,
Each alien...
J.R.R. Tolkien

Введение: чем кормится Океан

Всем нам хорошо известна основная пищевая цепочка Земли: под воздействием солнечного света зеленые растения фотосинтезируют, создавая из углекислого газа и воды новое органическое вещество (и сбрасывая в атмосферу отходы этого производства — кислород), созданную растениями органику потребляют травоядные, травоядных ловят и едят хищники, а поедают всё животные, питающиеся падалью и навозом. Потом остатки вышеперечисленных разлагаются бактериями вновь до неорганических веществ, замыкая цикл. Конечно, дорогой скользящие по цепи потоки органики ветвятся и пересекаются, идут через тех или этих потребителей, возникают и исчезают дополнитель-



Рисунок 1. «Сухопутная» фотосинтетическая цепь.

ные звенья, и вместо простой и ясной трофической цепочки мы видим весьма запутанную трофическую сеть. Но это сейчас неважно, а важна вот эта самая базовая пищевая цепь, идущая от солнечного света и зеленых растений, назовем ее «фотосинтетической».

Эта базовая фотосинтетическая пищевая цепь существует в двух версиях: сухопутной и океанической. На привычной нам суше в ее начале стоят крупные многоклеточные растения, а все дальнейшие участники цепочки резвятся на той же самой лужайке, на которой эти растения выросли. Или рядом с ней.

Другое дело Океан. Во-первых, фотосинтетическая цепь начинается в нем с микроскопических одноклеточных планктонных водорослей (крупные прибрежные водоросли не в счет, в масштабах Океана их почти что не существует). А во-вторых, производители и большинство потребителей органики в Океане разнесены по разным «этажам». Необходимый для фотосинтеза солнечный свет проникает в воду очень неглубоко: метров на 200, не больше. Эта освещенная часть Океана называется фотической зоной. И только в этом 200-метровом слое и обитает

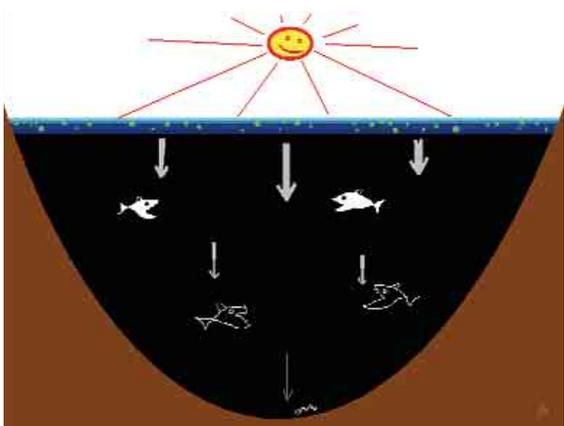


Рисунок 2. Океаническая фотосинтетическая цепь.

создающий новую органику фитопланктон. Во всей остальной многокилометровой толще воды его нет. Обитатели этих черных, лишенных света, глубин кормятся той органикой, что падает сверху, из фотического слоя. А там и своих едоков хватает! Опускаясь вниз все глубже и глубже, органическое вещество неоднократно перехватывается обитателями столба воды, пропускается через их тела, и количество его стремительно падает. Именно поэтому обычно океанское дно почти безжизненно, биомасса глубоководного бентоса обычно не превышает десятых долей грамма на квадратный метр. Даже термин такой есть: «глубоководная бентическая пустыня»¹.

Однако в 70-х годах XX века простая истина, что вся жизнь в Океане кормится за счет того органического вещества, которое создали в освещенном верхнем 200-м слое воды планктонные водоросли, перестала быть таковой.

Еще в 1887 г. русский микробиолог С.Н. Виноградский открыл бактериальный хемосинтез. Оказалось, что некоторые бактерии тоже умеют создавать новое органическое вещество из неорганического, но тратят на это энергию, получаемую не от солнечных лучей, а от химических реакций, при окислении аммиака, водорода, соединений серы, закисного железа и др. Интересно, конечно. Куда на выдумки природа таровата! Но где они есть, такие бактерии? В ржавых мочажинах на обочинах загнивших болот? В других подобных выморочных биотопах? Несерьезно. Нет, конечно, с теоретической точ-

¹По современным оценкам, годовая продукция первичного органического вещества в Океане, образующегося в результате процессов фотосинтеза, которая измеряется в гигатоннах (10⁹ тонн) органического углерода, составляет не менее 70–100 Гт C_{орг} (продукция суши – 50 Гт C_{орг}), из которых 90–95% дает фитопланктон и около 5% – донные водоросли – макро- и микрофиты. Из органического вещества, образующегося в зоне фотосинтеза, большая часть в ней же и минерализуется, и образовавшиеся неорганические компоненты вновь используются при создании продукции (так называемая продукция рециклинга). Ниже фотического слоя, на глубину более 200 м, в виде отмерших организмов, остатков пищи и мигрантов опускается, в зависимости от структуры сообществ, 10–25% созданного органического вещества, т.е. 6–15 Гт C_{орг}/год. В глубинных водах около 90% поступившей туда органики окисляется до минеральных солей и CO₂, которые в дальнейшем вновь выносятся в фотический слой, где служат основой для синтеза «новой продукции». До глубин в 3–4 км (на которые приходятся основные площади океанского дна) доходит примерно 1–2% той органики, которая опустилась глубже 200 м, т.е. около 0,1% общей величины первичной фотосинтетической продукции.

ки зрения существование хемосинтеза как альтернативного источника органики — принципиальнейшая вещь. Вероятно, в эпоху зарождения жизни на Земле он был крайне важен. Но в наши дни бактериальный хемосинтез — натуральнейшая экзотика, и в современных экосистемах Земли никакой реальной роли он не играет... Еще недавно в этом были уверены все. И были не правы.

Отступление в геологию

Здесь придется отвлечься. Если взглянуть на современные карты рельефа морского дна, то сразу можно увидеть, что в каждом океане лежит гигантский горный хребет, не похожий ни на что из того, что есть на суше. Такие хребты называются срединно-океаническими, потому что обычно они тянутся вдоль всего океана по его середине, и только в Тихом океане такой хребет прилегает к материкам Америк. Система срединно-океанических хребтов — это самая большая горная система Земли, ее общая протяженность превышает 60 тысяч километров. И вдоль всех этих хребтов, по центральной их части, проходит узкая продольная долина, именуемая рифтовой.

Срединно-океанические хребты проходят на стыке гигантских литосферных плит, там, где близко к поверхности подходит раскаленная мантия Земли и рождается новая земная кора. Здесь, со скоростью от 1 (в Атлантике) и до 18 (в Тихом океане) сантиметров в год, расширяется Океан.

А с другой стороны, у берегов Океана, родившаяся когда-то давно, в незапамятные времена, океаническая земная кора подныривает под плавающие по мантии Земли глыбы материков, и вещество ее вновь уходит в земные недра. Именно такие места маркируют дуги глубоководных желобов и выстроившиеся вдоль них цепочки островов. Здесь плиты земной коры трутся одна об другую, и возникшее в них напряжение выплескивается землетрясениями. Не случайно районы желобов и островных дуг (включая те же Курильские острова и Японию) — одни из самых сейсмически активных районов Земли. Впрочем, это совсем другая история...

Во многих местах рифтовых долин срединно-океанических хребтов (а также в районах расхождения земной коры между материками и дугами островов, в так называемых зонах задугового спрединга, но в эти дебри мы не полезем), где магма подходит к поверхности особенно близко, поток тепла из глубин литосферы особенно высок. В таких местах базальты рифтовой долины, благо они молодые и раздвигающиеся,

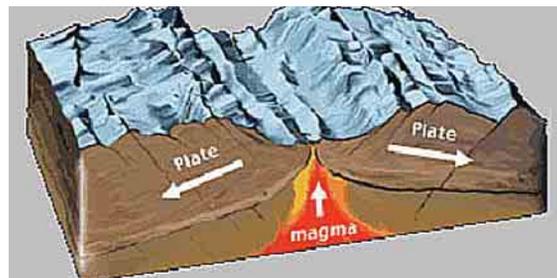


Рисунок 3. Схема движения литосферных плит в рифтовой долине на дне Океана.

достаточно трещиноваты, и по этим трещинам морская вода просачивается внутрь скал. Тепло близкой магмы разогревает ее до 300–400 °С, и она начинает со страшной силой растворять в себе разные вещества (соединения серы и тяжелых металлов) из окружающих пород: базальтов и серпентинитов. Превращение океанической воды в гидротермальный высокотемпературный раствор происходит постепенно, начинаясь еще тогда, когда вода опускается вниз. Потом этот перегретый раствор (не закипающий из-за чудовищного давления в сотни атмосфер: в море давление увеличивается на одну атмосферу на каждые 10 м глубины, а тут глубины многокилометровые) рвется вверх и фонтанами бьет из дна. Смешиваясь с холодной (2–3 °С) придонной водой, он быстро остывает, и некоторые растворенные в нем вещества начинают выпадать обратно. Например, из растворенных сульфатов получаются мелкие кристаллики сульфидов, нерастворимых и черных. Мириады их взвешены в бьющей из дна струе, и эта струя начинает напоминать густой черный дым, очень похожий на дым от горящей резины. Сульфидный порошок оседает вниз, и из него, подобно сталагмитам в пещерах, начинают строиться растущие из дна черные башни, покрытые рыжим налетом сернистых охр. Такие башни с бьющими из них черными «дымами» известны сейчас под именем «черные курильщики». Если струя бьет в одной точке постоянно годами, то высота таких башен может достигать нескольких десятков метров, если струя мечется, то вместо высоких башен получаются удивительнейшие каменные леса.

Впрочем, иногда, из-за особенностей местных растворов, сульфиды не выпадают, и тогда бьющая вода остается прозрачной или чуть желтоватой, но ее мерцающие и клубящиеся потоки роскошно видны на фоне обычной придонной воды из-за разности их плотности и температуры. В пару к черным курильщикам такие источники получили название курильщиков белых. Практически всегда, раз уж циркуляционная система здесь работает, а трещин в базальтах

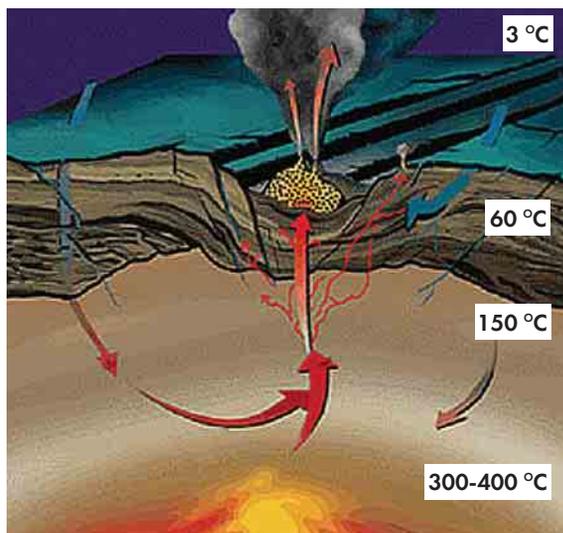


Рисунок 4. Циркуляция и разогрев воды под поверхностью рифтовой долины, на выходе имеем черный курильщик.

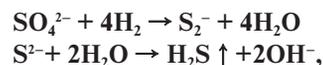
много, курильщики располагаются группами (сайтами), которые объединяются в гидротермальные поля. Размеры сайтов — десятки метров, типичные размеры полей — первые сотни метров.

Но вернемся к нашей биологии

В 1977 г. американские геологи затеяли изучать рифтовую зону у Галапагос, в точке 0°47' с.ш.; 86°10' з.д. В этом районе на дне, на глубине двух с половиной километров, фиксировались температурные аномалии: из глубин земной коры шло тепло. Здесь ожидалось интереснейшие геологические открытия. 17 февраля глубоководный обитаемый аппарат «Алвин» ушел вниз... Экипажу аппарата открылась фантастическая картина: в мерцающих струях теплой воды в углублениях дна, как булочки в корзине, десятками лежали огромные снежно-белые двусторчатые моллюски, гроздьями висели крупные коричневые мидии, стадами бродили белые раки и крабы, торчали трубки странных червей с красными султанами щупалец... И все это на глубине, где полагалось бы быть «бентической пустыне»! «Пять часов времени пребывания на дне мы провели в состоянии, близком к помешательству», — писали позже Дж. Корлисс и Дж. Эдмонд, участники первых погружений. Так люди впервые увидели фауну гидротерм, глубоководных «оазисов» на дне океана. Экспедиция была геологической, биологов в ней не было, не было фиксаторов, и поднятые образцы пришлось консервировать русской водкой, закупленной в Панамском канале для личных нужд исследова-

телей. Зато химики были, и они определили, что та самая мерцающая вода, в которой купались обитатели Райского сада (именно это название было присвоено открытому полю), сильно насыщена сероводородом (впрочем, это стало ясно, едва открыли батометры с пробами), другими соединениями серы и азота, водородом и метаном. (Скажем сразу, что метан гидротермальных растворов — идущий из недр Земли, а не продукт разложения былой жизни.) Причем всего этого там много: как мы знаем сейчас, концентрация того же сероводорода в гидротермальных флюидах составляет от 10 до 80 мМ/литр.

Конечно, вы уже все поняли: основу фантастических биомасс гидротермальных оазисов (до десятков килограммов животных на квадратный метр дна) составляют хемосинтезирующие бактерии, образующие новое органическое вещество (новую еду!) за счет окисления того химического букета, который выносит горячая вода. В зоне смешения идущей из курильщика струи (так называемого флюида) и окружающей морской воды создаются благоприятные условия для процесса так называемой водородной сульфатредукции, с участием термофильных (т.е. живущих в горячих водах) микроорганизмов, в том числе археобактерий (которые, по современным понятиям, и не бактерии вовсе, а еще одна группа микроорганизмов), восстанавливающих сульфат по реакции:



а потом в дело вступают настоящие бактерии, окисляющие H_2S , S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, NO_2^- , Fe^{2+} , Mn^{2+} , а также водород и метан (строго говоря, метанотрофы — это не то же, что хемосинтетики, но не будем излишне занудствовать). И все они синтезируют органику, органику, органику... Конечно, на голодных глубинах на эту органику немедленно находятся потребители.

Сейчас с гидротермальных оазисов (найденных уже во всех океанах, числом более 100) описаны сотни видов животных: беспозвоночных и рыб, причем более 80% из них **никогда** не встречаются на «спокойном» дне и обитают **только** на гидротермах. Еще больше видов уже поймано, но все еще ждет описания, и среди них уникалов не меньше. Это понятно: условия обитания на гидротермах более чем специфические. Ядовитый для дышащих кислородом животных сероводород, тяжелые металлы, температурные градиенты в десятки градусов. И необходимость как-то усваивать продукцию бактерий. Конечно, не все обитатели гидротерм питаются бактериальной органикой напрямую. Система устроена слож-

нее: имеется несколько (немного) *видов-эдификаторов*, определяющих «лицо» сообщества. Эдификаторы достигают огромной численности и живут именно бактериями. И имеется многочисленный шлейф из подьедал, хищников и трупоедов, существующий уже за счет видов-эдификаторов.

В разных океанах эдификаторы разные. На востоке Тихого океана это в первую очередь характерные только для этих мест «трубчатые черви» рифтии, *Riftia pachyptila*, достигающие полутора метров в длину, обладатели белых кожистых жилых трубок и красных щупалец. Рифтии и их более мелкие родичи риджей, также обильные на гидротермах, относятся к вестиментиферам (обособленной группе погонофор). Первых, не гидротермальных (но, как теперь выяснилось, тоже живущих в местах со слабым сочением метана), погонофор нашли в начале XX века, в 1944 г. На основании сравнительно-анатомических данных их выделили в отдельный тип животных, а сейчас, на основании данных молекулярных анализов строения РНК, пробуют считать своеобразной группой многощетинковых червей.

Двустворчатые моллюски-митилиды батимодиолусы (их несколько видов) — это вторая группа эдификаторов, распространенная на гидротермах всех океанов. Третий и четвертый эдификаторы Восточной Пацифики — это найденные и в других местах, но по-настоящему обильные только здесь гигантские снежно-белые

двустворки-везикомииды, и обитающие в самых «жарких» участках гидротерм полихеты-альвинеллиды.

Черные курильщики Западной Пацифики покрыты слоем крупных, больше сливы, брюхоногих моллюсков *Alviniconcha* и *Ifremeria*. А в Атлантике бушуют креветки, толстые серые креветки-римикарисы, как шубой покрывающие здешние курильщики там, где на них не висят батимодиолусы. Римикарисы лишены обычных глаз, зато у них развился специальный орган, работающий в инфракрасном диапазоне и позволяющий видеть струи кипятка. Что творится в Индийском океане — еще не совсем понятно, потому что первые гидротермальные поля найдены там совсем недавно, но римикарисы на них тоже есть. А в Северном Ледовитом океане гидротермальные поля пока никто из биологов не обследовал, хотя гидрологические исследования и фотографии дна подтверждают их наличие и там.

Нелегко жить в гидротермах

Конечно, просто собирать бактерий всем этим видам неудобно. Хотя бактерий на гидротермах много, и иногда они покрывают грунт толстым слоем, образуя маты сантиметровой толщины. Но не всегда и не везде. Поэтому надежнее самим культивировать их где-то под рукой. А именно — на или в собственном теле.

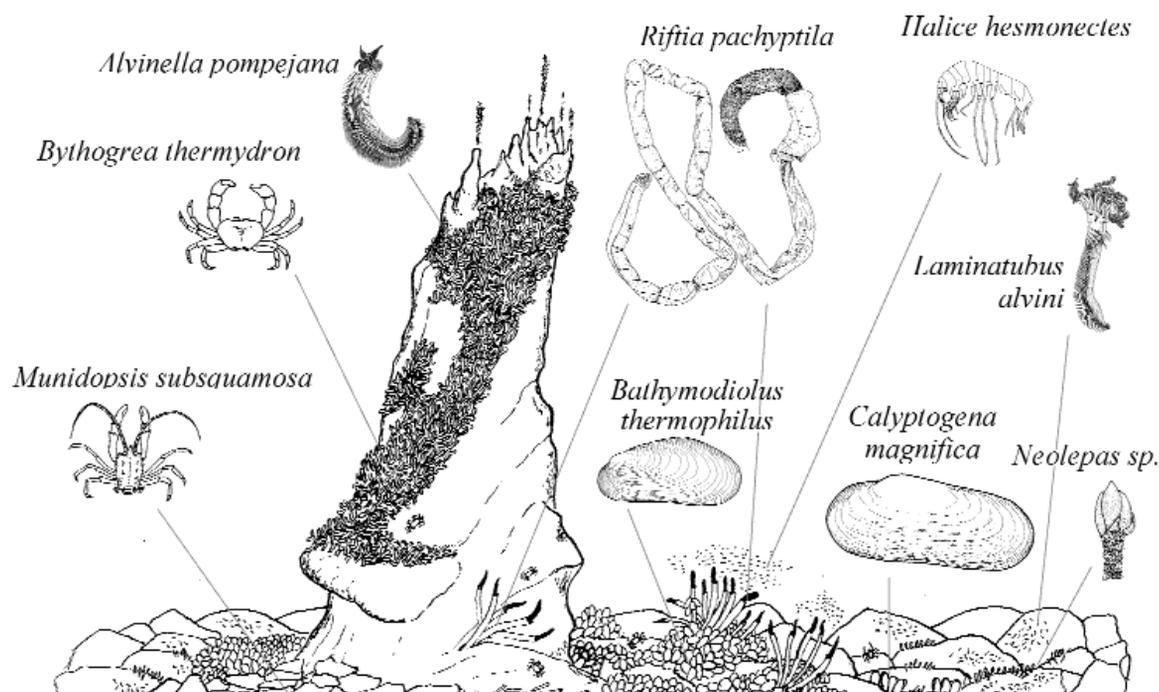


Рисунок 5. Фауна курильщика на 9° с.ш. Восточно-Тихоокеанского поднятия. По S.V. Galkin et al., 2004. InterRidge News, 13: 27–33, fig. 5.

Двустворчатые моллюски разводят симбиотических бактерий в жабрах. Креветки-римикарисы растят бактериальные огороды прямо на собственных ротовых конечностях и по мере надобности счищают их в рот. Дело это тяжелое: бактериям нужна максимальная концентрация всякой химии, а она там, где струи гидротермального флюида еще не разбавлены придонной водой. И поэтому очень, очень горячие. Креветки лезут выпастить своих бактерий в самые черные дымы, балансируя на тонкой грани: пролез слишком близко — сварился, недостаточно близко — сидишь голодный. Поэтому среди римикарисов то и дело попадаются особи с обожженными ногами и антеннами, а однажды автор лично наблюдал римикарису со здоровенной пробоиной, прожженной на боку грудного панциря, что не мешало ему снова крутиться вокруг струи кипятка... Но хитрее всех устроились вестиментиферы. Рта и кишечника у них попросту нет, а бактерии-симбионты живут внутри тела, в специальном губчатом органе, называемом трофосомой. И тут возникает проблема: для хемосинтеза бактериям нужен сероводород, но для дышащих кислородом животных (к которым относятся и вестиментиферы, они дышат с помощью пронизанных кровеносными сосудами щупалец-жабр) сероводород, проникший в тело, — яд. Как же они обходятся?

Самыми яркими представителями гидротермальных вестиментифер являются рифтии. На их примере мы и разберем, как. Рифтии (как и все погонофоры) живут в плотных трубках, которые создаются самим животным из белка и хитина. Трубки рифтии создают при помощи желез, находящихся на своеобразном «воротничке», расположенном на переднем конце животного, сразу под щупальцами. И этот же «воротничок», как пробка, закрывает вход в трубку. Эти трубки, вместе с прочными коллагеновыми покровами тела рифтии, содержащими ферменты, способные очень быстро окислять сульфиды, не дают растворенному сероводороду (точнее, его аниону HS^-) проникать в тело рифтии где попало. Разумеется, они препятствуют и проникновению кислорода. И весь газообмен животного идет только через выставленные из трубок щупальца. Щупальца богато снабжаются кровью — настолько, что у живых рифтий они имеют ярко-красный цвет. Гемоглобин рифтий отличается от гемоглобина большинства животных (например, позвоночных) и, помимо высокого сродства к кислороду, обладает способностью обратимо связывать HS^- . При этом кислород, как и у всех животных, связывается с гемом, а сульфиды — с другими частями молекулы, в результате чего их соединение с гемоглобином не мешает последне-

му переносить кислород. При этом связь HS^- с гемоглобином достаточно прочна, чтобы «не отдать» его обычному дыхательному ферменту цитохром-С-оксидазе (соединение HS^- с этим ферментом и приводит к отравлениям дышащих кислородом организмов сероводородом). В таком надежно связанном виде опасное вещество путешествует по кровеносной системе рифтий и попадает в трофосому, снабженную великолепно развитой капиллярной сетью, где и передается непосредственно симбионтам. Другие компоненты крови рифтий доставляют туда CO_2 , также необходимый для процессов хемосинтеза.

Остается проблема высокой концентрации сульфидов в самой трофосоме. Для рифтий (и еще для некоторых обитающих в гидротермах моллюсков, также имеющих бактерий-симбионтов), показано присутствие в тканях, служащих домом для симбионтов, необычных содержащих серу аминокислот (речь идет о таурине и его аналогах), которые могут служить ловушкой для избыточных сульфидов.

Дальнейшее распределение хемосинтезированной органики от видов-эдификаторов по прочим членам сообщества можно проследить, измеряя соотношение более легких и более тяжелых изотопов углерода ^{12}C и ^{13}C и азота ^{14}N и ^{15}N в их тканях, благо при передаче по пищевой цепи при переходе на новый трофический уровень соотношение изотопов углерода смещается на 0,5–1‰, а соотношение изотопов азота — на 3–4‰. Полученная картина весьма напоминает самые обычные «фотобиосные» (т.е. существующие за счет фотосинтеза) трофические сети.

Замкнутые миры

И все небольшие (сотни метров в поперечнике!) мирки гидротерм плотно замкнуты сами на себя, на свой источник питания. Альтернативная жизнь. Их обитатели когда-то давно пришли из



Рисунок 6. Рифтия, вытасненная из трубки. Видны щупальца, воротничок и длинное колбасовидное тело, преимущественно забитое трофосомой.

внешнего мира — и закрыли за собой дверь. До того, что происходит вокруг, до того, что происходит наверху, им больше нет никакого дела. Одно время казалось, что замерзши завтра Океан — а они не заметят. Потом выяснилось, что это все-таки не так. Гидротермальное поле существует не вечно, от десятков до тысяч лет, но потом все-таки угасает. Отдельные источники в пределах поля живут и того меньше. Уходит гидротермальный флюид, кончается бактериальный хемосинтез. И только мертвые створки моллюсков и трубки рифтий маркируют места былых оазисов. Но в это время где-то неподалеку, в том же сегменте рифтовой долины, проснется другое поле. И его надо успеть заселить.

Короче, все обитатели гидротермальных полей имеют планктонных личинок. Миллионы их постоянно висят над всей рифтовой долиной, отдельным счастливым удастся осесть на старые и новые гидротермальные поля, поддерживая жизнь гидротермальных оазисов, не прерывавшуюся по меньшей мере с Силура (к которому относятся наиболее ранние из известных ископаемых гидротерм). И, пока личинки живут в планктоне, они включены в обычные фотобио-сети питания.

За без малого тридцать лет, прошедших с начала исследования гидротерм, в океанах были найдены многие десятки гидротермальных полей. Их научились искать по аномалиям теплового потока дна, выслеживать по облакам плюмажам воды с измененным химическим составом и физическими свойствами, тянущимися на

десятки километров от источников. На них работали американские, французские, российские и японские глубоководные аппараты: «Алвин», «Наутилус», «Пайсисы», «Миры» и «Шинкай», ибо изучать гидротермы могут только они, да еще телеуправляемые модули. Поверхностным судам очень трудно попасть приборами в маленькое гидротермальное поле сквозь трехкилометровый слой подвижной воды.

И уже можно не только поражаться этой альтернативной жизни, но подойти к ней с числом и мерой, попытаться оценить масштаб первичной продукции гидротерм. Имеющиеся оценки пока еще сильно колеблются, но, кажется, на гидротермах производится немногим менее одной десятой процента от того количества органики, которое создается в фотическом слое Океана.

Вам это ничего не напоминает? Правильно, это примерно столько же, сколько доходит до дна океана с поверхности. На глубинах океанского дна продукционные потоки от фото- и хемосинтеза сопоставимы. Такая вот «экзотика». Правда, фотическая органика размазана по всему океанскому дну, а хемосинтетическая сосредоточена в цепочках булавочных уколов гидротермальных полей, и, похоже, в основной своей части все-таки заперта внутри них.

Действительно, в гидротермальных экосистемах отмершие животные и продукты их метаболизма потребляются широким спектром хищников, падальщиков и детритофагов, в большом количестве окружающих скопления бактериотрофов-эдификаторов: крабами, креветками,

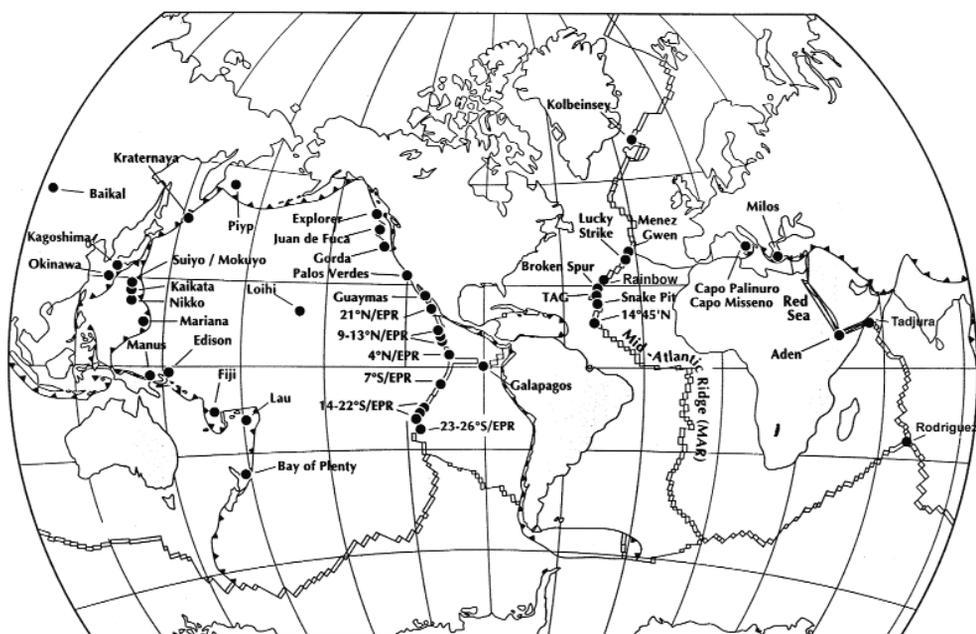


Рисунок 7. Известные гидротермальные поля (карта вполне могла устареть за время подготовки книжки).

актиниями, полихетами, хищными гастроподами, рыбами и др. Именно через бактериотрофов-эдификаторов в фауну «шлейфа» проходит основной поток органического вещества и энергии от бактериального хемосинтеза. Также очевидно, что поток этот, хотя и очень велик, но сугубо локален, т.к. на границе гидротермального поля (десятки или первые сотни метров от источников) все эти виды исчезают. Это дает основание считать, что основная масса первичного органического вещества, созданного в гидротермальной экосистеме в результате бактериального хемосинтеза, потребляется (минерализуется) внутри нее же и в окружающее пространство Океана попадает лишь незначительная его часть.

Что происходит вокруг

Можно предположить и существование механизмов, обеспечивающих вынос органики за пределы сообществ гидротерм.

Во-первых, такой выброс может идти как непосредственно, так и в виде «продукции в плюмах». Гидротермальными плюмами называются струи распространяющихся от курильщиков вод, насыщенных сероводородом, метаном, ионами серы, NO^2 , Fe^{2+} , Mn^{2+} и других металлов, которые могут использоваться бактериями в процессе хемосинтеза в самом плюме. Наиболее очевидным, на первый взгляд, кажется путь, связанный с возможностью выноса горячими струями флюидов детрита, обрывков шкурки ракообразных и прочих остатков животных гидротермали. Однако значительная, если не основная, часть потока «восходящего» детрита перехватывается в непосредственной близости от черных курильщиков представителями местного биофильтра, создаваемого в толще воды над гидротермами специфическими пригидротермальными бентопелагическими животными, и таким образом возвращается обратно в сообщество.

Гораздо более реален второй вариант — поток, связанный с выбросом в окружающее пространство живых гидротермальных животных, либо их яиц и ранней молодежи, в том числе и входящих в вышеупомянутый биофильтр. Например, в Северной Атлантике основную долю «уходящих» с гидротерм организмов составляют молодь креветок-эдификаторов *Rimicaris*. Однако, из-за гигантских объемов воды, в которой рассеиваются личинки, их численность вне пригидротермальных «облаков» не превышает 1–1,5 экз на 10 000 м³ воды в нижней половине столба воды в районе гидротермального поля. При удалении же от него на несколько десят-

ков километров эта численность падает еще на порядок, и их значение для пищевых цепей практически равно нулю. Поэтому, хотя с точки зрения расселения и самого существования гидротермальной фауны этот поток личинок играет важнейшую роль, влияние его на фоновое глубоководное население мало и носит очень локальный характер.

Взрослые гидротермальные животные могут либо заноситься вверх бьющей из источников нагретой водой, либо активно подниматься для размножения. Поток поднимающейся от курильщика нагретой воды выносит их на расстояние сотен метров от дна. Однако эта струя достаточно узка (первые сотни метров — даже в ее верхней, расширенной, части) и в масштабах планктонных сообществ всей толщи воды крайне незначительна. Таким образом, хотя вынос придонной фауны — возможный путь включения гидротермальной органики в трофические цепи батипелагиали Океана, в результате разбавления в несоизмеримо больших массах воды поток органики из гидротермального источника становится ничтожно малым уже на расстоянии первых сотен метров по горизонтали от гидротермального поля.

Третий путь подпитки окружающих сообществ хемосинтетической органикой с гидротерм, как мы уже говорили, связан с плюмами распространяющейся от них воды с измененными химическими и физическими характеристиками, в которых еще наблюдаются процессы бактериального хемосинтеза.

Соответствующие измерения показали, что бактериальная продукция органического вещества в плюмах, включающая как автотрофные, так и гетеротрофные процессы, в полтора раза превышает фоновые значения². Доля автотрофной бактериальной продукции составляет приблизительно 80–60% в ядре плюма и 10% на его периферии. Вновь образованное внутри плюма

²Величина локальной первичной продукции, образующейся в результате процессов хемосинтеза в истекающих флюидах непосредственно над гидротермальным полем, может быть очень высокой. Так, в Северной Атлантике в гидротермальных флюидах над полем ТАГ в результате бактериального хемосинтеза образуется $90\text{--}370 \text{ мгC}_{\text{орг}} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$ (миллиграмм органического углерода на квадратный метр в сутки), над полем Рейнбоу — $100\text{--}300 \text{ мгC}_{\text{орг}} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$, над полем Логачев — $195 \text{ мгC}_{\text{орг}} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$ и над полем Брокен-Спур — $20 \text{ мгC}_{\text{орг}} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$. Эти величины превышают величину фотосинтетической продукции в фотическом слое олиготрофных вод центральной тропической Атлантики над названными гидротермальными полями. Разумеется, при удалении от гидротерм продукция в плюмах резко падает.

органическое вещество может быть источником питания для планктонных животных; во всяком случае, оно может привлекать их из более бедных фоновых вод.

Плюм представляет собой динамичную структуру, постоянно меняющую свои очертания. Очевидно, отдельные плюмовые массы могут отрываться, подобно облакам, возможно, закручиваясь при этом во вращающиеся линзы воды. Эти «облака» гидротермально измененной воды, на которые распадается плюм, дрейфуют вдоль рифтовой долины, постепенно смешиваясь с окружающими водами. Находящийся в них и возле них запас органики, образовавшийся в результате бактериального хемосинтеза, может служить источником питания для чрезвычайно бедного глубоководного планктона. В результате возможно образование локальных пятен повышенной концентрации планктона, постепенно размывающихся вследствие рассеивания энергии в окружающей пустыне, хотя роль таких возмущений в огромных объемах глубинных вод исчезающе мала. Во всяком случае, специальные поиски обогащения «обычного» океанического планктона вблизи гидротерм, проводившиеся в ряде научных экспедиций, на сегодняшний день такого обогащения не выявили. Так что «утечка» гидротермальной продукции за пределы сообществ гидротерм если и есть, то очень небольшая. И фоновые сообщества океанских глубин кормятся все-таки по старой доброй «фотосинтетической» схеме.

И последнее...

Но постепенно выяснилось еще вот что. Блеск и кипение жизни гидротерм заставили людей пристальнее присмотреться к процессам хемосинтеза на океанском дне. И сейчас, вот в наши дни, выясняется, что не гремящие и бурлящие, а тихие и незаметные сочения, в первую очередь метана, имеют место быть. И перерабатываются бактериями по склонам желобов, и, главное, на огромных площадях материковых шельфов, где в воду попадает метан. Зря, что ли, там тоже находили погонофор... Метан холодных истечений есть, в основном, продукт разложения захороненного древнего органического вещества (главным образом, различных углеводов), поэтому существующих на основе его окисления бактерий нельзя считать «чистыми» первичными продуцентами. Они получают энергию из того, что все-таки когда-то, хотя и очень давно, входило в состав живых организмов. Но для современных сообществ они несомненно являются таковыми. Важно, что, в отличие от

«точечных» горячих гидротерм, холодные истечения могут происходить в достаточно обширных районах. И масштабы этого явления, его вклад в продукционную копилку Океана и всей биосферы Земли, еще только предстоит оценить. Возможно, вклад этот гораздо больше, чем представляется в настоящее время. Во всяком случае есть основания полагать, что, помимо локальных специфических сообществ, с ними связано массовое развитие фораминифер на материковом склоне и некоторых участках шельфа арктических морей (Баренцева, Норвежского, Карского). Есть сведения, что в дальневосточных российских морях (Охотском, Беринговом) скопления рыбы часто приурочены к районам с нефтепроявлениями, т.е. опять-таки к выходам метана. Пока это только предположения. Но, несомненно, они должны быть детально изучены, что, возможно, приведет к кардинальной переоценке источников продуктивности в присклоновых районах океана.

P.S.

Кроме гидротерм и холодных метановых сочений хемобиосные цепи питания могут возникать еще в одном, крайне любопытном, биотопе: на скелетах гигантских водных позвоночных, в наше время — китов, а в былые эпохи, возможно, и плезиозавров с ихтиозаврами.

После того, как глубоководные стервятники счищают с упавшей на дно туши все мясо, в костях скелетов сохраняется еще много органики, в первую очередь жира. Но стервятникам до него уже не добраться. И что же, пропадать добру? Как бы не так! На костях начинают развиваться бактерии: и те, что разлагают остатки китовой органики, и те, что перерабатывают возникающий при этом сероводород, запуская цепочки хемобиоса.

И, точно так же, как на гидротермах, за счет этих бактерий существуют многоклеточные организмы, в том числе двусторчатые моллюски, вступающие с бактериями-хемосинтетиками в настоящий симбиоз, культивируя их в собственных жабрах. Такие моллюски могут как шубой покрывать кости кита... На китовых костях селятся не только моллюски — смотри рассказ Ани Жадан на стр. 127.

Животные, подобные тем, что селятся на китовых костях, могут осваивать и другие источники медленно гниющей органики. Например, подобная фауна поселилась на судне с грузом бобов, затонувшем в Бискайском заливе. Существуют и более любопытные находки. Например, в 2001 г. международная экспедиция на

нашем научном судне «Академик Мстислав Келдыш» с помощью глубоководных аппаратов «Мир» исследовала лежащую недалеко от Багамских островов на глубине пяти километров шхуну, затонувшую около 200 лет назад с грузом кокосовых орехов. Во время работ выяснилось, что палуба шхуны сгнила, и остатки орехов грудой лежат в открывшемся трюме. Когда несколько орехов были подняты на поверхность, оказалось, что они буквально оплетены прикрепленными к ним трубками, служившими жилищем для многощетинковых червей хетоптерид, явно питавшихся развивающимися на гниющих кокосах бактериями.

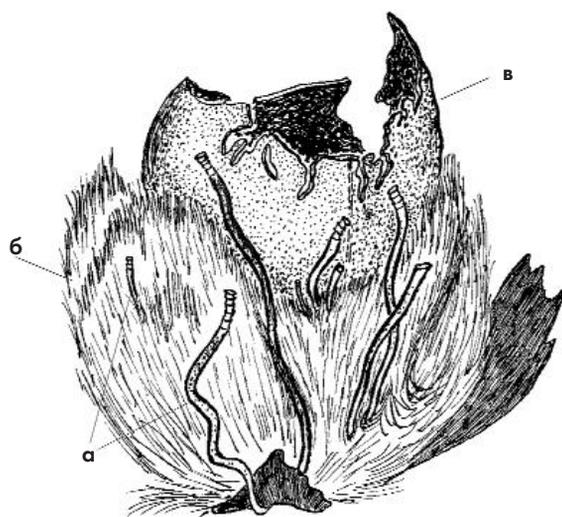


Рисунок 8. Остатки кокосового ореха.
(а) — трубки; (б) — полусгнившие волокна околоплодника, (в) — остатки ядра ореха. (НИС «Академик Мстислав Келдыш», 46 рейс, 06.07.2001 г., ст. 4178. Зарисовка с натуры.)

Приложение: Операция «Орлиное гнездо», или Как мы не нашли обогащения

Как уже говорилось выше, некое локальное обогащение окружающей «фоновой» биоты вблизи гидротермальных полей, происходящее за счет их хемосинтетической органики, теоретически может случаться.

В частности, следы такого обогащения можно попытаться поискать по сгущению «обычного» океанского планктона вблизи дна в районах истечений. Чем я, собственно, в последних лет и занимаюсь. И, хотя, похоже, подобного обогащения, во всяком случае хотя бы отчасти заметного, все-таки скорее нет, чем есть, вопрос остается открытым. И новых фактов на этот счет ощутимо не хватает (а пойдти, достань их с трехкилометровых-то глубин!).

И тут (вроде бы) подвалило.

Аккурат на скеле веков, в 2000 году, на вершине горы Атлантис Срединно-Атлантического хребта (30°07.5' с.ш.; 42°07.2' в.ш.), нашли новое гидротермальное поле, Лост-Сити. Геологически поле уникально. Во-первых, оно сидит на вершине горы, на глубине всего 800 м. Во-вторых, из-за особенностей бьющего из дна раствора, здесь нет «черных дымов», отлагающих сульфидные колонны. И вместо них формируются белые карбонатные башни, потрясающие вертикальные столбы до 60 (шестидесяти) метров высотой, врезающиеся в проходящий над вершиной Атлантиса поток воды. И из-за своего высокого положения поле омывается не беднейшими водами абиссали, а вполне себе обитаемыми водами меньших глубин, и мимо башен Лост-Сити в большом количестве проносит пелагических креветок, хетогнат, сифонофор и прочую живность.

В 2002 г. здесь работала наша экспедиция на научно-исследовательском судне «Академик Мстислав Келдыш», и во время спуска глубоководного обитаемого аппарата (ГОА) «Мир» ходивший наблюдателем А.Л. Верещака обнаружил, что вокруг башен вьются рои планктонных рачков (эуфаузиид и гипериид), а ловы планктонными сетями вроде бы тоже дали повышенную концентрацию планктона над вершиной Атлантиса и расположенным на ней полем. О чем мы и напечатали статью в 2003 г.

В 2003 г. здесь, снова с «Келдыша» и «Миров», велись киносъемки полудокументального фильма Джеймса Камерона «Aliens of the Deep», и на фрагментах подводных видеосъемок, показанных на борту, снова можно было видеть, как некие эуфаузииды вновь в большом количестве роились у прожекторов работающих на Лост-Сити аппаратов. В том же году американцы работали здесь с глубоководным аппаратом «Алвин», и тоже видели приращенные рои пелагических рачков. То, что они их видят не первыми, им в голову не пришло (ну разве они могут быть не первыми?), так что они радостно оповестили всех посредством Интернета, что поле Лост-Сити «Alive! Alive!» («Живое! Живое!») и возле его башен вьются «small shrimp-like creatures» («мелкие креветкоподобные существа» = эуфаузииды), а также рачки-амфиподы, причем some amphipods found at Lost City look very different than a «typical» amphipod («некоторые амфиподы, найденные в Лост-Сити, сильно отличались от типичных амфипод»). Последнее утверждение они проиллюстрировали фотографией, на которой легко можно опознать амфиподу-гиперииду рода *Primno*, одного из наиболее обычных родов планктонных амфипод Мирового океана. Прав-

да, надо признать, что к моменту публикации своих данных в 2005 г. они большинство багов исправили, но, похоже, до сих пор свято уверены, что кроме них там никто не работал. Ладно, кончаю кусаться: важно, что они тоже видели здесь рои.

Казалось бы: вот оно, искомое обогащение! Радуйтесь, нашли!

Но кое-что смущало. Смущало, что увеличение концентрации планктона показано единственной серией сетных ловов (т.е. забросов планктонной сети), а над вершиной горы, где течение рвется и завихряется, можно ожидать большой горизонтальной пятнистости в распределении планктонных животных, и кто знает, не вклепили ли мы сеть в богатое пятно. Смущало, что рачки, в массах наблюдавшиеся у дна, хорошо идут на свет, а аппараты там работают, естественно, с включенными прожекторами. Много чего смущало. И вот летом 2005 г. нам удалось снова попасть на Лост-Сити.

Что-то я расписался, так что не буду о том, как выяснилось, что та старая сетная серия и в самом деле, похоже, именно пришлась на пятно побогаче. Как прикидывали, откуда у вершины могли взяться эуфаузииды с гипериидами, если предположить, что они «левые» и, как оказалось, что в этом случае им взяться неоткуда, кроме как из набегающего на гору потока, тем более, что глубины тут для них привычные. Но вроде нет их столько в этом потоке. Значит — прожектора аппаратов?

Тем летом было два спуска «Мир» по планктонной программе, в одном наблюдателем ходил ваш покорный слуга. Хорошие были спуски. С просчетом планктона во всем столбе воды от начала темноты до дна. С работой у основания башен. При проходах ГОА вблизи дна неоднократно отмечались хетогнаты и планктонные рыбы, преимущественно циклотоны, реже — миктофиды и топорики (*Sternopychidae*), а также мелкие мизиды и пелагические креветки. Были обильны эуфаузииды, однако точное их количество определить было затруднительно, так как рачки (действительно!) активно собирались на свет ГОА и роились вокруг прожекторов.

И с подсчетом планктона в воде набегающей. Я уже говорил, что Лост-Сити украшено 60-метровыми карбонатными башнями, лучшими насестами для наблюдения за потоком.

...И вот аппарат выходит к самой здоровой из них и начинает всплывать вдоль отвесной стены. Долго всплывает. Снежно-белые свежие и грязно-белые старые участки карбонатной колонны скользят перед иллюминатором, сидящий в расщелине здоровенный краб машет клешней...

Вершина. Небольшая, с маленькую комнату, площадка, окруженная тремя тупыми зубцами. В центре мутными клубами поднимается прозрачный, опалесцирующий в свете прожекторов флюид. Аппарат выворачивает носом навстречу течению и подходит к обрыву. Центральный иллюминатор в обитаемой сфере аппарата ориентирован немного вниз, так что видно, как край башни уходит «из-под ног» и теряется в темноте. Сбоку вьется здешний хозяин — полуметровый каменный окунь. Аппарат принимает в балластные танки немного воды и опускается на вершину столба. Яркие искорки планктонных животных выныривают из темноты в лучи прожекторов, и, пока течение тащит их мимо, зверя надо успеть определить и записать, — впрочем, для записи существуют диктофоны...

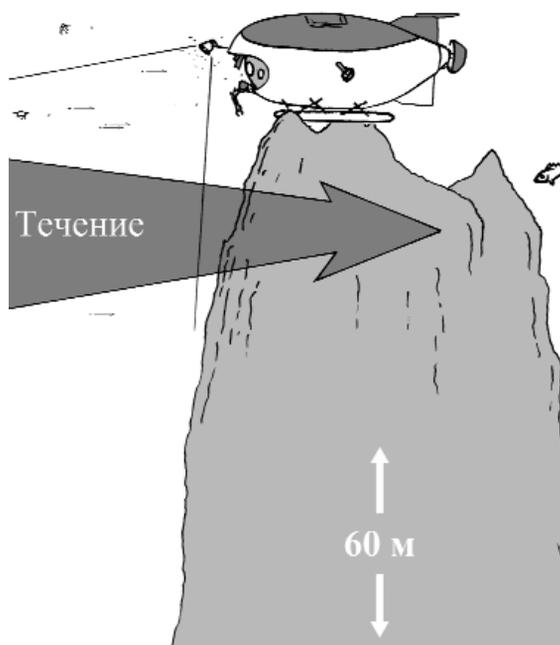


Рисунок 9. Аппарат «Мир» на башне Лост-Сити: наблюдения планктона в набегающем течении.

Из «отчета наблюдателя»: «Специальные наблюдения, проведенные при работе ГОА на вершине ~60-метровой башни с меткой «Echo-tag-12», подтвердили, что эуфаузииды рода *Nematoscelis* не держатся у дна и построек постоянно, а проносятся мимо них течением из «внешней» толщи воды. Через некоторое время после того, как аппарат сел на вершину постройки, был погашен весь свет как вне, так и внутри аппарата. Через 10 минут свет был зажжен вновь, и оказалось, что все кружившиеся возле аппарата планктеры за это время были унесены набегающим течением, у иллюминаторов было пусто. Затем течение периодически приносило эуфау-

зиид и гипериид, которые не уплывали дальше, а активно плыли к светильникам аппарата и постепенно образовывали новый рой. Таким образом, задерживаясь у светильников ГОА, рачки постепенно накапливаются в поле зрения наблюдателя, что и создает видимость присутствия придонных роев».

Кроме эуфаузиид, в состав наблюдавшихся в 2005 г. роев входили (в меньшем количестве) гиперииды *Platyscelus ovoides* (свободно плававшие в воде, преимущественно спиной вниз) и *Primno*, а также мальки рыб-топориков *Sternopygidae*, все – обычные представители фауны столба воды на этих и меньших глубинах, обна-

руженные и в сетных ловах, и в столбе воды при спусках ГОА.

Короче, не было там никакого обогащения. А был артефакт, когда непрерывно наносимые потоком и изначально даже не очень и многочисленные обычные планктонные рачки «открытой воды» цеплялись за свет аппарата и начинали виться вокруг и таскаться за ним по полю, создавая роскошную иллюзию густых придонных роев...

Такие дела. Отрицательный результат – тоже результат. Остался вопрос открытым.

...Просто маленький рассказик о том, как выглядит иногда современная биоокеанология...

Ранний нейрогенез трохофорных животных: появление и роль транзиторных нейронов

Е. Воронежская



Елена Воронежская,
6-й выпуск биокласса
(Лучшие), школа № 57
(1982 г.), д.б.н., ведущий
научный сотрудник Институ-
та биологии развития им.
Н.К. Кольцова РАН,
lena_vor@mail.ru

Беспозвоночных животных, имеющих в жизненном цикле трохофору или трохофороподобную личинку, объединяют в группу трохофорных (*Trochozoa*). К ним относятся аннелиды, моллюски, эхиуриды и сипункулиды. Нервная система взрослых животных состоит из ганглиев, в которых собраны нервные клетки. Отростки этих клеток переходят из одного ганглия в другой, образуя связывающие отдельные части нервной системы коннективы и комиссуры, и уходят к различным органам тела в многочисленных отходящих от ганглия нервах. Несмотря на то, что развитие моллюсков и аннелид давно и успешно изучалось классическими эмбриологическими методами (Anderson, 1966; Raven, 1966; Cumin, 1972; Мещеряков, 1975), которые затрагивали в числе прочих и развитие нервной системы, данные о нейрогенезе и особенно о самых ранних его этапах, немногочисленны и противоречивы, а функции специфических личиночных нейронов до настоящего времени оставались на уровне предположений и в большинстве случаев не имели экспериментального подтверждения.

Так считалось, что нейроны центральных ганглиев у личинок происходят из эктодермальных зон, в которых клетки делятся, а затем мигрируют внутрь и занимают свои места в соответствующих ганглиях. Именно там клетки окончательно становятся нейронами, начинают экспрессировать свойственный им набор нейротрансмиттеров (химических веществ, передающих сигналы между нервными клетками),

а их отростки прорастают наружу и образуют комиссуры и коннективы. Позже появляются нервные клетки на периферии, а их отростки подрастают к центральным ганглиям. Эктодермальные зоны деления были обнаружены на переднем полюсе тела личинок, поэтому наблюдаемое морфологами формирование ганглиев в направлении спереди-назад: сначала церебральные (головные), затем педальные (находящиеся в ноге) или вентральные (брюшные) стволы и потом все остальные, имеющиеся у каждого конкретного вида, — представлялось вполне логичным.

То есть до недавнего времени считалось, что дифференцировка нейронов у трохофорных животных идет от центральной нервной системы к периферии и прогрессирует в росто-каудальном направлении (т.е. от головы к хвосту) (рисунк 1). Работами нашей группы, изучающей формирование нервной системы у наиболее характерных представителей различных типов трохофорных, методами иммуноцитохимического маркирования и лазерной сканирующей микроскопии, было показано, что оба вышеперечисленных принципа неверны.

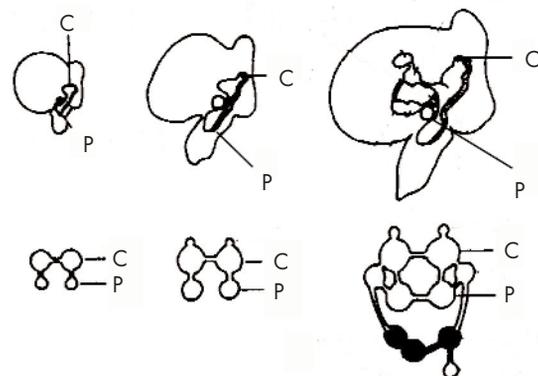


Рисунок 1. Представление о формировании нервной системы у трохофорных на примере *Aplysia californica* (по Kriegstein, 1977, с изменениями).

Верхний ряд: личинка на стадиях трохофоры — ранней ювенильной формы, вид сбоку справа, обозначена формирующаяся нервная система. Нижний ряд — нервная система на тех же стадиях развития, вид сверху. С — церебральные ганглии, Р — педальные ганглии.

Мы подробно изучили развитие пресноводных улиток — большого прудовика *Lymnaea stagnalis* и аквариумной катушки *Helisoma trivolvis* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata); морских голожаберников аплизии *Aplysia californica* и тритонии *Tritonia diomedea* (Mollusca, Gastropoda, Opisthobranchia); древнейшего представителя моллюсков — хитона *Ischnochiton hakodadensis* (Mollusca, Polyplacophora); а также полихет филлодоце *Phyllodoce maculata* (Polychaeta, Phyllodocida) и платинереиса *Platynereis dumerilii* (Polychaeta, Nereididae) с момента появления самого первого нейрона и до формирования взрослой нервной системы (Croll, Voronezhskaya, 1995, 1996; Voronezhskaya, et al., 2002, 2003; Nezhlin, Voronezhskaya 2003). Теперь с уверенностью можно сказать, что самые ранние нервные элементы у моллюсков и аннелид дифференцируются на стадии ранней трохофоры, т.е. гораздо раньше, чем можно обнаружить клетки в местах формирования будущих ганглиев. Они экспрессируют пептиды семейства FMRFамида у моллюсков и серотонин у полихет, а также белок микротрубочек — тубулин, благодаря чему выявляются на самых ранних этапах дифференцировки при использовании методов иммуоцитохимии. Их тела расположены в задней области зародыша, а не в передней, как должно было бы быть в соответствии с существующими представлениями о нейрогенезе трохофорных. Короткие отростки проходят сквозь эпителий и имеют чувствительные реснички, т.е. клетки являются сенсорными.

Длинные отростки, которые эти клетки посылают вперед, образуют контур, или «скелет»,

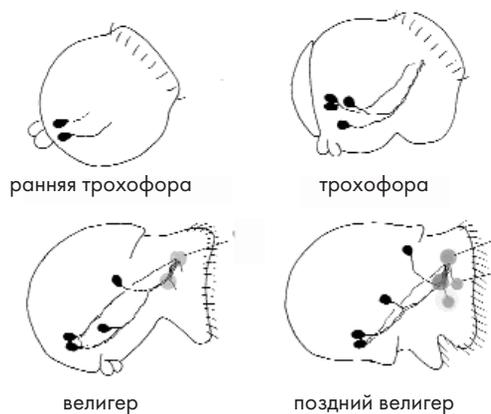


Рисунок 2. Современное представление о последовательности событий в раннем нейрогенезе трохофорных на примере *Aplysia californica* (по Croll, Voronezhskaya, 1996, с изменениями).

Вид сбоку справа. Черным обозначены ранние FMRF-иммунореактивные транзиторные нейроны, серым — места формирования ганглиев.

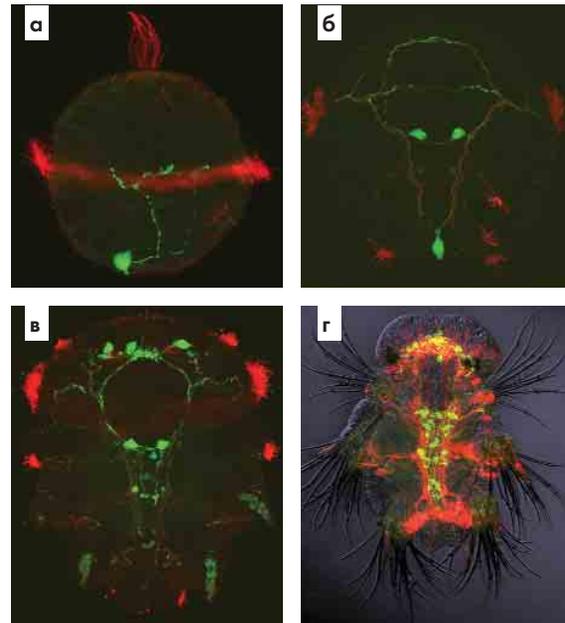


Рисунок 3. Появление серотонин-иммунореактивных клеток в нейрогенезе полихеты *Platynereis dumerilii* (Voronezhskaya et al., в печати).

Зеленый цвет — иммунореактивность к серотонину, красный — к тубулину. (а) — Первая каудальная клетка на стадии трохофоры. Ее длинные отростки идут вперед, маркируя места будущих вентральных стволов и нерва прототроха. (б) — У метатрохофоры отростками ранних клеток сформирован контур всей взрослой нервной системы, начали появляться первые нейроны вдоль вентральных стволов. (в) — К стадии нектохеты вентральные стволы сближаются, нейроны появляются в церебральных ганглиях и в ганглиях вентральной цепочки. (г) — Ювенильный червяк на 3-й день после оседания.

вдоль которого позже развиваются центральные ганглии и соединяющие их коммиссуры и коннективы (рисунок 2). В местах будущей закладки ганглиев первые дифференцированные нейроны, экспрессирующие серотонин, дофамин и FMRFамид, появляются только после того, как основная схема центральной нервной системы будет сформирована отростками ранних нейронов (рисунок 3).

Следующими по времени появляются нейроны на переднем полюсе личинки. Они также сенсорные и образуют так называемый апикальный сенсорный орган — клеточное образование плавающих личинок беспозвоночных животных, которое формируется с началом плавания и редуцируется после метаморфоза. Апикальный орган имеется у представителей даже таких таксонов, которые считаются неродственными. Личинки, развитие которых модифицировано тем, что они не плавают и проходят метаморфоз внутри яйцевых оболочек, тем не менее сохраняют свой апикальный орган. При всем многообразии форм развития беспозвоночных, личинки

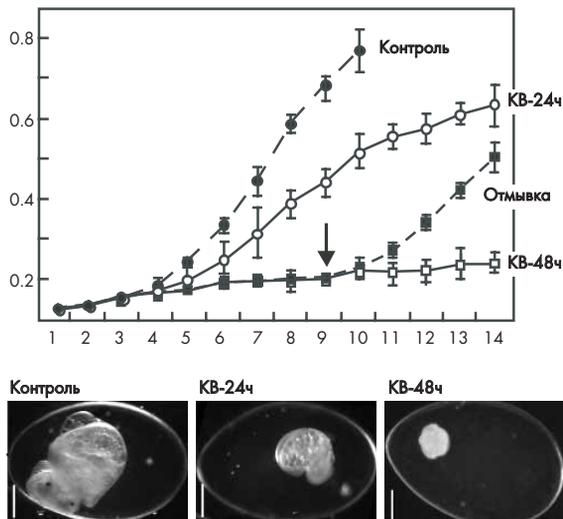


Рисунок 4. Действие фактора, содержащегося в воде, кондиционированной голодными взрослыми улитками в течение 24 (KB–24) и 48 (KB–48) часов, на темпы развития прудовика *Limnaea stagnalis* (из Voronezhskaya *et al.*, 2004, с изменениями).

По вертикали — размер зародыша в мм, по горизонтали — дни эксперимента. К 10-му дню контрольные особи завершают метаморфоз и становятся миниатюрными ювенильными улитками. Кондиционированная вода концентрационно-зависимо и обратимо замедляет развитие зародышей, так что на 10-й день они достигают только стадии велигера (KB–24) или трохофоры (KB–48).

всегда имеют на апикальном конце тела сенсорный орган, включающий султанчик чувствительных ресничек и лежащий в его основании комплекс сенсорных нейронов.

Уникальная эволюционная консервативность апикального органа свидетельствует о том, что он выполняет какую-то (какие-то) консервативную функцию, общую для разных личинок. Однако, хотя это нервное образование было описано очень давно (Conklin, 1897), десятилетия сравнительных и экспериментальных исследований так и не привели к формированию аргументированного взгляда на назначение апикального органа.

Априори считалось, что эмбриональное развитие и личиночное развитие до метаморфоза — это программа, которая, будучи раз запущена, работает без корректировки со стороны имгинальной фазы, то есть, взрослые животные не могут направленно регулировать прохождение своими потомками личиночной фазы. Оказалось, что это не так. Взрослые особи в неблагоприятных условиях выделяют в воду химические вещества, которые улавливаются нейронами апикального органа личинок и позволяют им скорректировать свою программу развития в соответствии с имеющимся «прогнозом» (Воронежская, Хабарова, 2003; Voronezhskaya *et*

al., 2004). Так, если сигнал воспринимается личинкой на ранней стадии развития, то она замедляет темпы роста и все моторные программы, чем повышает свои шансы переждать неблагоприятные условия (рисунок 4). Если же сигнал воспринимается личинкой уже после метаморфоза, то темпы развития и моторные программы, наоборот, активируются, что дает возможность скорее достичь вылупления, и, активно передвигаясь, покинуть неблагоприятную зону. Таким образом, нейроны апикального органа обеспечивают реализацию адаптивных приспособительных программ личинок, на которых и основывается эволюционное преимущество двухфазного жизненного цикла — повышенная выживаемость и лучшая расселяемость потомков.

Следует заметить, что все ранние клетки являются транзитными, т.е. в определенный момент развития перестают синтезировать характерные для них транскрипты, и, вероятнее всего, выполнив свою морфогенетическую и регуляторную функцию, подвергаются запрограммированной клеточной гибели.

Описанная мной область исследований лежит в стороне от таких актуальных для человечества проблем, как борьба с раковыми и возрастными заболеваниями, восстановление органов из стволовых клеток или познание основ когнитивной деятельности. Тем не менее, я считаю эту область биологии не менее важной, поскольку она изучает базовые механизмы, лежащие в основе регуляции эмбрионального развития животных.

Литература

- Воронежская Е.Е., Хабарова М.Ю. 2003. Функция апикального органа в развитии беспозвоночных // Доклады АН, 390: 231–234.
- Мещеряков В.Н. 1975. Прудовик *Limnaea stagnalis* L. — Объекты биологии развития. — М.: Наука, 53–92.
- Anderson D.T. 1966. The comparative embryology of the Polychaeta // Acta Zoologica, 47: 1–42.
- Conklin E.G. 1897. The embryology of *Crepidula* // J. Morphol., 13: 1–230.
- Croll R.P., Voronezhskaya E.E. 1995. Early FMRamide-like immunoreactive cells in gastropod neurogenesis // Acta Biol. Hung., 46: 295–303.
- Croll R.P., Voronezhskaya E.E. 1996. Early elements in gastropod neurogenesis // Dev. Biol., 173: 344–347.
- Cumin R. 1972. Normantafel zur Organogenese von *Limnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata) mit besonderer Berücksichtigung der Mitteldarmdrüse // Rev. Suisse Zool., 79: 709–774.
- Kriegstein A.R. 1977. Development of the nervous system of *Aplysia californica* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74: 375–378.

Nezlin L.P., Voronezhskaya E.E. 2003. Novel, posterior sensory organ in the trochophore larvae of *Phyllodoce maculata* (Polychaeta) // Proc. R. Soc. Lond., B (Suppl.), 270: 159–162.

Raven C.P. 1966. Morphogenesis: the analysis of molluscan development. Oxford. Pergamon Press.

Voronezhskaya E.E., Khabarova M.Yu., Nezlin L.P. 2004. Apical sensory neurons mediate developmental retardation

induced by conspecific environmental stimuli in freshwater pulmonate snails // Development, 131: 3671–3680.

Voronezhskaya E.E., Tsitrin E.B., Nezlin L.P. 2003. Neuronal development in larval polychaete *Phyllodoce maculata* (Phyllocidae) // J. Comp. Neurol., 455: 299–309.

Voronezhskaya E.E., Tyurin S.A., Nezlin L.P. 2002. Neuronal development in larval chiton *Ischnochiton hakodadensis* (Mollusca: Polyplacophora) // J. Comp. Neurol., 444: 25–38.

Цитоскелет

А. Кашина



Анна Кашина,
6-й выпуск биокласса
(Лучшие), школа № 57
(1982 г.), закончила
кафедру вирусологии Био-
фака МГУ (1987 г.), к.б.н.,
профессор биохимии Пен-
сильванского университета в
Филадельфии, США,
akashina@yahoo.com

Вы, конечно, знаете, что все живые организмы (ну, кроме вирусов) состоят из клеток. А знаете ли вы, что у клеток, как и у людей, есть скелет? Да не один, а целых три.

Три скелетных системы необходимы потому, что цитоскелет (т.е. скелет клетки) выполняет кроме опорной функции массу других и координирует все процессы клеточной жизнедеятельности — движение, взаимодействие клетки с окружающей средой, внутриклеточный транспорт и даже размножение, то есть деление. Эти многообразные функции распределены между тремя типами, или системами цитоскелета (рисунки 1): актиновыми филаментами (красный цвет), микротрубочками (зеленый цвет) и промежуточными филаментами (желтый цвет).

Цитоскелет состоит из системы фибрилл, которые пронизывают цитоплазму во всех направлениях (рисунок 2). На первый взгляд, эти фибриллы расположены беспорядочно. Но на самом деле каждая из систем представляет собой взаимосвязанную динамичную структуру, чье положение в пространстве строго контролируется в каждый момент клеточного цикла. В ответ на внешние сигналы цитоскелет может перестраиваться в течение секунд, обеспечивая быструю реакцию клеток на окружающую среду.

Актиновые филаменты в основном отвечают за движение целой клетки, но также принимают участие в других процессах. Их функции варьируют от таких общих процессов, как сокращение мышц (в котором принимают участие много клеток сразу), до таких частных процессов, как движение клеточных органелл на короткие расстояния внутри цитоплазмы. Актиновые филаменты участвуют в прикреплении клеток к субстрату и их движению внутри

тканей, в изменении формы клеток за счет сокращения и выбрасывания отростков, в поддержании динамичной структуры клеток и в образовании перетяжки, которая завершает деление клеток животных.

В мышечных клетках актиновые филаменты образуют миофибриллы — сократимые пучки, которые могут быстро укорачиваться и удлиняться в ответ на сигналы от нервных клеток, и которые позволяют нам двигаться, разговаривать, дышать, ну и вообще существовать. В немышечных клетках актин тоже образует сократимые пучки, и эти пучки тоже отвечают за движение — но уже не организма, а клетки. Таким образом, актиновый цитоскелет, пожалуй, более правильно сравнивать не с костями животных, а с мышцами. Но так уж повелось, что называют актин скелетом, а не мышечной системой клетки.

Как нетрудно догадаться по названию, актиновые филаменты состоят из белка актина. Этот белок полимеризуется и образует тонкие фибриллы. Получая сигналы от клетки, эти фибриллы могут быстро собираться и разбираться в разных местах цитоплазмы, обеспечивая быструю реакцию на окружение. Например, если

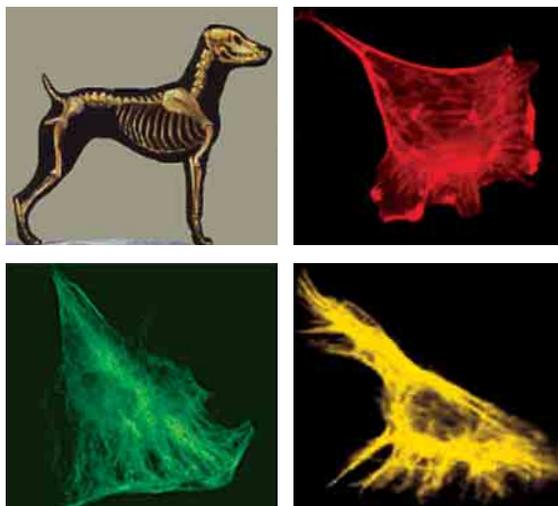


Рисунок 1. Три скелетных системы клетки.

Цитоскелет создает структурную опору клеток и этим немного напоминает скелет животных. Но только у клеток он представлен тремя разными системами фибрилл — актиновыми филаментами (красный цвет), микротрубочками (зеленый цвет) и промежуточными филаментами (желтый цвет).

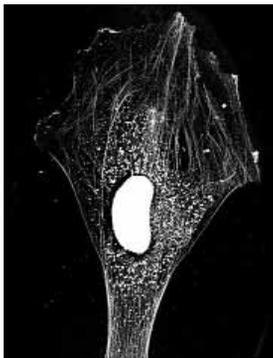


Рисунок 2. Цитоскелетные фибриллы.

Если удалить клеточную мембрану, напылить тонким слоем платины оставшиеся структуры и посмотреть на все это в электронный микроскоп, то можно увидеть, что вся цитоплазма пронизана системой цитоскелетных фибрилл.

где-то появилась пища, клетки быстро собирают свои актиновые филаменты и ползут в сторону нового сигнала. А если появился яд — тут уж понятно, надо удирать. В этом случае актин полимеризуется на другом конце клетки, чтобы ползти в противоположную сторону.

Пожалуй, не менее важная и разнообразная по функциям система цитоскелета, чем актин, — это микротрубочки. Они получили свое название потому, что их основной структурный белок тубулин полимеризуется в полые трубообразные тяжи, совсем как маленькие трубочки. В масштабах клетки, кстати, не такие уж маленькие. Из всех трех цитоскелетных систем микротрубочки самые толстые, их диаметр — целых 20 нм (нанометров).

Основная функция микротрубочек — внутриклеточный транспорт. Микротрубочки служат рельсами для всех видов быстрого транспорта органелл и частиц внутри клеток. В интерфазе микротрубочки образуют радиальную сеть, которая расходится от клеточного центра (центросомы) к периферии. По этой сети органеллы и частицы могут ездить по всей цитоплазме до самой плазматической мембраны и обратно до самого ядра. Скорость этого движения около 1 микрометра в секунду, так что за несколько секунд в средней клетке частица может добраться от ядра до края. В митозе микротрубочки быстро перестраиваются и образуют биполярное митотическое веретено — аппарат, который обеспечивает равную сегрегацию (т.е. распределение) хромосом между двумя дочерними клетками.

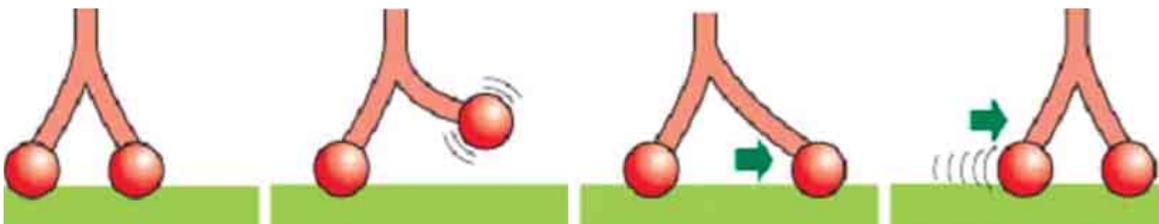


Рисунок 3. Моторный белок шагает по цитоскелетным рельсам, преобразуя энергию АТФ в энергию механического движения.

Если говорить о настоящем эквиваленте клеточного скелета, следует говорить о *промежуточных филаментах*. Эти фибриллы, в разных тканях образованные из белков виментина, десмина или кератина, очень прочные и совсем не такие динамичные как актин. Недавно, однако, было показано, что и эти фибриллы постоянно собираются и разбираются, иногда полностью обновляя свой состав в течение минут.

Промежуточные филаменты — это прочные эластичные тяжи, которые закоривают внутриклеточные структуры и создают защитную оболочку для таких важных органелл как, например, ядро, где хранится вся генетическая информация. Благодаря своей структурной роли эта система цитоскелета — самая пассивная. Даже для того, чтобы распределиться по клетке, промежуточные филаменты используют микротрубочки. Они связываются концами со стенками микротрубочек и скользят по ним, пока не достигнут клеточной периферии. А если микротрубочки разрушить, то промежуточные филаменты просто схлопываются в комок в центре клетки — совсем как натянутая палатка схлопнется, если выдернуть сразу все колышки.

Помимо основных структурных белков — актина, тубулина и виментина-кератина — цитоскелетные системы включают в себя много так называемых ассоциированных белков. Эти белки взаимодействуют с основными цитоскелетными структурами и регулируют их свойства, например способность собираться в пучки, сборку и разборку, взаимодействие друг с другом и с органеллами внутри клетки. Среди ассоциированных белков особую роль играют так называемые *моторные белки*.

Моторные белки обладают уникальным свойством. Они умеют преобразовывать энергию АТФ — универсальной энергетической молекулы в клетках — в механическую энергию движения. В упрощенном виде моторные белки выглядят как палочки на двух ножках (рисунок 3). Каждая ножка — или, как говорят в этой области науки, головка — это моторный центр, который может генерировать «шаг» в процессе гидролиза одной молекулы АТФ. Моторные «ножки» гидролизуют

АТФ по очереди. Пока одна из них гидролизует и делает шаг, вторая стоит на месте. В целом получается точно как ходьба — молекула мотора идет, переставляя по очереди одну ногу за другой. А на «спине» своей мотор несет груз — внутриклеточную частицу или органеллу. Так осуществляются все формы активного внутриклеточного транспорта органелл и крупных частиц — от транспорта пигментных пузырьков в процессе смены окраски у рыб до транспорта хромосом в митозе.

Моторные белки очень специфичны. Каждый из них переносит только определенный тип органелл или частиц. Каждый из них строго специфичен к своей фазе клеточного цикла — в интерфазе моторов немного, а в митозе, когда все усилия брошены на быстроту и точ-

ность в распределении генетического материала, действует не менее десятка разных моторов. Но главное различие моторов — в типе внутриклеточных «рельс», которые они используют для транспорта. Два основных типа моторов — кинезин и динеин — движутся только по микротрубочкам, причем кинезин всегда шагает в направлении края клетки, а динеин движется к центру. Третий мотор — миозин — движется только по актину. Разные типы миозина принимают участие в сокращении мышц и немышечных актиновых пучков, в движении органелл в цитоплазме и в образовании перетяжки при делении клеток. Конечно, этим не ограничиваются функции этих трех моторов, да и разнообразие у них — будь здоров. Но это уже совсем другая история.

Загадочные ракообразные Беломорья

Г. Колбасов



Григорий Колбасов,
7-й выпуск биокласса
(Терапсиды), школа № 57
(1984 г.), закончил кафедру
зоологии беспозвоночных
Биофака МГУ (1989 г.),
д.б.н., ведущий научный сот-
рудник Беломорской биоло-
гической станции МГУ,
kolbasov@soil.msu.ru

Когда я в 1983 г. в первый раз оказался на Белом море, кроме замечательной северной природы мне запомнились разнообразные морские животные, увиденные впервые и отсутствующие в теплом, но более бедном Черном море. И, конечно, среди них были разнообразные ракообразные, представленные суетливыми бокоплавами, копеподами и креветками, медлительными и задумчивыми крабами и домоседами баянусами. Тем не менее все эти животные — лишь надводная часть айсберга надкласса Crustacea, подводная часть которого скрывает целый ряд загадочных и малоизученных групп, ждущих своих исследователей. Здесь я расскажу о некоторых из них.

Мешкогрудые ракообразные подкласса Ascothoracida — паразиты кишечнорастных и иглокожих

Мешкогрудые ракообразные подкласса аскторацид (Ascothoracida) — это дальние родственники баянусов — усоногих ракообразных подкласса циррипедий (Cirripedia). Мешкогрудые ракообразные являются экто- или эндопаразитами (наружными или внутренними) иглокожих: морских звезд, морских лилий, морских ежей и офиур (классы Asteroidea, Crinoidea, Echinoidea и Ophiuroidea) и кишечнорастных (отряды Scleractinia, Zoantharia, Antipatharia, Gorgonaria и Alcyonaria). Около ста видов аскторацид ассоциированы в два отряда — Laurida и Dendrogastriida (Grugier, 1987). Изначально взрослые стадии этих животных сохраняют многие личиночные признаки: двустворчатый щит — карапакс — вырост максиллярного сегмента

головы, покрывающий тело; развитые хватательные антеннулы, вооруженные клешнями; шесть грудных сегментов — торакомеров (от слова торакс — грудь) с двуветвистыми конечностями и пятисегментное брюшко — абдомен с пенисом на первом сегменте. В эволюционно продвинутых группах у самок наблюдается тенденция к гипертрофированному разрастанию карапакса, редукции сегментации антеннул, груди, конечностей и брюшка. Все Ascothoracida, за исключением семейства Petrarciidae, представленного гермафродитами, являются раздельнополыми ракообразными. Карликовые самцы, всегда сохраняющие личиночные признаки, известны для большинства таксонов. Самки большинства Ascothoracida вынашивают эмбрионы внутри мантийной полости, образованной разросшимся карапаксом, хотя некоторые виды обладают свободноживущими планктонными личинками-науплиусами (изначально 6 стадий). Науплиусы линяют в двустворчатых личинок, которые называются цирприсовидными аскторацидными личинками из-за сходства с ракушковыми рачками (Ostracoda) из рода *Cypris*. Эти личинки являются инвазионной стадией (рисунок 2б), то есть стадией, которая заражает новых хозяев.

Род *Dendrogaster* (Knipowitsch, 1890) является самым крупным среди Ascothoracida и включает около 30 видов, паразитирующих в целомической полости морских звезд. Самки (рисунок 1а–е) обладают большой билатерально ветвящейся мантией, в которой находятся: вырост кишки, гонады и выводковая камера; срединный (медианный) вырост мантии несет небольшое отверстие — апертуру, расположенное на его вершине. Собственно тело самки состоит из трех отделов. Головной отдел несет развитые, четырехсегментные антеннулы и ротовые придатки — редуцированные палочковидные мандибулы и максиллулы и гарпуновидные максиллы. Грудной и брюшной отделы сильно редуцированы.

Наш соотечественник, известный ученый, исследователь северных морей и общественный деятель Н.М. Книпович, еще до своего знакомства с большевиками (через свою сестру Л.М. Книпович — подругу Н.К. Крупской) успел описать и детально исследовать анатомию *Dendrogaster astericola* (Knipowitsch, 1890) — типového

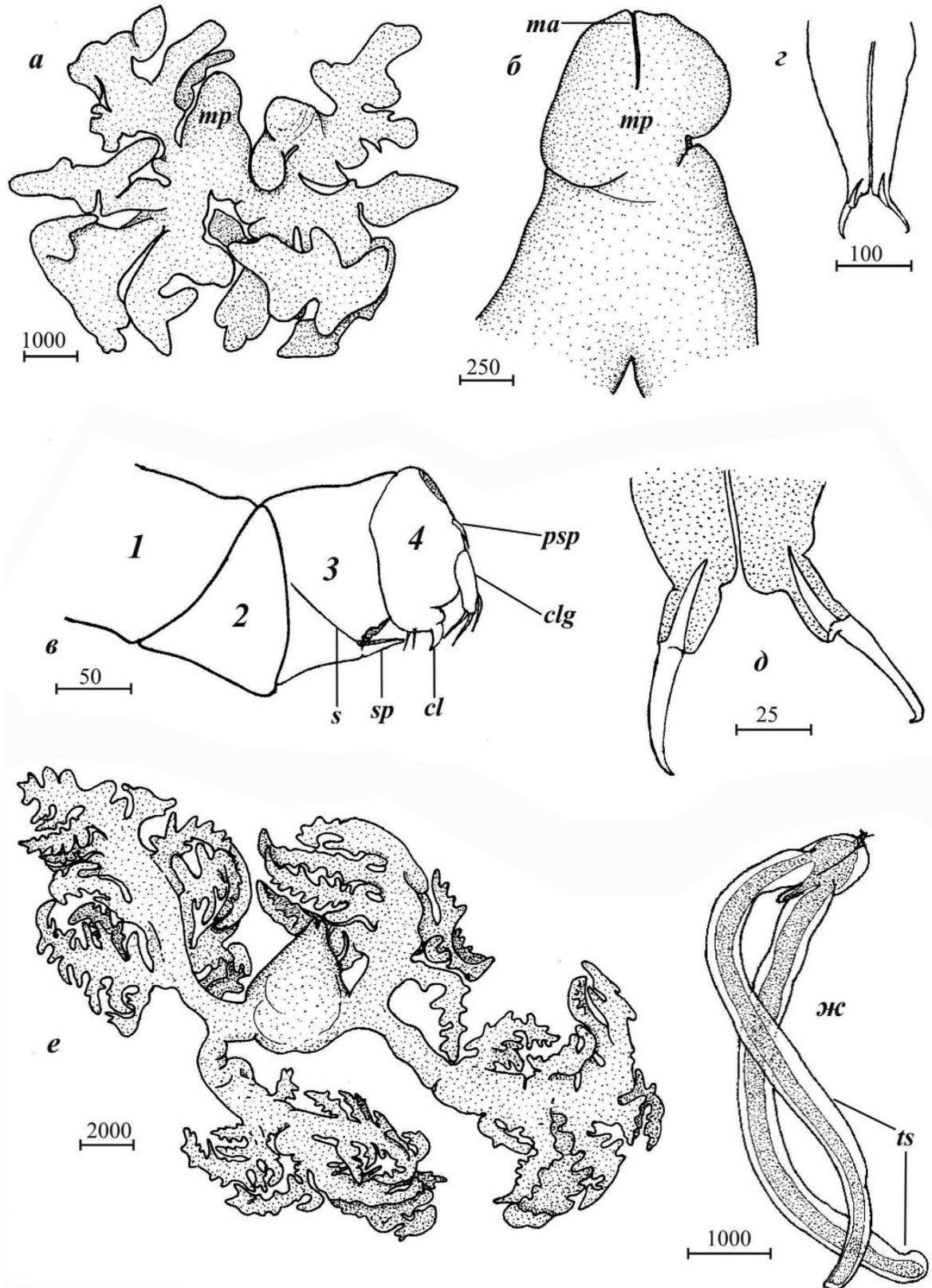


Рисунок 1. Морфология самок и карликовых самцов рода *Dendrogaster*.

(а–д) — *D. beringensis*, самка; (е) — *D. astropectinis*, самка; (ж) — *Dendrogaster dichotoma*, карликовый самец. (а, е) — общий вид, дорсальная сторона; (б) — медианный вырост с апертурой, вентральная сторона; (в) — антеннула (сегменты пронумерованы); (г) — максиллы; (д) — дистальные части максилл; (ж) — общий вид, вентральная сторона. Обозначения: *cl* — крюк; *clg* — дистальный сенсорный вырост; *ta* — мантийная апертюра; *mp* — медианный вырост; *psp* — проксимальный сенсорный вырост; *s* — шов, обозначающий границу слившихся сегментов; *sp* — шипы третьего сегмента антеннул; *ts* — семенники. Масштаб в мкм.

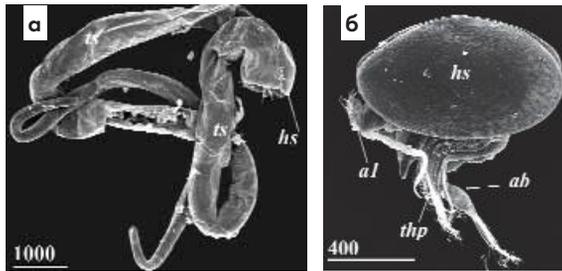


Рисунок 2. Морфология карликового самца и аскоторацидной личинки рода *Dendrogaster*.

(а) — *D. astropectinis*; (б) — *D. astericola*: (а) — карликовый самец, общий вид сбоку; (б) — аскоторацидная личинка второй стадии, общий вид сбоку. Обозначения: *a1* — антеннула; *ab* — abdomen; *hs* — головной щит (карапакс); *thp* — грудные конечности; *ts* — семенники. Масштаб в мкм.

вида рода из целома (внутренней полости) беломорских морских звезд *Henricia sanguinolenta* (O.F. Mueller, 1776; Книпович, 1890, 1892). Исследование таксономии, развития и биологии рода связано с именем другого российского ученого — профессора Казанского университета В.Л. Вагина, описавшего 12 видов *Dendrogaster* (Вагин, 1976).

Самки этого рода, как правило, вынашивают личинок внутри мантийной полости, где также располагаются карликовые самцы (рисунки 1ж; 2а), морфология которых мало отличается от морфологии аскоторацидных личинок, за исключением длинных цилиндрических задних выростов внутренней поверхности карапакса, в которых находятся вырост кишки и семенники (Вагин, 1976). Науплиальные стадии *D. astericola* развиваются внутри яичевой оболочки, так что из яйца выходит аскоторацидная личинка первой стадии, которая внутри материнской мантийной полости линяет в аскоторацидную личинку второй стадии, являющуюся инвазионной. Для этой личинки характерны двустворчатый карапакс, хватательные четырехсегментные антеннулы с клешней на последнем сегменте, пять, а не шесть пар плавательных двуветвистых конечностей (первая пара редуцирована) и пятисегментное брюшко. Такая личинка попадает в планктон и, проплавав некоторое время во внешней среде, находит организм хозяина — морской звезды. Затем, через протоки половых желез хозяина, личинки самок проникают в его половые железы — гонады, где и происходит метаморфоз, сопровождающийся редукцией груди и брюшка. Створки карапакса личинки разрастаются в огромный мантийный мешок. Так формируется самка, которая мигрирует из гонады в целомическую полость звезды. Затем внутрь мантийной полости самки через отверстие на переднем конце, попадают аскоторацид-

ные личинки самцов. Питается самка клетками целома хозяина и окружающими ее тканями.

Загадочные Y-личинки

Представители подкласса фасетотект (*Facetotecta*) — наиболее загадочная группа ракообразных. Описанные в 1899 г. Хансенем (Hansen, 1899), они до сих пор известны нам как Y-личинки, т.к. взрослые особи этих ракообразных еще не найдены. Прикрепительные антеннулы и крючковидный лабрум, или верхняя губа, — свидетельства в пользу паразитизма взрослых. Эти животные, скорее всего, встречаются в планктоне во всех районах Мирового океана. Найдены они и в Белом море, где описан вид *Hansenocaris itoi* (Kolbasov, Hoeg, 2003).

Науплиальные стадии фасетотект (рисунок 3а, б) по своей морфологии напоминают таковые усоногих ракообразных (*Cirripedia*), поэтому многие авторы сначала относили их к одному из отрядов циррипедий. Однако открытие более поздней личиночной стадии этих ракообразных (Bresciani, 1965), названной Y-циприсом (рисунок 3в), показало, что эти животные образуют отдельный таксон, являющийся лишь сестринской группой усоногим ракообразным.

Поверхность карапакса науплиусов и циприсовидной личинки покрыта кутикулярными гребнями, формирующими так называемые таблички. Науплиусы с тремя парами конечностей: антеннулами, антеннами и мандибулами,

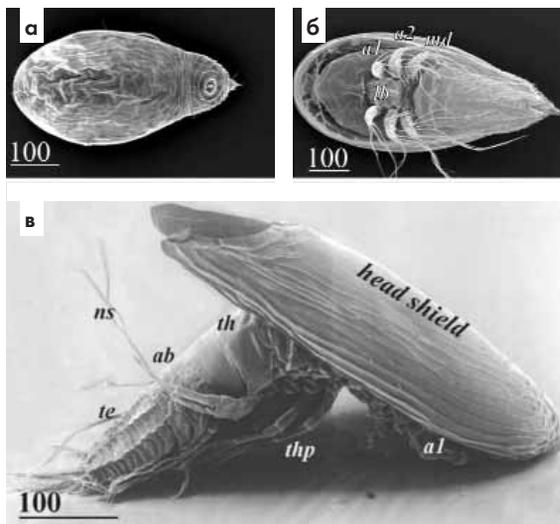


Рисунок 3. Личиночные стадии *Facetotecta* (*Hansenocaris itoi*; Kolbasov, Hoeg, 2003).

(а, б) — науплиусы, дорсальная и вентральная стороны; (в) — циприсовидная личинка, вид сбоку. Обозначения: *a1* — антеннула; *a2* — антенна; *ab* — abdomen; *lb* — лабрум; *md* — мандибула; *ns* — плавательные щетинки; *te* — тельсон; *th* — торакс; *thp* — торакоподы. Масштаб в мкм.

служащими для плавания и питания, и верхней губой — лабрумом. Циприсовидная личинка — с лодковидным одностовчатым карапаком, который лишь частично покрывает тело со спинной (дорсальной) стороны. Антеннулы четырехсегментные, с крюком на третьем сегменте. Торакс несет шесть пар двуветвистых плавательных конечностей. Абдомен развит, с четырьмя сегментами, из которых последний — тельсон, наибольший, с несегментированной вилкой — фуркой.

Большинство авторов использовали неформальную таксономию фасетотект, описывая различные типы личинок и не указывая их видовой принадлежности, пока японский исследователь Татсунори Ито не предложил новый род *Hansenocaris* для трех новых видов, описанных на основании морфологии циприсовидной стадии (Ито, 1985). Впоследствии Ито описал еще несколько новых видов фасетотект, но неудачные попытки обнаружить их взрослые стадии довели этого талантливого ученого до суицида.

К настоящему времени описаны 10 видов *Facetotecta*, из них 6 — на основании морфологии циприсовидной личинки и 4 — по науплиальным стадиям.

Тантулокариды — самые мелкие ракообразные

Ракообразные класса тантулокарид (*Tantulocarida*) являются наименьшими из всех известных ракообразных (их размеры колеблются от 80 до 400 микрометров), ведущими эктопаразитический образ жизни. Тантулокариды используют других бентосных ракообразных, таких как *Soropoda*, *Isopoda*, *Tanaidacea*, *Ostracoda*, *Cumacea* и *Amphipoda*, в качестве хозяев. Изучение *Tantulocarida* началось в начале прошлого века, когда французский натуралист Жюль Боннье (Jules Bonnier, 1903) описал из вод Лигурийского моря ракообразных рода *Cumoniscus*, паразитирующих на кумовых раках, рассматривая их как представителей нового семейства паразитических изопод. Впоследствии представители тантулокарид были обнаружены на конечностях *Tanaidacea* (Hansen, 1913) и отнесены к паразитическим копеподам. Через полвека эти ракообразные были вновь обнаружены на танаидах, для них был предложен новый вид *Microdajus langi* (Greve, 1965). Бекер описал несколько жизненных стадий нового рода микроскопических ракообразных, паразитирующих на глубоководных копеподах, гарпактицидах, из района Перуанской котловины (Becker, 1975). Он также

поместил новый вид *Basipodella harpacticola* среди *Soropoda*.

При более тщательном исследовании морфологии этих паразитических ракообразных и описании других таксонов было установлено, что все они могут быть объединены в новый класс *Tantulocarida* (Boxshall, Loncoln, 1983). Исследования этих ракообразных показали, что по сегментации тела (5–7–4) они представляют один из таксонов надкласса *Maxillopoda*.

К настоящему времени класс насчитывает около 30 видов, ассоциированных в 20 родов и 5 семейств.

Жизненный цикл *Tantulocarida* уникален отсутствием типичных линек, характерных для всех ракообразных, и состоит из чередующихся половых и партеногенетических поколений (Huys *et al.*, 1993). Микроскопические личинки тантулюсы (80–100 микрометров длиной) оседают на ракообразных-хозяев, к которым прикрепляются головным концом (рисунок 4а,в). Головной конец несет мембрановидный оральный диск, очевидно служащий как присоска. Прокалывание покровов хозяина происходит с помощью крошечного острого стилета, расположенного в голове тантулюсы. Питание паразита осуществляется через микроскопическую пунктуру (отверстие 2–4 микрометра в диаметре) в покровах хозяина. Механизм питания совершенно неясен. Неизвестно, имеется ли пищеварительная система у личинок, как они поглощают ткани или гемолимфу хозяев. Абсолютно не ясно, связан ли стилет с какими-либо железами.

Дальнейшее развитие идет двумя путями. В первом случае от задней части головного щита начинает расти особый мешок, при этом торакс и абдомен личинки сбрасываются. По мере роста мешка в нем происходит закладка яиц, из которых впоследствии выходят свободноплавающие личинки — тантулюсы. Такая жизненная стадия рассматривается как партеногенетическая самка, что не совсем верно, т.к. не происходит настоящей линьки личинки (головной конец не линяет). Таким образом, партеногенетические яйца созревают непосредственно в личинке. Поэтому этот процесс можно рассматривать как неотеническое развитие, при котором личиночная стадия способна к размножению, т.е. функционирует как взрослая.

Второй путь развития — половой, когда из тантулюсов образуются самки и самцы. Самка развивается следующим образом. Осевший тантулюс также сбрасывает торакс с абдоменом, а из задней части головы начинает расти мешковидный вырост, в котором формируется самка. Тело самки состоит из большого цефалоторакса — головогруды, двух сегментов, несущих конечно-

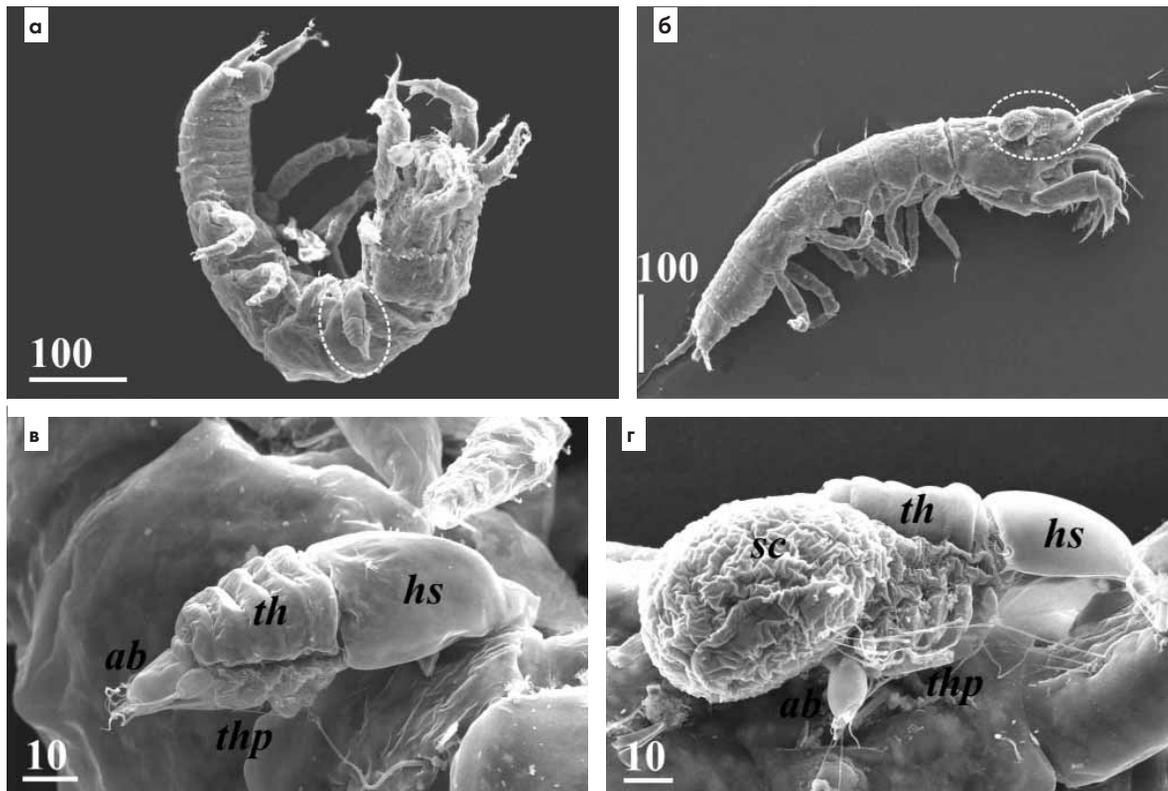


Рисунок 4. Паразитические ракообразные класса Tantulocarida (*Microdajus* sp.) на клешнеоных осликах Tanaidacea. (а, б) — тантулокариды, прикрепленные к хозяевам (выделены пунктирной линией); (в) — только что прикрепившийся тантулюс, вид сбоку, увеличено с (а); (г) — развивающийся самец, вид сбоку, увеличено с (б). Обозначения: *ab* — abdomen; *hs* — головной щит/цефалон; *sc* — мешковидный вырост; *th* — торакс/грудь; *thp* — грудные конечности. Масштаб в мкм.

сти и трех сегментов, лишенных конечностей и заканчивающихся каудальными (хвостовыми) ветвями. Тело самки соединено с тантулюсом особым тяжом — пуповиной, через который, вероятно, происходит ее питание. Внутри цефалоторакса происходит закладка яиц. Дальнейшая судьба этой стадии неизвестна. Некоторые прикрепившиеся тантулюсы не сбрасывают торакс с abdomenом, а мешок начинает закладываться между пятым и шестым или после шестого сегмента торакса (рисунок 4б,г). В этом случае в мешке формируется самец, тело которого состоит из цефалоторакса (голова и первые два сегмента торакса сливаются), пяти свободных торакальных сегментов и несегментированного abdomenа с парой каудальных ветвей. Шесть торакальных сегментов (в том числе и слившиеся с головой) несут двуветвистые плавательные конечности, седьмой торакальный сегмент несет непарный penis на вентральной стороне. Считается, что самки и самцы выходят ненадолго в окружающую среду, где, по-видимому, происходит процесс оплодотворения.

Для всех жизненных стадий тантулокарид предполагается отсутствие ротовых конечностей.

Хотя так ли это, может показать только изучение срезов на электронном микроскопе.

Недавно нами в Белом море впервые были обнаружены два новых вида тантулокарид, паразитирующие на копеподах — гарпактицидах и клешнеоных осликах — танаидах. Их исследование только начинается.

Благодарности

Я хочу выразить огромную признательность моему первому Учителю — Г.А. Соколовой, заложившей тот фундамент, который определил всю мою последующую жизнь, причем — не только научную.

Литература

- Вагин В.Л.** 1976. Мешкогрудые раки. — Казань: Изд-во Казанского Университета. 141 с.
Книпович Н.М. 1890. *Dendrogaster astericola* n. gen. n. spec. новая форма паразитических Cirripedia из группы Ascothoracida // Вестник естествознания, 1 (8): 353–359.
Книпович Н.М. 1892. Материалы к познанию группы Asco-

thoracida // Труды об-ва естествоиспытателей, 23 (4): 1–155.

Becker K.-H. 1975. *Basipodella harpacticola* n. gen., n. sp. (Crustacea, Copepoda) // Helgolander Wiss. Meeresunters, 27: 96–100.

Bonnier J. 1903. Sur deux types nouveaux d'Epicarides parasites d'un Cumace et d'un Schizopode // C. r. hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris, 136: 102–103.

Boxshall G.A., Lincoln R.J. 1983. A comparative functional analysis of the major maxillopodan groups // Crustacean phylogeny. F.R. Schram (ed.), Rotterdam: A.A. Balkema: 121–143.

Bresciani J. 1965. Nauplius «Y» Hansen: Its distribution and relationship with a new cypris larva // Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening, 128: 245–258.

Greve L. 1965. A new epicaridean from western Norway, parasite of Tanaidacea // Sarsia, 20: 15–19.

Grygier M.J. 1987. New records, external and internal anat-

omy, and systematic position of Hansen's y larvae (Crustacea: Maxillopoda: Facetotecta) // Sarsia, 72: 261–278.

Hansen H.J. 1899. Die Cladoceren und Cirripeden der Plankton Expedition // Ergebnisse der Plankton Expedition der Humboldt Stiftung, 2 (G, d): 1–58, pls. 1–4.

Hansen H.J. 1913. Crustacea Malacostraca II., IV. The order Tanaidacea // Sarsia, 20: 15–19.

Huys R., Boxshall G.A., Lincoln R.J. 1993. The tantulocarid life cycle: the circle closed? // J. of Crustacean Biology, 13: 432–442.

Ito T. 1985. Contributions to the knowledge of cypris y (Crustacea: Maxillopoda) with reference to a new genus and three new species from Japan // Special Publication of the Mukaishima Marine Biological Station, 1985: 113–122.

Kolbasov G.A., Hoeg J.T. 2003. Facetotectan larvae from the White Sea with the description of a new species (Crustacea: Thecostraca) // Sarsia, 88: 1–15.

Ритуализированные демонстрации позвоночных в процессе коммуникации: знак и стимул

В. Фридман



Владимир Фридман,
7-й выпуск биокласса
(Терапиды), школа № 57
(1984 г.), закончил биолого-
химический факультет
МПГУ, к.б.н., старший
научный сотрудник на
кафедре высших растений
Биофака МГУ, wolf17@list.ru

Почему танец — красив?

Потому что это — несвободное движение,
потому что смысл танца именно в абсолютной,
эстетической подчиненности,
идеальной несвободе...

Евгений Замятин

Одна из интереснейших этологических проблем — расшифровка «языка животных» или, корректнее, реконструкция видоспецифических сигнальных систем, обслуживающих информационный обмен в одном из контекстов общения, актуальных для данного вида. Это могут быть охрана территории, поиск партнера, ухаживания за партнером при развитии брачных связей в постоянной паре, предупреждения об опасности и пр.

В свое время «классическая этология» родилась из попытки Оскара Хейнрота, Конрада Лоренца и Джулиана Хаксли решить задачу реконструкции сигнальных систем и механизмов коммуникации животных через «морфологический подход к поведению» и созданную ими теорию инстинкта.

Все составные элементы этологической теории, существующие и сейчас, происходят, в конечном счете, от успешности интерпретации ритуализированных демонстраций позвоночных как структур, обладающих определенной формой и специализированных в выполнении сигнальной функции в той же степени, в какой обычные действия животного направлены на эффективное обеспечение пищей, безопас-

ностью и другими ресурсами. Это же относится к другим экспрессивным формам поведения, ведь потенциальной сигнальностью могут обладать самые разные действия, вплоть до просто приближения, ухода и т.п. перемещений партнера.

Если «структурность» и «сигнальность» демонстраций может быть достоверно показана, то демонстрации могут рассматриваться как своего рода «морфоструктуры» («временные органы животного») и на этом основании могут быть отделены от изменчивых и ситуативных реакций. Особенно если функциональный анализ этих «структур действий животного», выделенных на основании типологической определенности формы¹ покажет, что специализированные сигналы, в отличие от несигнальных действий, эффективно координируют поведение партнеров, совместно реализующих какой-то общий инстинкт в определенном типе взаимодействий внутри популяции (Lorenz, 1989; Tinbergen, 1951). Эта «программа Лоренца-Тинбергена» была суммирована и детализирована в целом ряде работ их последователей (Moynihan, 1955, 1970).

Казалось бы, путь открыт. Действительно, он привел к экспоненциальному росту знаний этологов о сигналах и сигнальных системах животных, о конкретных механизмах коммуникации, управляющих течение территориальных конфликтов, взаимодействий ухаживания, предупреждения об опасности и пр. у конкретных видов (обзоры см. Evans, Marler, 1995; Hurd, Enquist, 2001; Wachtmeister, 2001).

Однако, современная этология (сейчас куда более близкая к зоопсихологии, чем к сравнительной этологии Лоренца-Тинбергена) всего более буксует именно в расшифровке «языка» животных (скептические оценки часто с противоположных теоретических позиций см. Purton, 1978; Hurd, Enquist, 2001; Панов, 2005). К сожалению, этологи в теоретическом анализе сигналов и систем коммуникации животных сами

¹ а, значит, устойчивости и однозначности сигнала, подаваемого ими партнеру

загнали себя в то концептуальное противоречие, из которого следует современный кризис попыток расшифровки языка животных.

С одной стороны, они по-прежнему следуют идее Дж. Хаксли, согласно которой ритуализированные демонстрации представляют собой *сигналы, символизирующие определенную форму поведения* (должную воспоследовать за предъявлением демонстрации; Huxley, 1923). Это означает «презумпцию сигнальности» демонстраций: всякое экспрессивное действие и выразительное движение животного (т.е. «демонстрации» в самом обычном смысле слова) этологи рассматривали как потенциальный сигнал. Далее следует вполне естественное предположение, что «сигнальность» демонстраций прямо пропорциональна стереотипности, фиксированности и демонстративности тех комплексов действий, которые образуют «материальную основу» соответствующих сигналов (Moynihan, 1970; Serpell, 1989).

А иначе зачем индивиду так коверкать и вычурно исполнять движения намерения и прямые действия гнездостроения, агрессии, кормления, бегства и прочих активностей (именно из них образуются демонстрации в процессе ритуализации: Tinbergen, 1962), как не для того, чтобы подать партнеру соответствующий сигнал? Когда требуется не сигнал, а действие — нападение или бегство, спаривание или оборона, то соответствующие действия оказываются много эффективней соответствующих демонстраций, последние в силу своей «вычурности» и «неестественности» могут только «сигнализировать» о готовности к разворачиванию определенного поведения, тем самым побуждая партнера сделать свой собственный «ход» (выбрав определенную ответную демонстрацию, сигнализирующую о возможностях координации поведения и распределения ролей в данном виде активности), но не «понудить» партнера к чему-либо напрямую.

Однако, признав сигналы животных символами и знаками, хотя бы в эволюционной потенции, этологи сами напрочь закрыли себе возможность сопоставления и поиска системных изоморфизмов между «языком животных» и знаковыми системами, используемыми в межчеловеческой коммуникации. Для сравнения с сигнальными системами животных с целью расшифровки «языка» наиболее плодотворными должны быть сравнение не столько с собственно человеческой речью, сколько с такими формами сигналов, передающих «позиционную информацию» среди участников объединенных некой структурой отношений, как танец и деньги. Хорошим примером того, чем

может быть искомый «язык», являются уже в значительной степени расшифрованные специализированные знаковые системы, обслуживающих дистанционное наведение сборщиц у пчел («язык танцев»), или предупреждение об определенных категориях опасных объектов у разных видов обезьян, наземных беличьих, птиц и некоторых других видов (так называемые категориальные сигналы — *referential signals*: Cheney, Seyfarth, 1990; Evans, 1997), или система информационного обмена, обслуживающая агонистические взаимодействия у птиц (информирование о «предусмотренных системной» возможностях разрешения данного конфликта между данными особями и одновременно о конкретных сигналах, возможных и эффективных против данного оппонента; Senar, 1990; Фридман, 1993, 1998).

Соответствующие исследования могут быть «образцом» в смысле Т.Куна для дальнейших исследований «языка» и механизмов коммуникации животных. Важно только, чтобы они воспринимались не как исключительные частные случаи, но как сигнал о необходимости выводов концептуального характера, существенного реформирования этологической теории в направлении признания и обоснования «знаковости» демонстраций. Статья посвящается обоснованию теоретических перспектив интерпретации сигналов животных как специализированных знаковых систем, обслуживающих определенного рода информационный обмен в стохастических системах вроде социума и популяции, и в первую очередь возможности выхода из концептуального кризиса сравнительной этологии, продолжающегося в нашей науке с конца 1970-х гг. (Панов, 2005).

В первую очередь, необходимо изменение структуры теории так, чтобы она предполагала *возможность* формирования на основе демонстраций специализированных знаковых систем («языка»), обслуживающих определенный тип информационного обмена внутри популяции, как одного из (и самого перспективного) направлений эволюционного развития демонстраций и других экспрессивных элементов поведения животного. Тем более, что в исследованиях социобиологической школы давно показана *необходимость* появления таких специализированных знаковых систем, своего рода «денег», обмен которыми определяет «цену» и «стоимость» конкурентных усилий особи во взаимодействиях определенного типа.

Тем самым, устойчивый и направленный обмен сигналами между особями в популяции в каждом классе взаимодействий, существенных для социальной системы вида, позволяет:

а) в каждом отдельном взаимодействии эффективно разделить наиболее и наименее успешных особей;

б) провести дифференциацию поведенческих ролей между первыми и вторыми таким образом, чтобы обеспечить максимум устойчивости воспроизводства видоспецифической социальной организации на данной территории в условиях постоянных изменений среды.

В числе этих взаимодействий могут быть охрана территории, поиск партнера, ухаживание за партнером при образовании пары, предупреждение об опасности и прочее. Очевидно, тот же самый коммуникативный механизм (неизбежно апеллирующий к «сигнальности» и к «знаковости» демонстраций) позволяет не только установить некую оптимальную дифференциацию ролей индивидов по успешности во взаимодействии определенного класса, но и гибко модифицировать ее в ответ на «возмущения» экологической и социальной среды на территории группировки. Тем самым достигается максимальная устойчивость воспроизводства социальной организации вида на данном участке пространства, освоенного его населением (Плюснин, 1990; Щипанов, 2003; Попов, Чабовский, 2005).

Совершенно гомологичную роль выполняют деньги (аналог демонстраций) и акты купли-продажи определенного рода товаров в рыночной экономике (аналог взаимодействий определенного класса). При дифференциации ролей покупателей и продавцов на общем рынке современного «общества индивидов» деньги играют роль сигналов, акты купли-продажи — обмена информацией о социальных возможностях покупателя и продавца (Элиас, 2001). На основании этой системной гомологии (далее мы увидим ее исключительную продуктивность) коммуникативные сигналы особей должны интерпретироваться как знаки специализированной знаковой системы «языка», если только для соответствующего класса взаимодействий в популяционных группировках определенного вида необходим и возможен направленный информационный обмен.

Существование систем информационного обмена между особями в популяции по некой общей «коммуникативной сети» (*communicative network*) давно и убедительно показано этологами. Соответствующая «сеть» обнаружена не только в популяционных группировках птиц и млекопитающих, но и, например, у бойцовых рыб *Betta splendens* и меченосцев из рода *Xiphodorus* (Oliveira et al., 1998; McGregor et al., 1999; Earley, Dugatkin, 2002). Далее обосновывается возможность и необходимость существо-

вания специализированных знаковых систем, элементы которых — отдельные знаки — могут быть отождествлены с отдельными демонстрациями территориального, брачного репертуара, так что соответствующие структуры действий животного оказываются материальным носителем определенных «порций» информации, передаваемых на определенном «коде» специфических взаимодействий между определенным рода социальными компаньонами.

По красивому афоризму Маркса, «анатомия человека — ключ к анатомии обезьяны». Понятно, каким образом анализ наиболее развитых знаковых систем человека позволит этологам определить те «семена языка», которые могут быть найдены в коммуникативных системах других позвоночных, и исследовать факторы биологической эволюции, направлявшие развитие «в сторону» человеческого общества и человеческого языка. Последние чрезвычайно интересуют как этологов (обзор см. Evans, Marler, 1995), так и гуманитариев (Барулин, 2002). Для неосведомленного наблюдателя наличие таких «семян» неочевидно по тем самым причинам, по которым расшифровка незнакомого языка в отсутствие известных родственных обязательно требует билингв (Барулин, 2002).

Проследивание изоморфизмов между сигнальными системами животных и ролью денег в рыночной экономике, форм и фигур коллективного танца в разнообразных социальных ритуалах позволяет обнаружить «*билингвы*», эффективно ведущие этологов к расшифровке «языка» определенного вида. Особенно в ритуалах, имеющих конкурентный смысл и принимающих форму агона — состязания по определенным правилам между индивидами или разными группами индивидов (Стратерн, 1995). Общая методологию отыскания и использования подобных изоморфизмов в сравнительно-этологическом анализе может быть создана «по образу и подобию» того, как такая же задача решена К.Леви-Стросом (2001) в структурной антропологии.

Как писал де Соссюр, «лингвистические факторы, кажущиеся на первый взгляд весьма существенными (например, функционирование органов речи), следует рассматривать лишь во вторую очередь... они служат лишь для выделения языка из других семиологических систем». Поэтому расшифровка «языка животных» и решение проблемы происхождения человеческого языка требует анализа того общего, что есть в человеческой речи и в других системах того же порядка (а это не только «языки животных», но также система родства — обмен женщинами между родами или экономика — обмен товарами

и подарками между индивидами). И наоборот — расшифровка «языка животных» требует рассматривать его как семиологическую систему, то есть *на общих основаниях* с человеческим языком.

Если удастся определить, какие именно элементы демонстративного поведения животных (демонстрации, ритуалы или что-то иное) могут рассматриваться как знак и как символ с точки зрения информационного обмена и/или процесса дифференциации ролей в социальной структуре группировки, то их можно рассматривать как искомые «семена языка» (Севастьянов, 1989) и считать биологической основой для развития всей знаково-символической деятельности человека (Queiroz, Ribeiro, 2002).

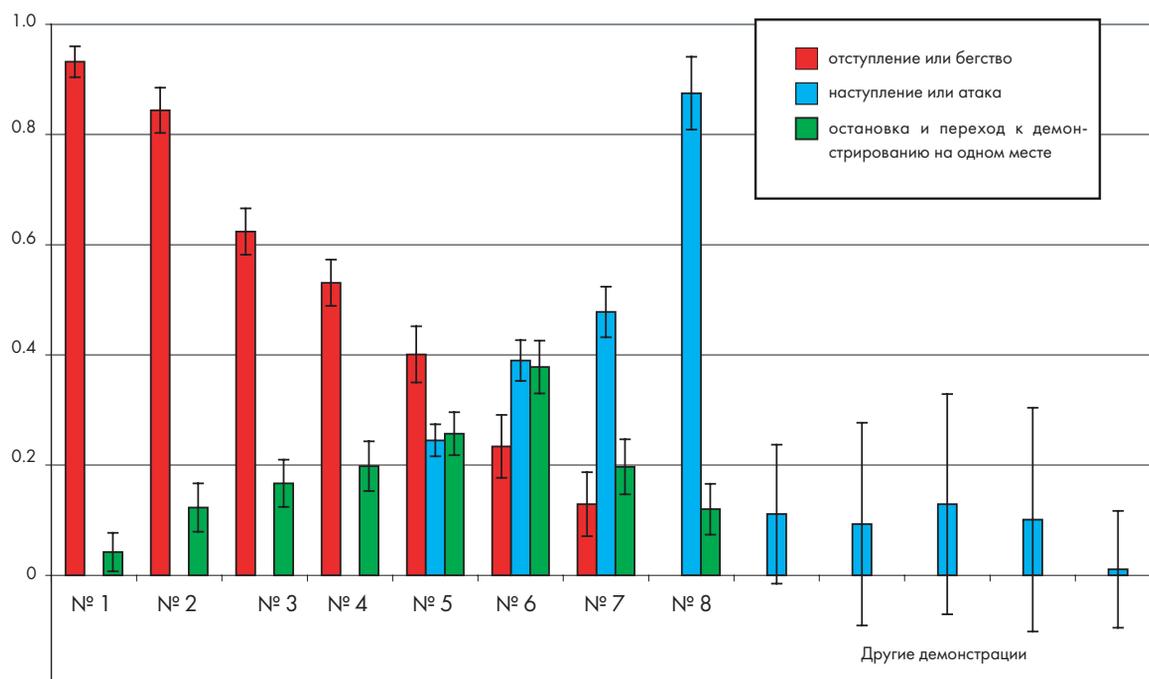
Эта дифференциация ролей не может быть ни эффективной, ни точной без направленного и устойчивого обмена «позиционной информацией» между особями, происходящего по общим для системы «правилам игры». Отсюда очевидна исключительная роль обмена специфическими демонстрациями по «правилам», установленным системой. Это могут быть тетеревиный ток,

системы агрессивного доминирования у «социальных видов» грызунов, территориальная агрессия у лебедей-шипунцов *Cygnus olor* и многих других видов птиц (Lind, 1984; Попов, 1986; Serpell, 1989; обзоры см. Hurd, Enquist, 2001 и Громов, 2005).

Успешность конкурентных взаимодействий этого рода слабо связана с силой и интенсивностью стимуляции, которой подвергают друг друга территориальные противники или брачные партнеры. Однако, она критически зависит от ритуализованности поведения обеих особей, степени выделенности демонстраций как дискретных структур, дискретность которых позволяет обоим особям отделить сигналы от стимулов и, главное, зависит от соблюдения некоего общего режима употребления, при котором демонстрация интерпретируется как сигнал, а не только как стимул (Lind, 1984; Senar, 1985; Лысенко, 1985, 1987; Попов, 1986).

Человек не случайно определен Э.Кассирером как «символическое животное». Понять филогенетическое происхождение символов и

Вероятность ответа, т/п независимых предъявлений сигнала в гетерогенной выборке



Территориальные демонстрации в сравнении с иными элементами поведения

Рисунок 1. Релизерный эффект территориальных демонстраций №№ 1–8 *D. major* статистическая устойчивость вероятностей адекватного ответа партнера.

№ 1 — выдвижение крайних рулевых перьев в стороны до упора; № 2 — выдвижение крайних рулевых + выпады вперед-назад корпусом, вытянутым вдоль субстрата; № 3 — выдвижение крайних рулевых + сильное прогибание шеи; № 4 — выдвижение крайних рулевых + вытягивание клюва вверх по углом 30° + умеренное прогибание шеи; № 5 — выдвижение крайних рулевых + выпады клювом в сторону оппонента + замещающие прыжки в сторону оппонента; № 6 — выдвижение крайних рулевых + замещающие прыжки в сторону оппонента, корпус вытянут параллельно субстрату; № 7 — корпус вытянут вверх и вперед, шея и клюв подняты вверх и вперед по углом 45° + выдвижение крайних рулевых; № 8 — выдвижение крайних рулевых + распластывание по субстрату. Позы № 1–4 — позы ритуализированной угрозы, 7–8 — ритуализированного подчинения, 5–6 — амбивалентные позы.

знаков, которыми оперируют человеческие индивиды, можно только через реконструкцию знаковых систем, обслуживающих обмен «позиционной информацией» на уровне социальной организации вида или популяции как целого (Плюснин, 1990; Щипанов, 2003).

Как писал Л.С. Выготский, всякая отличительная черта или свойство человеческой личности исходно (в исторически предшествующий период) была определенным отношением между людьми внутри соответствующего социума. Также знаки и системы коммуникации, прежде чем стать достоянием каждого человеческого индивида в отдельности, были «общим достоянием» его позвоночных предков — знаковой системой, обслуживающей социум и популяцию как целое.

Но почему именно такие системы коммуникации, как танец и деньги, а не собственно человеческая речь, будут лучшей «руководящей идеей» в поиске специализированных знаковых систем у животных? Ведь слова или иероглифы куда больше напоминают индивидуальный сигнал, чем банкнот, безлично выражающий определенные отношения покупателей и продавцов в экономической системе, причем лишь в соотношении с обращением всех остальных банкнот (а слово можно понять и без знания всех связанных с ним слов).

Именно потому, что в отличие от речи, деньгами или фигурами танца индивиды обращаются друг к другу не как личности, обладающие некой целостностью и завершенностью внутреннего мира, а как исполнители роли, и не более того (Леви-Строс, 2001; Элиас, 2001). Этот способ рассмотрения взаимодействия индивидов в анализе сигналов и коммуникации позвоночных намного продуктивней, чем традиционные подходы этологов.

С обычной этологической точки зрения, индивид в социальной коммуникации самостоятелен почти в той же степени, как личность в человеческом общении. Он также выбирает свои собственные сигналы на основании своих собственных мотивов и собственной стратегии поведения, а не подчиняется ретрансляции общих сигналов системы просто потому, что занял определенную *позицию* в социальной структуре группировки (Enquist, 1985; Lorenz, 1989).

Фактически, это уподобление «эгоистических индивидов» в социальной коммуникации животных личностям в межчеловеческом общении есть последние не вытравленные следы психологизма и антропоморфизма в сравнительной этологии. Ведь одновременно с вышесказанным этологи предполагают, что обмен

ритуализированными демонстрациями есть служебное средство для «автоматической» координации демонстраций и действий партнеров при совместном осуществлении ими определенного инстинкта. Классический пример — брачное поведение обыкновенных тритонов, «дуэли кивания» у тетеревов на току (Лысенко, 1987), «вращения» в территориальной агрессии лебедей-шипунцов (Lind, 1984) и проч.

Но тогда поведение каждого из животных-участников разумней рассматривать как элемент общей «автоматической» трансляции сигналов системы, а не выбор каждым из них собственных сигналов в своих собственных интересах. К тому же у подавляющего большинства позвоночных реакция компаньонов на соответствующий сигнал (вплоть до «криков бедствия» низших обезьян) оказывается «непроизвольной», «автоматической», а демонстрации — «значащие структуры» сигналов — врожденными.

Процесс коммуникации практически у всех позвоночных носит «автоматический» («инстинктивный») характер: при реагировании на сигнал животное не «вносит поправку» на обстоятельства, в которых воспринимается данный сигнал. «Поправка не вносится» даже в тех критических случаях, когда соответствующей активности особи грозит полный неуспех, и даже если индивидуальный опыт животного достаточно богат и способность к рассудочной деятельности довольно велика, чтобы эту поправку успешно «внести» (Cheney, Seyfarth, 1990; Evans, Marler, 1995). Свобода выбора ответов на поступивший сигнал (обычно взятых из того же общего репертуара) и неопределенность/неустойчивость ответа на сигнал при недостаточной мотивированности особи-реципиента или недостаточной стереотипности демонстрация донора — из другой области.

Именно потому, что деньги или танец дают пример использования знаков и символических форм в безличных, «сетевых» системах коммуникации, передают информацию, адресованную всем сразу и никому конкретно (фактически первому, кто ею воспользуется эффективнее всех остальных), такие аналогии могут быть исключительно продуктивны в реконструкции специализированных знаковых систем и в расшифровке «значений» сигналов соответствующего «языка» в социальном общении животных. Конечно, если эти знаковые системы действительно существуют, а «значащие структуры» — демонстрации — передают содержательную информацию, а не воздействуют определенным образом, понуждая партнера к «правильному» поведению, необходимому при координированном осуществлении общевидового инстинкта.

Прямые и косвенные доводы в пользу существования таких систем и такого обмена информацией я анализирую ниже; но, в самом плохом случае отсутствия специализированного «языка» в социальных взаимодействиях позвоночных животных, такая программа исследований позволит это, наконец, строго доказать.

Еще одно противоречие этологических концепций коммуникации состоит в том, что, следуя методологии анализа демонстраций как потенциальных сигналов (символизирующих определенную форму поведения), мы систематически отрицаем саму возможность существования знаков и знаковых систем в социальных взаимодействиях, заведомо исходя из утверждения, что по способу действия коммуникативный сигнал, в отличие от знаков человеческой речи, — просто стимул, который информативен как сигнал, только если он действует в определенной ситуации и лишь пока он в этой ситуации оказывает специфическое воздействие на партнера. Но он полностью теряет эффективность (согласно представлениям этологов) за пределами «здесь и теперь» своего воздействия на партнера, в противоположность знакам человеческой речи (Lorenz, 1989).

При таком механизме сигналов практически исключаются информационный обмен и свобода выбора действий на основании сигнальной информации, а восприятие демонстрации как сигнала возможно только «здесь и сейчас», при определенном эффективном сочетании специфической стимуляции извне и специфической мотивации внутри особи (Moynihan, 1970; Hurd, Enquist, 2001).

Критики классической этологии показали неустойчивость функционирования такой системы обмена специфическими воздействиями. Если по характеру действия сигнал представляет собой не знак, но ключевой раздражитель, то система общения чрезвычайно уязвима к накоплению «ошибок» (Панов, 1978; Paton, 1986). В присутствии же «ошибок» и «сбоев» коммуникации соответствующий процесс не может сохранить ни устойчивость, ни направленность развертывания к биологически осмысленному результату, специфичному для данного взаимодействия и выводимому из него как следствие из причины.

В числе самых важных «ошибок», долженствующих вызвать «сбой» процесса коммуникации, одни критики «классической этологии» называли неизбежность распространения «обмана» в условиях, когда демонстрации являются специализированными сигналами намерений и последующих действий животного. Другие указывали на неспособность самой демонстрации

иметь специфическое действие и быть специализированным сигналом в условиях, когда сплошь и рядом отсутствует специфическая связь между входом и выходом, сигнал не соответствует ответу и наоборот (Purton, 1978; Hurd, Enquist, 2001). Взаимное соответствие демонстрации, мотивации и эффекта, если и обнаруживается для некоего сигнала или группы сигналов, оказывается неустойчивым, неспецифическим и неопределенным (Панов, 1978; Nelson, 1984; Панов и др., 1991). Но его устойчивость и определенность совершенно необходимы для «сигнальности» этих структур, если только по способу действия этот сигнал оказывается стимулом, а не знаком.

Биологический смысл социальной коммуникации как раз и заключается в закономерном достижении результатов в сообществах животных через столкновения «эгоистических индивидов» друг с другом в конкуренции за некий социальный ресурс (территория, брачный партнер и т.п.). Система таких столкновений в сообществах с определенной организацией под действием отбора, очевидно, развивается в сторону *эволюционной оптимальности*, позволяющей достигать не меньшего результата взаимодействий за некий оптимальный период времени (Maynard Smith, 1988).

Вступление в направленный обмен демонстрациями с социальным партнером всегда означает увеличение риска для особи, — и риска гибели, и риска проигрыша, «сбоя» в реализации избранной стратегии (Senar, 1990; Фридман, 1993, 1995). Риск увеличивается по сравнению с альтернативным выбором эскапизма — отказаться от взаимодействия здесь и переместиться в другое место. Биологически осмысленный результат взаимодействия и связанная с ним дифференциация поведенческих ролей партнеров² как раз и представляют тот «общий выигрыш», ради которого следует рисковать.

В отличие от стимула знак произволен, его способность передавать определенные порции информации партнерам не зависит от мотивационного состояния демонстратора и эффекта воздействия, произведенного демонстрацией на особь-реципиента. Достаточно реализовать нуж-

² Это могут быть победитель и побежденный в территориальном конфликте, подчиненный и доминант, активный и пассивный партнер в процессе ухаживания, и пр. Разнообразие контекстов общения и форм социальной асимметрии, возникающих под действием эффективного общения в соответствующем контексте, у разных групп позвоночных достаточно велико, но всегда счетно и ограничено сверху.

ный инвариант формы сигнала «в нужное время и в нужном месте» взаимодействия, и кто-то воспользуется информацией и, восприняв ее, собственным ответом продолжит процесс обмена информацией по «коммуникативной сети» группировки. Воспользоваться информацией может даже «зритель», а не активный участник взаимодействия (например, вселенец, наблюдающий конфликты между владельцами территорий и затем выстраивающий собственную стратегию территориальных притязаний на участок слабейшего: Фридман, 1993; McGregor *et al.*, 1999).

Специфический сигнальный эффект демонстраций надежно документирован для самых разных видов позвоночных (см. Hurd, Enquist, 2001; Wachtmeister, 2001). Наконец, онтогенез соответствующих демонстраций вполне позволяет рассматривать эти структуры как специализированные более к выполнению сигнальной функции, чем к функции стимуляции (Groothuis, 1989). В онтогенезе происходит *эмансипация сигнала* (Morris, 1956) — превращение стереотипа в социальный ритуал, а ритуализированных демонстраций — в знаки возможностей поведения индивида в сообществе. Фиксированный комплекс действий, став социальным ритуалом, выходит из-под контроля внутренних мотивационных переменных и переходит под контроль механизмов социальной коммуникации. В результате существенно растет устойчивость «значащих структур» в потоке поведения и стереотипность исполнения демонстраций (Groothuis, 1989).

Социобиологам принадлежит критика сигнальности демонстраций, основанная на аргументах о распространенности «обмана» в социальных взаимодействиях позвоночных, если демонстрации — сигналы, «честно» передающие некоторую информацию о животном, значимую для успеха в конкурентных взаимодействиях. Это может быть информация о состоянии, социальном статусе, физической силе, способности бороться, удерживать ресурсы... вплоть до иммунного статуса и зараженности паразитами. Употребление определенных сигналов в определенных ситуациях может коррелировать со всеми этими параметрами и, следовательно, информировать о них других членов сообщества хотя бы в потенции (Dawkins, Krebs, 1978; Докинз, 1993; Hurd, Enquist, 2001).

Тем самым этологи социобиологического направления отрицают самую сигнальность демонстраций, полагая их специфическим действием, орудием манипуляции поведением партнера. Более ловкий и сильный участник взаимодействия действует сильнее и лучше

пользуется этим «орудием», что позволяет выявить различия в качестве особей через ритуализованный обмен «ударами», но не прямым столкновением. Критики второй группы считают демонстрации неспецифическими сигналами. По их мнению, демонстрации «сами по себе» семантически пусты. Они выражают только уровень общего возбуждения животного и через процесс взаимной социальной стимуляции неспецифически повышают готовность к продолжению взаимодействия до тех пор, пока оно не завершится нужным результатом, несмотря на все ошибки и «сбои» (Панов, 1978).

Оба варианта критики «классических» концепций коммуникации оказались неотразимы, поскольку бьют в действительные «бреши» теории. Каждое из цитированных «возражений» можно иллюстрировать фактами «обмана» или же неспецифичности и «семантической пустоты» демонстраций (Nelson, 1984; Paton, 1986; Панов и др., 1991). Сейчас теории коммуникации множатся гораздо быстрее, чем усилиями натуралистов прибавляются факты, позволяющие сделать выбор в пользу одной из них.

В исследованиях взаимодействий различных видов позвоночных накоплено более чем достаточно независимых подтверждений тезиса классических этологов о «сигнальности» демонстраций. В сообществах с самой различной организацией неизменно оказывается, что стержневым событием процессов общения является именно обмен информацией, а не воздействиями (данные по предупреждению об опасности см. Seyfarth, Cheney, 1990; Evans, 1997; Zuberbehler, 2000; агонистическому поведению — Senar, 1990; Фридман, 1993, 1998; брачным ритуалам — Moynihan, 1955; Гомелюк, 1979). Ритуализированные демонстрации оказываются теми специфическими структурами, ведущая функция которых в процессе коммуникации — перенос четко отграниченных порций информации от одного организма к другому, иными словами демонстрации играют роль специализированных посредников при информационном обмене в сообществе животных. Благодаря их инвариантности особи могут отличать существенные ситуации общения, вопреки разнообразным факторам неустойчивости и дестабилизации, таким как нестабильность внутреннего состояния особей-демонстраторов и сильная изменчивость обстоятельств контекста, которое сопровождает отдельные акты коммуникации.

В таком случае отдельные демонстрации должны рассматриваться как знаки специализированной знаковой системы («языка»); сравни с определением языка де Соссюра (2004): «язык —

система дифференцированных знаков, соответствующих дифференцированным понятиям». Чтобы язык мог функционировать, необходима устойчивость и однозначность соответствий знаков, понятий и реакций на новую ситуацию для всех потенциальных говорящих (Севастьянов, 1989).

Функция специфической стимуляции партнера здесь оказывается подчиненной и побочной. Она превращается в специфическое «давление» на партнера, которое обеспечивает устойчивость и помехозащищенность процессов информационного обмена.

Суммируя наблюдения, доказательства передачи специфических порций информации при помощи специализированных структур-посредников-демонстраций можно свести к следующему:

Во-первых, показана устойчивость и направленность развертывания поведенческого процесса от «точки инициации» взаимодействия в виде некоторой проблемной ситуации, до «точки терминации» процесса. Ею можно считать достижение биологически осмысленного результата — изгнание захватчика, копуляцию, успешное бегство в укрытие и проч., либо срыв взаимодействия. Более того, устойчивость и направленность развертывания процесса обмена демонстрациями и действиями между особями в случае коммуникации фиксируется как на протяжении всего взаимодействия, так и в каждой из его частей (Фридман, 1995, 1998).

Во-вторых, на протяжении взаимодействий обнаружена сопряженность (во времени) и согласованность (по характеру) демонстраций и действий, выраженность которых по ходу взаимодействия устойчиво растет. Рост сопряженности и согласованности процесса происходит вопреки тому, что на протяжении всего процесса участники конкурируют друг с другом. Каждая демонстрация и действие животного по сути представляют собой акт сопротивления реализации поведения партнера, способный тормозить и подавлять последнее (анализ см. Фридман, 1993). Тем не менее на всем протяжении взаимодействия идет устойчивый рост сопряженности и согласованности соответственных демонстраций партнеров, что отражает взаимный рост предсказуемости поведения с каждым актом приема-передачи сигналов.

Устойчивый рост сопряженности и согласованности действий участников наиболее резко выражен при представлении поведения каждой особи в виде дискретной последовательности из сигналов и поз. Именно потому, что обе особи конкурируют за победу в соответствующем «конфликте интересов», они обе нуждаются в инфор-

мации, оптимизирующей выбор программы поведения в проблемной ситуации, общей для них обоих. Появляется *новая организация процесса*, «наводимая» через информационный обмен, посредником в котором служат сигналы определенного ряда.

В-третьих, это способность ритуализованных демонстраций, составляющих ряд территориальных или брачных сигналов³, быть предикторами потенциальных возможностей развития процесса, которые равно существенны для участников коммуникации. Это моменты и направления будущей смены сигналов партнера, и вероятный исход взаимодействия в целом. Специальные исследования показывают, что демонстрации ухаживания, угрозы, предупреждения об опасности птиц, рыб, пресмыкающихся и млекопитающих, могут эффективно предсказывать события, не только непосредственно следующие за демонстрацией, но и отдаленных во времени, — следующих после смены сигнала противником или даже завершения взаимодействия определенным исходом.

Действия на основании сигнальной информации всегда оказываются отделенными от акта предъявления демонстрации-предиктора временным интервалом неопределенной длины независимо от того, сколько времени потребуется, чтобы поведенческий процесс «дошел» от точки А (предъявление демонстрации) до точки Б («прогнозируемое событие»). В этом случае сигналы переносят *информацию идеального характера* — о возможностях развития взаимодействия в определенном направлении в зависимости от выбора конкретных ответов на сигналы партнера. Это, собственно, и требовалось доказать.

В-четвертых, практически во всех видах сигнальных систем, исследованных в отношении «честности коммуникации», обнаружено автоматически «честное» реагирование особей на соответствующий сигнал. Безусловно, в этом «автоматизме» присутствуют «сбои», более чем частые у молодых особей. Но во всех случаях отсутствие ответа, неточный или неадекватный ответ на сигналы партнера — это «ошибка», следствие «сбоя» в системе коммуникации, а не намеренный «обман» (см. неточные ответы на сигналы бедствия у верветок (Chiney, Seyfarth, 1990), или замедленные — у синиц-пухляков *Parus montanus* (Rajala et al., 2003), или же прямое

³ Но не экспрессивных действий и не элементов повседневной активности. Здесь проходит грань, отделяющая экспрессивные реакции от демонстраций с сигнальной функцией, даже если у тех и других мотивационная подоснова одна.

Вероятности исходов немедленных (нападение — бегство) и отложенных (победа-поражение) реакций на употребление сигнала

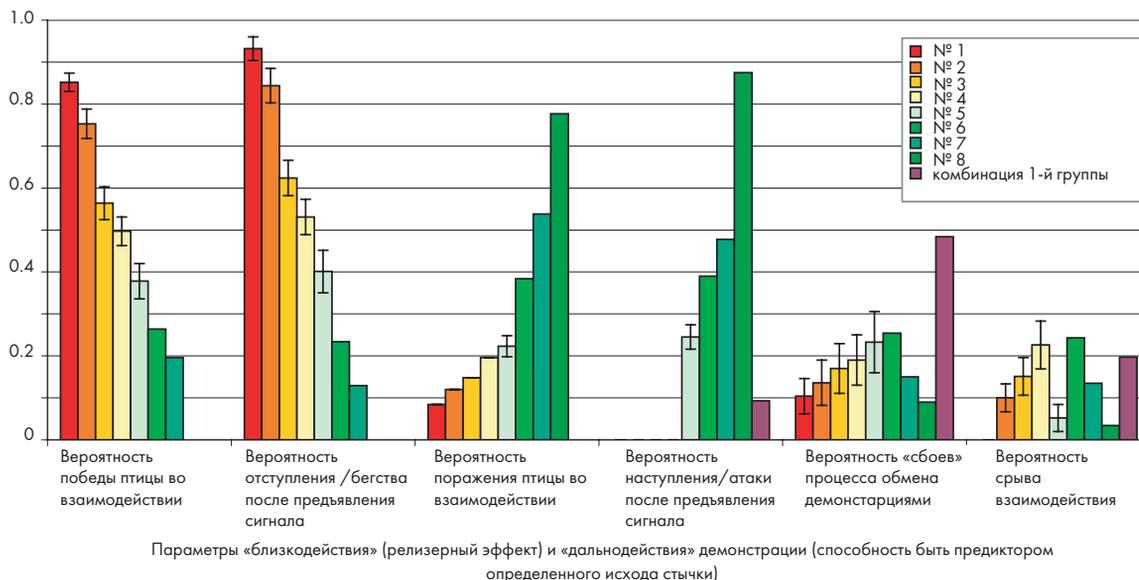


Рисунок 2. Корреляция «близкодействия» и «дальнодействия» демонстраций № 1–8 D. majор как основа выполнения этими структурами сигнальной функции.
 Типы демонстраций № 1–8 — см. рисунок 1.

преследование самки вместо ритуализованной демонстрации дупла у мухоловки-пеструшки *Ficedula hypoleuca* (Благосклонов, 1988).

Все четыре перечисленные характеристики можно рассматривать как симптомы присутствия коммуникации в исследуемых взаимодействиях, на которые может ориентироваться этолог, решая вопрос, присутствует ли в анализируемых процессах информационный обмен или особи ограничиваются воздействием друг на друга. Благодаря им, мы можем определить коммуникацию животных также как ее определяет лингвистика и семиотика для человеческих знаковых систем (Барулин, 2002). В отличие от «просто взаимодействий» (социальных контактов), коммуникация предполагает взаимодействие между индивидами на семантическом уровне, стержнем которого является процесс приема-передачи информации с использованием специализированной знаковой системы-посредника, благодаря которому происходит взаимное согласование и координация действий партнеров, несмотря на исходно «противоположные интересы».

Важно подчеркнуть, что источником всех социальных контактов животных является именно «конфликт интересов» между компаньонами, даже во взаимодействиях вроде образования пары или системы предупреждения об опасности внутри сообщества, которые на первый взгляд кажутся формой взаимопомощи или продуктом группового отбора (Докинз, 1993).

Исследования социобиологической школы показали, что даже при образовании пары особи ведут себя не как стремящиеся друг к другу «половинки» — несовершенные части некоего целого (наподобие платоновского андрогина), которые превращаются в гармоничное целое в процессе образования пары. Нет, и самцы, и самки ведут себя как «эгоистичные индивиды», стремящиеся максимизировать собственный выигрыш независимо от действий партнеров, партнерские и родительские качества которых при этом используются как ресурс, и безотносительно к устойчивости образовавшейся пары и максимизации ее репродуктивного выхода. Самцы моногамных видов после образования пары склонны к политерриториальности, т.е. занятию второй территории и привлечению туда новых самок. Этим занимаются доминирующие самцы, подчиненные же совершают рейды по обширным территориям высокоранговых самцов и могут спариваться с самками, пока владельцы территории заняты привлечением новых.

Не отстают от самцов и самки. До образования пары самки свободно перемещаются между участками разных самцов, принимая их ухаживания и отвечая на них (ухаживание иногда доходит до попыток копуляции), пока не остановят выбор на каком-то одном и не ограничат собственные перемещения определенным участком внутри территории своего постоянного самца. Находясь там, большинство самок воро-

быных птиц жестко охраняет соответствующее пространство от появления на нем всех прочих самок (почему вторую территорию и партнершу самцу приходится заводить в отдалении), но во время рейдов соседних самцов по чужим участкам легко вступают во внебрачные копуляции с ними (Wiley, 2000).

Вопреки социобиологическим концепциям, выигрыш участников в этой «войне полов» (эта метафора сейчас используется уже почти как термин) отнюдь не сводится к «лучшим» генам, которые самец или самца «набирают», спариваясь с «незаконными» партнерами. Кроме «вертикального» распространения собственных генов в следующих поколениях, выигрыш в меньшей степени заключается и в «горизонтальном» распространении в сообществе собственных поведенческих тактик и стереотипов среди соседних, более молодых резидентов, занимающих подчиненное положение. В обоих случаях животное ведет себя примерно так, как покупатель, стремящийся произвести наилучшие покупки при данных условиях (исходная сумма денег и ассортимент товаров в данном конкретном магазине-сообществе). В обоих случаях не обойтись без обмена информацией о «цене» и «стоимости» каждой «покупки» и специализированных знаковых системах, обслуживающих этот обмен.

Классические же этологи воспринимают все ритуализированные демонстрации индивидов как частные проявления общевидового инстинкта (реализуемого данной особью в рамках ее специфической роли внутри общего ритуала). Существенным достижением социобиологов является развенчание этого взгляда, хотя ответы на два главных вопроса так пока и не найдены. Что же это за вопросы?

Первый: каким образом в статистическом процессе столкновений «эгоистических индивидов», каждый из которых только максимизирует собственную итоговую приспособленность, может поддерживаться и устойчиво воспроизводиться в череде поколений некая общая структура отношений, выигрышная для всех участвующих особей, но невыгодная каждой из них «здесь и сейчас» (Maynard Smith, 1988)?

Второй: если каждый индивид, выбирая действия в предстоящем конфликте, оценивает их по способности манипулировать поведением партнера (Dawkins, Krebs, 1978; Enquist, 1985; Докинз, 1993), откуда берется тот постоянный набор специализированных структур — демонстраций, которые представляют собой общий набор специфических инструментов, одинаково используемых всеми особями в конкуренции? Ведь вклад одних и тех же действий в приспособ-

ленность разных особей будет не дискретной, а непрерывно варьирующей переменной, так что не приходится ждать счетного числа демонстраций со строго определенной формой, и, тем не менее, дискретность и «оформленность» демонстраций оказывается правилом, а не исключением (Maynard Smith, 1988)?

Ответ на оба эти вопроса выходит далеко за рамки статьи. Замечу лишь, что аналогия демонстраций с деньгами и коммуникации — с конкуренцией покупателей и продавцов на общем рынке, на оба вопроса дает интересный ответ, который вполне позволяет согласовать индивидуальный характер действия отбора и «эгоистичность» оцениваемых конкурентных усилий индивидов с тем, что соответствующие продукты отбора, создаваемые и совершенствуемые им — набор демонстраций определенной формы и паттерн отношений, поддерживаемых этими взаимодействиями, — видоспецифичны и являются безусловной групповой адаптацией.

Мои собственные исследования в области социальной коммуникации связаны с попыткой разрешить возникающее противоречие между фактами, накопленными в пользу «сигнальности» и «знаковости» демонстраций, и упорным отказом в способности господствующих концепций коммуникации эту сигнальность и знаковость не только учесть, но даже и обсуждать. Точно так же «исключается из обсуждения» идея расшифровки информационного содержания сообщений, переданных соответствующими сигналами. Среди постоянных методологических дискуссий в сообществе этологов отсутствует анализ методов, позволяющих определить информационное содержание сообщений и то, какие именно структуры-посредники могут осуществлять соответствующий процесс вообще или у данного конкретного вида, как их выделить среди множества поведенческих актов животного (Hurd, Enquist, 2001; Wachtmeister, 2001).

Характерно название одной из статей — «Почему у животных нет “языка”?»⁴, при том, что ее авторы дали одно из лучших описаний подобного «языка» системы категориальных сигналов предупреждения об опасности у мартишек-верветок *Cercopithecus aephoips* (Seafarth, Chiney, 1997).

Единственная же концепция, способная хотя не полностью и неточно, но разрешить сло-

⁴ Chiney D., Seafarth R., 1997. Why animals do not have language. The Tanner lecture of Human values. Delivered at Cambridge University at 10–12 March, 1997, <http://www.psych.upenn.edu/~seafarth/Publications/>.

жившееся противоречие — релизерная концепция коммуникации классических этологов — остается в забвении, будучи разрушена критикой 1970-х и 1980-х гг. (оценка ее состояния как «медленного умирания», см. Панов, 2005). Современное состояние вопроса требует ее восстановления на «повышенном основании», по известному выражению А.А. Любищева.

Оставаясь более чем адекватной в области описания ритуализованных демонстраций как экспрессивных действий, специфических стимулов и составных частей инстинкта, она требует дополнения конгруэнтной концепцией, описывающей демонстрацию в коммуникативном процессе как знак — переносчик определенных порций информации, а набор сигналов определенного ряда — как систему знаков («язык»). Это самая интересная и трудная задача в области этологической теории, но, так или иначе, ее необходимо решать. Почему же при таких свидетельствах в пользу «знаковости» демонстраций и обмена информацией в коммуникативном процессе вопрос остается открытым?

Большинство этологов отвергает семиотический подход к анализу сигнальной функции ритуализованных демонстраций просто потому, что привыкло воспринимать их как сложные и специализированные движения, удовлетворяющие определенным побуждениям особи, а не как «текст», информирующий партнера о чем-либо. Соответственно, даже у «защитников» сигнальности демонстраций прочно укоренилось мнение, что демонстрации существенны для животных как некий специализированный поток стимуляции, разворачивающий в определенную сторону поведение партнера, а не источник информации, на основании которой особь оптимизирует принятие решений по ходу коммуникативного процесса. Сигнальное и информационное значение образов, генерируемых демонстрациями животных, второстепенно и побочно с точки зрения этих теорий.

Эта точка зрения мне представляется ошибочной. Если демонстрации несут сигнальную функцию (чему есть множество независимых подтверждений), считывание сигнальной информации и реагирование на сигнал в виде оптимизации выбора действий в проблемной ситуации должно осуществляться «автоматически» и никак не зависеть от вариабельности ассоциативных, перцептивных, когнитивных и иных собственных способностей особей.

Необходимы общие сигналы, информирующие всех заинтересованных особей о возможностях выбора оптимального поведения при каждом изменении проблемной ситуации в связи со следующим «ходом» партнера. В конце концов, и

последовательность нуклеотидов ДНК некогда воспринимали просто как длинную молекулу, прежде чем удалось показать, что это текст (и расшифровать молекулярно-генетические механизмы, делающие именно эту конкретную молекулу текстом). Подобно тому, как нуклеотидный текст определяет эгоистичные единицы репликации — гены, участвующие в построении фенотипа, определенные последовательности демонстраций весьма продуктивно рассматривать как текст, задающий некие единицы социальной сферы данного вида — мемы, которые участвуют в детерминации жизненных стратегий этого фенотипа, складываясь и комбинируя друг с другом.

Вообще-то, без интерпретации определенной части выразительных движений особей-участников общения как элементов специализированной знаковой системы, а последовательностей таких движений — как информационных «текстов», мы не в состоянии объяснить тот самый информационный обмен в популяционной системе, о котором так много и охотно пишут зоологи.

Продуктивность интерпретации определенной последовательности демонстраций как «текста», эффективно «прочитываемого» партнерами по ходу взаимодействия, подтверждается рядом наблюдений. Во-первых, ритуализованные демонстрации самых разных видов, в отличие от прямого действия и других форм «давления» на партнера, оказываются той специфической частью взаимодействия, которая обеспечивает специфический результат социального контакта в виде появления устойчивой асимметрии поведенческих ролей у тетеревов и других видов, спаривающихся на току (Лысенко, 1987), во взаимодействиях агонистического доминирования у грызунов (Попов, 1986; Громов, 2005), в специфических демонстрациях «патрулирования» территории ряда видов воробьев рода *Passer* (Иваницкий, 1997), в демонстрациях ухода за гнездом и угрозы пестрых дятлов рода *Dendrocopos* (Фридман, 1996) и проч.

Во-вторых, эффективность демонстраций, как специализированных средств достижения специфического результата социального контакта, неизменно оказывается прямо пропорциональной а) ритуализованности выразительных движений и других элементов экспрессивного поведения, образующих демонстрацию; б) выделенности и оформленности самих демонстраций как дискретных структур в потоке поведения. Существование строгих зависимостей между а) и б) показано в конкретных исследованиях, цитированных выше; обзоры литературных источников свидетельствуют, что такие зависи-

мости имеют универсальный характер, они обнаруживаются в самых разных группах позвоночных ранга рода-семейства, обладающих совершенно несходными вариантами социальной организации (см. данные по чайкам рода *Larus* у Moynihan, 1955, 1970; воробьям рода *Passer* — Иваницкий, 1997; лорикетам рода *Trichoglossus* — Serpell, 1989; по песчанкам рода *Meriones* — Попов, 1986; Громов, 2005; по пестрым дятлам рода *Dendrocopos* — Фридман, 1996).

Более подробный анализ показывает, что в процессе коммуникации демонстрации действительны лишь тогда, когда оба участника соблюдают некие общие «правила» игры, задающие организацию всех взаимодействий этого типа в определенном сообществе. Отступление от них ведет к неуспеху употребления сигналов и при сколько-нибудь устойчивом повторении — к неуспеху взаимодействия в целом. Некоторые из «правил», обладающих наибольшей всеобщностью, к настоящему времени удалось описать у самых разных видов позвоночных: все они свидетельствуют в пользу знаковости демонстраций, косвенно или напрямую (Senag, 1990; Фридман, 1995).

Во всех случаях выразительные движения, составляющие демонстрацию, берутся из репертуара повседневной активности, но непосредственно друг с другом моторно не связаны при выполнении соответствующих актов моторной активности. Поэтому неизменно жесткое, скоррелированное и устойчивое предъявление этих комплексов выразительных движений в составе ритуализированных демонстраций автоматически превращает последние в дискретные структуры, резко обособленные от окружающего их континуума повседневной активности и друг от друга. Если только в процессе общения дифференцированные структуры оказываются соответствующими дифференцированным ситуациям, они начинают функционировать как «язык» (см. определение выше). Именно это и было показано в исследованиях A.W. Stokes (1962) по агонистической коммуникации синиц рода *Parus* и J.Serpell (1989) по агонистическим демонстрациям лорикетов рода *Trichoglossus*.

Исследования A.Стоукса и других авторов ясно показывают, что коммуникативная действительность демонстраций (что ни понимай под ней — специфическое воздействие стимула или передачу неких порций информации, реагирование на которые предполагает тот же самый эффект) связана именно с распознаванием определенной формы сигнала.

Эффект всегда связан со специфическим образом соответствующей демонстрации именно как комбинации определенных выразитель-

ных движений, каждое из которых незначимо по отдельности. Собственно, именно жесткость и устойчивость корреляций задают специфичность образов демонстраций: визуальных, акустических, запаховых и иных.

Здесь уместно сравнение коммуникации с боксом и другими единоборствами, состязание в которых предполагает организованный обмен типизированными ударами (которые, с точки зрения этолога, как проявления коммуникации совершенно аналогичны ходам в шахматах, домино и т.п. играх). Всякое специфическое действие, такое, как удары (джебы, хуки и проч.) само по себе может вызвать испуг, чувство страха, желание сдаться и отступить и т.п. изменения мотивации участников, которые позволили бы победить в конфликте менее тренированного противника.

Но если оба боксера тренированы одинаково, в том числе равно способны выдерживать это воздействие, то тип удара для них оказывается сигналом определенной тактики противника, и победа обычно достанется именно тому, кто четче распознает и лучшеотреагирует на соответствующий сигнал, парировав тактику противника собственной более эффективной контртактикой.

Данные A.Стоукса по агонистическим демонстрациям синиц *Parus* spp. показывают информативность именно комбинации элементарных движений, когда они предъявляются скоррелировано во времени (Stokes, 1962). Именно и только они могут передать реципиенту информацию о намерениях демонстратора (последует ли за ней отступление, атака или — самый важный исход — следующая демонстрация, и какая именно). Каждая из составных частей этого целого — выразительные движения, составляющие демонстрацию, — по отдельности не обладает этой информированностью и может лишь неспецифически возбуждать партнера. Хотя каждое такое движение не в меньшей степени связано с соответствующей мотивацией (точней, мотивационным конфликтом), чем целая демонстрация, информировать о намерениях и действиях партнера может только эта последняя.

Точно также именно и только она может выразить определенное состояние животного, сделать его «понятным» для партнера и позволить выбрать оптимальную программу поведения в соответствующей проблемной ситуации (см. обзоры по демонстрациям угрозы у птиц — Hurd, Enquist, 2001; по демонстрациям ухаживания у птиц — Wachtmeister, 2001), по сигналам предупреждения об опасности у млекопитающих и птиц — Evans, 1997; Zuberbuhler, 2000). Следова-

тельно, у демонстраций, в отличие от выразительных движений (их составных частей), связь означающего и означаемого оказывается условно-символической связью знака и значения, тогда как у выразительных движений это природная связь вещей, имеющих бытие в этом мире. Соответственно, означаемым оказываются демонстрации — поведенческие структуры с определенной формой, означаемым — те специфические намерения и действия особи или идеальные возможности разрешения взаимодействий этого типа, свойственные соответствующей системе отношений, на которые «указывает» сигнал. Поэтому демонстрация как целое с определенной формой представляет собой знак с определенной формой, передающий информацию именно как целое, при полной неинформативности выразительных движений — его составных частей.

Из этой идеи я исхожу в своих исследованиях территориальных и брачных сигналов пестрых дятлов родов *Dendrocopos* и *Picoides*. Она основывается на исследованиях J.C. Senar (1990) агонистической коммуникации у чижей *Spinus spinus*. Им показано, что угрожающие демонстрации, которыми обмениваются птицы, — это не аукцион, на котором распределяются ресурсы, и даже не пантомима аукциониста. Каждая демонстрация представляет собой сигнал, указывающий на спектр допустимых действий противника по отношению к самому демонстратору. Он показывает, какие формы ритуализированной угрозы оппонент может реализовать при той интенсивности угрозы, которую данная особь «показала» собственной демонстрацией, и какой риск непосредственного нападения демонстратора сопряжен с реализацией каждой из них.

Выразительные движения — составные элементы демонстрации неинформативны даже в том случае, когда их внешний облик настолько явно представляет собой определенную часть общего облика демонстрации, что целое более чем надежно может быть построено по этой части просто за счет перцептивных способностей особи. Между прочим, тем самым ритуализированные демонстрации (и коммуникативные сигналы вообще) нарушают известный закон гетерогенной суммации А.Зайца (цит. по Logenz, 1989). Согласно ему, эффект воздействия сложного стимула должен быть равен алгебраической сумме эффектов элементарных стимулов — его частей и, во всяком случае, сводиться к последнему, а здесь он существенно больше и несводим. Это лишний раз подчеркивает тот факт, что специфически информирующее действие целого не может

быть суммировано из частных эффектов воздействия неспецифических стимулов — его составных частей. Следовательно, то самое целое, которое выступает как самостоятельная единица коммуникации — демонстрация, ритуал или иная структура-посредник в процессах приема-передачи информации внутри сообщества, — представляет собой не стимул, а знак. Специальная форма ритуализованных демонстраций по функции в коммуникативном процессе с «точки зрения» всех его компетентных участников — не просто облик вещи внешнего мира, как, например, движение удара, но символ «стоящей за ней» типовой программы поведения, запускаемой в этот момент взаимодействия и выводящей животное именно из этой проблемной ситуации, созданной этим противодействием партнера.

Последнее всегда представлено аналогичной стратегией поведения (взятой из того же ряда), и означено аналогичным символом — демонстрацией (см. анализ категориальных сигналов предупреждения об опасности или пищевых у Evans, 1997). Поэтому определенный ряд или система подобных сигналов неизбежно оказываются всеобщим эквивалентом всех вообще поведенческих стратегий этого вида, «имеющих хождение» и «котирующихся» на рынке разрешения проблемных ситуаций, возникающих в определенной системе отношений между компаньонами как деньги в рыночной экономике.

Литература

- Барулин А.Н.** 2002. Основания семиотики. Знаки, знаковые системы, коммуникация. (2 тома). — М.: Спорт и культура — 2000. 464 и 400 с.
- Благосклонов К.Н.** 1988. О биологическом значении брачного демонстративного поведения птиц // Журн. общей биологии, 49 (3): 409–417.
- Гомельюк В.Е.** 1979. Дивергенция полового поведения на примере двух представителей рода *Pungitius Coste* // Динамика популяций и поведение позвоночных животных Латвийской ССР. Рига: Латвийский университет им. П. Стучки: 6–25.
- Громов В.С.** 2005. Ритуализованное агонистическое поведение грызунов // Успехи совр. биологии, 125 (5): 509–519.
- Докинз Р.** 1993. Эгоистичный ген. — М.: Мир. 318 с.
- Левин-Строс К.** 2001. Структурная антропология. — М.: ЭКСМО-пресс. 522 с.
- Лысенко И.Г.** 1987. Пространственно-этологическая структура тетеревиного тока // Биологические основы охраны и воспроизводства охотничьих ресурсов. Сб. научн. тр.— М.: ЦНИЛ Главохоты, РСФСР: 14–25.
- Панов Е.Н.** 1978. Механизмы коммуникации у птиц. — М.: Наука. 303 с.

- Панов Е.Н.** 2005. Судьбы сравнительной этологии // Зоол. журн., 84 (1): 104–123.
- Панов Е.Н., Грабовский В.И., Зыкова Л.Ю.** 1991. Биология гнездования, поведение и таксономия хохотуны *Larus cachilaps*. 2. Сигнальное поведение и коммуникация в период гнездования // Зоол. журн., 70 (1): 76–89.
- Плюснин Ю.М.** 1990. Проблема биосоциальной эволюции. Теоретико-методологический анализ. — Новосибирск: Наука. 240 с.
- Попов С.В.** 1986. Социальные взаимодействия и социальная структура — возможные связи характеристик поведения и популяционных структур // Методы исследований в экологии и этологии. — Пушино: 121–140.
- Попов С.В., Чабовский А.В.** 2005. Понятие социальности в исследованиях млекопитающих // Зоол. журн., 84 (1): 4–15
- Севастьянов О.Ф.** 1989. Видоспецифичные механизмы референции // Поведение животных и человека: сходство и различия. — Пушино: НЦБИ АН СССР, 141–164.
- Стратерн Э.** 1995. Эстетическое значение демонстраций: несколько примеров из Папуа-Новой Гвинеи // Красота и мозг. Биологические основы эстетики. / И. Ренчлер, Б. Херцбергер, Д. Эпштейн (ред.). — М.: Мир, 300–319.
- Фридман В.С.** 1993. Коммуникация в агонистических взаимодействиях большого пестрого дятла // Бюлл. МОИП, Сер. биол., 98 (4): 34–45.
- Фридман В.С.** 1995. О новой модели определения победителя и исхода социальных контактов у птиц // Успехи соврем. биол., 113 (4): 476–483.
- Фридман В.С.** 1996. Разнообразие территориального и брачного поведения пестрых дятлов (Genera *Dendrocopos* Koch 1816 et *Picooides* Lacerepede 1799) фауны Северной Евразии. Автореф. дисс. кандидата биол. наук. — М., 22 с.
- Фридман В.С.** 1998. Социальная структура популяций *Dendrocopos major* в изменчивой среде: как сохранить единство при разнонаправленных адаптациях особей? // Жизнь популяций в гетерогенной среде. Мат-лы 2 Всеросс. семинара. — Йошкар-Ола, 1998. Кн. 1: 267–284.
- Щипанов Н.А.** 2003. Популяция как единица существования вида. Мелкие млекопитающие // Зоол. журн., 82 (4): 450–469.
- Элиас Н.** 2001. Общество индивидов. М.: Праксис, 396 с.
- Cheney D., Seyfarth R.** 1990. How monkeys see the world: Inside the mind of another species. Chicago, University of Chicago Press.
- Earley R., Dugatkin L.** 2002. Eavesdropping on visual cues in Green Swordtail (*Xiphophorus helleri*) fights: a case for networking // Proc. R. Soc. Lond., B., 269: 943–952.
- Enquist M.** 1985. Communication during aggressive interactions with particular reference to variation in choice of behaviour // Animal Behav., 33: 1152–1161.
- Evans Ch., Marler P.** 1995. Language and animal communication in comparative approaches to cognitive science. Cambridge, Mass.: MIT Press.
- Evans Ch.** 1997. Referential signal // Perspectives in ethology, 12: 99–143.
- Groothuis T.** 1989. On the ontogeny of display behaviour in Black-headed Gull: I. The gradual emergence of the adult forms. II. Causal links between the development of aggression, fear and display behavior: emancipation reconsidered // Behaviour, 110 (1–2): 76–124, (3–4): 161–204.
- Hurd P., Enquist M.** 2001. Threat display in birds // Can. J. Zool., 79: 931–942.
- Huxley J.** 1923. Courtship activities of the Red-throated Diver (*Columbus stellatus* Pontopp.) together with a discussion of evolution of courtship in birds // J. Linn. Soc. London., 25: 253–292.
- Lind H.** 1984. The relation display of the Mute Swan *Cygnus olor*: synchronized neighbour responses as a instrument in the territorial defense strategy // Ornis Scand., 15 (2): 98–104.
- Lorenz K.** 1989. Vergleichende Verhaltensforschung. Wien-New York: Springer Verlag, 315 S.
- Maynard Smith J.** 1988. Evolution and the Theory of Games. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Morris D.** 1956. The feather postures of birds and the problem of the origin of social signals // Behaviour, 9: 75–113.
- McGregor P., Otter K., Peak T.** 1999. Communication Networks: Receiver and Signaller Perspectives // Animal signals: signalling and signal design in animal communication. Y. Espmark, T. Amundsen, G. Rosenqvist (eds.). Tapir Academic Press, Trondheim, Norway: 405–416.
- Moynihan M.** 1955. Some aspects of reproductive behaviour in the Black-headed Gull (*Larus ridibundus*) and related species // Behaviour, Suppl. 4, 125 p.
- Moynihan M.** 1970. Control, suppression, decay, disappearance and replacement of display // J. Theor. Biol., 29 (1): 85–112.
- Nelson D.** 1984. Communication of intention in agonistic contexts by the Pigeon Guillemot *Cephus columba* // Behaviour, 88 (1–2): 145–189.
- Oliveira R., McGregor P., Latruffe C.** 1998. Know thine enemy: Fighting Fish gather information from observing conspecific interactions // Proc. R. Soc. Lond., B., 265: 1045–1049.
- Queiroz J., Ribeiro S.** 2002. The biological substrate of icons, indexes and symbols in animal communication: a neurosemiotic analysis of Vervet monkey alarm-calls // The Peirce Seminar Papers — The State of the Art. M. Shapiro. Berghahn Books: 69–78.
- Paton D.** 1986. Communication by agonistic displays: II. Perceived information and the definition of agonistic display // Behaviour, 99: 157–175.
- Purton A.** 1978. Ethological categories and some consequences of their conflation // Animal Behav., 26: 653–670.
- Rajala M., Ratti O., Suhonen J.** 2003. Age difference in response of Willow Tits (*Parus montanus*) to conspecific alarm calls // Ethology, 109 (6): 501–509.
- Senar J.** 1990. Agonistic communication in social species: What is communicated // Behaviour, 112: 270–283.
- Serpell J.** 1989. Visual displays and taxonomic affinities in the parrot genus *Trichoglossus* // Biol. J. Linn. Soc., 36: 195–211.
- Stokes A.** 1962. Agonistic behaviour among Blue Tits at a winter feeding station. The comparative ethology of Great, Blue, Marsh and Coal tits at a winter feeding station // Behaviour, 19: 118–138, 208–218.

Tinbergen N. 1951. The study of Instinct. Clarendon Press. Oxford. 320 p.

Tinbergen N. 1962. The evolution of animal communication — a critical examination of methods // Symp. Zool. Soc. Lond., 8: 1–6.

Wachtmeister C-A. 2001. Display in monogamous pairs — a review of empirical data and evolutionary explanations // Animal Behav., 61: 861–868.

Wiley R. 2000. Sexual selection and mate choice: trade-offs of males and females // Vertebrate mating systems. Proc. of the 14th Course of the Int. school in Ethology. M. Apollonio, M. Festa-Bianchet, D. Mainardi (eds.). Singapour-New Jersey-London-Hon Kong: World Scientific, 8–47.

Zuberbuhler K. 2000. Causal knowledge of predators behaviour in wild Diana monkeys. Referential labeling in Diana monkeys // Animal Behav., 59: 209–220, 917–927.

Наши гены — наши друзья или наши враги — как в этом разобраться?

И. Григорян



Ирина Григорян
Хотя и не училась в биоклассе, но традиционно принадлежит к «Терапсидам», закончила кафедру эмбриологии Биофака МГУ (1989 г.), к.б.н., работает в компании LabNext Inc. *,
poetry29@yahoo.com

В геноме живых организмов насчитывают до 40 000 различных генов, как постоянно активных, так и находящихся в те или иные периоды в малоактивном, латентном, состоянии. Для молекулярного биолога и молекулярного генетика важно как можно больше знать хотя бы о тех генах, которые находятся в активном состоянии, знать функцию белков, которые они кодируют, постоянна ли она или переменна, помогает она организму или мешает. Интересно, что может происходить и то и другое. А поскольку нежелательные для организма процессы так или иначе приводят к заболеваниям, важно и нужно знать, какие гены — всегда наши друзья, какие — наши враги, а какие могут менять свое «лицо» в зависимости от места и времени проявления.

Один и, пожалуй, самый яркий пример такого поведенческого «хамелеона» — ген p53 или, как его любят называть, — сторож нашего генома, или, еще более интригующе, — ген совести. Что же это за ген и почему он сторож и совесть клетки? Открытый в 1979 г., ген p53 в представлении ученых претерпел столько качественных

изменений касательно его функции и значения в клетке и организме, что просто сам рассказ об этих превращениях мог бы стать замечательной иллюстрацией того, как развитие науки и расширение ее технических возможностей для изучения тех или иных явлений и процессов влияет на наши знания о самих этих явлениях.

Ядерный белок p53 был открыт в составе комплекса с другим белком, большим Т-антигеном вируса SV-40, в клетках, трансформированных этим вирусом. Довольно быстро стало ясно, что p53 не только экспрессируется на высоком уровне практически во всех типах опухолей разной локализации, но и присутствует в небольших количествах в нормальных клетках. Уровень белка p53 в нормальных клетках невысок. Поскольку одним из самых ярких способов обнаружить функцию нового гена является его нокаут, т.е. получение трансгенных животных, в которых ген p53 удален по обоим аллелям, были получены мыши без p53, которые внешне ничем не отличались от тех своих собратьев, у которых p53 функционировал в норме. То есть присутствие p53, казалось бы, не является необходимым для нормального роста и развития. Вместе с тем у таких мышей наблюдалась высокая частота возникновения опухолей, что говорило о том, что нарушен какой-то основной механизм защиты организма от возникновения спонтанных злокачественных новообразований.

В 1982 г. была проклонирована кДНК и определена первичная последовательность гена p53 мыши. Клонирование p53 дало возможность более детального изучения функции как самого гена, так и его белкового продукта. Некоторые различия в опубликованных кДНК последовательностях позднее объяснились тем, что одни ученые клонировали и определяли последовательность гена дикого типа, а другие — мутантного, т.е. измененного. Вот в этом мутантном гене и оказалась «собака зарыта». Основной функцией p53 «дикого типа» является охрана клетки, ее здорового генетического материала. Если у клетки все хорошо, то содержание в ней белка гена p53 невелико (порой даже с трудом поддается обнаружению) и регулируется постоянным процессом его деградации в специаль-

* В 1989–1992 гг. работала в лаборатории молекулярной генетики НИИ канцерогенеза, где защитила диссертацию по теме «Тканевая специфичность экспрессии ретровирусов птиц», затем — в Париже, в лаборатории «Ретровирусов и ретротранспозонов» (1992–1994 гг.). В 1995–2003 гг. — на кафедре молекулярной генетики Иллинойского университета в Чикаго в лаборатории Андрея Гудкова, занималась опухолевыми супрессорами и онкогенами. В настоящее время работает в компании, специализирующейся на оборудовании для изготовления и обработки биочипов.

ных органеллах — протеосомах. Такая форма p53, когда он находится в нормальной здоровой клетке в небольших, постоянно обновляемых количествах, называется неактивной, или латентной, формой p53. Латентный p53 не способен влиять на другие гены, что в иной ситуации становится одной из самых главных функций p53.

Когда клетка или организм в целом испытывают любого вида затруднения или стресс, начиная с увеличения температуры тела во время загара и заканчивая повреждениями ДНК химическими агентами, ультрафиолетовыми или рентгеновскими лучами, во-первых происходит накопление белкового продукта гена p53 за счет остановки его деградации, а также качественные химические изменения различных участков белка в результате процессов фосфорилирования, дефосфорилирования, ацетилирования, гликозилирования и образования комплексов связывания с другими белками клетки. Эти и связанные с ними процессы приводят к тому, что повреждения в ДНК устраняются, и пролиферация мутантных клеток предотвращается.

Если же повреждения настолько серьезны, что сам по себе ген p53 и его «связи» не способны вылечить поврежденную клетку, то тот же самый p53, действуя сам и через своих сообщников — p53-зависимых генов, запускает каскад событий, который называется апоптоз — запрограммированная гибель клеток. Морфологически апоптоз наблюдается в виде сморщивания клеток, конденсации хроматина и фрагментации ядер. Последующее поглощение таких клеток фагоцитами в отличие от некроза не сопровождается воспалением. Запуск и протекание апоптоза регулируется p53 через его действие на другие клеточные гены, например BAX или WAF.

Такова одна из многих функций нормально-го p53 гена, и именно поэтому его и называют стражем генома или совестью клетки. В таком своем «обличье» он — наш друг, а вот измененный, мутантный, p53, на описанный выше стресс-ответ не способен. И вот тут он способен стать врагом клетки. Оказалось, что в половине всех злокачественных новообразований, опухолей человека и животных, p53 утерян или присутствует в дефектном или мутантном виде, который уже не способен к устранению повреждений или запуску апоптотического механизма смерти клетки. Отсутствие нормально функционирующего p53 приводит к быстрой прогрессии опухоли и устойчивости ее к антираковой терапии, а также в целом к нестабильности генома. Из этого следует, что легче поддаются лечению опухоли с диким p53, где его присутствие под влиянием

химиотерапии или облучения запускает или индуцирует апоптоз.

Однако тут возникает основной вопрос химио- и радиотерапии: ну хорошо, мы имеем опухоль с диким p53, и данный больной скорее всего прямой кандидат на успешное лечение. Но ведь организм этого больного состоит не только из опухолевых, но и из нормальных клеток, которые под воздействием тех же химиопрепаратов или рентгеновских лучей тоже погибнут, ослабляя организм в целом. И, что особенно тяжело, в ходе лечения таких больных подобная массовая гибель здоровых клеток в различных органах вызовет серию неприятных явлений, которые в клинике называют побочными эффектами химиотерапии. Почти в 100% случаев необходимое лечение приходится останавливать временно или совсем прекращать именно из-за того, что организм не выдерживает этих побочных эффектов, и на фоне основного заболевания развиваются второстепенные, порой несовместимые с жизнью. Известно, что у мышей наиболее высокая активность p53 наблюдается в лимфатических и кроветворных органах и именно эти органы наиболее чувствительны к противоопухолевой терапии. Получается, что в данном случае p53 уже не друг, а враг?

Однако именно свойство p53 как главного виновника токсических эффектов противораковой терапии было «использовано» в поиске метода уменьшения гибели нормальных клеток в процессе химио- и радиотерапии. Ведь если попытаться выключить (хотя бы на время) p53 в клетках, свободных от болезни, то тогда на злокачественные клетки можно действовать самыми высокими дозами препаратов или облучения, сохраняя остальные органы и ткани живыми и здоровыми, а пациента избавляя от мучительных по ощущениям побочных эффектов.

Исследования в области регуляции p53 и его активации при стрессовом ответе привели к поиску химического соединения, способного временно выключать ген p53 и таким образом спасать здоровые клетки от гибели под воздействием химиотерапевтического препарата или облучения. Одно из таких соединений под названием ПИФИТРИН (от p53 inhibitor) было найдено в 1999 г. в лаборатории Андрея Гудкова в Чикаго.

Интересен был экспериментальный подход. Библиотека из нескольких тысяч химических соединений была протестирована на способность временно подавлять функцию p53 гена. В 96-луночных планках росли клетки, в которых ген цветовой окраски находился под контролем p53 зависимого промотора. Клетки обра-

бывали адриамицином (лекарством, которое активирует p53) в присутствии различных соединений из химической библиотеки. В тех лунках, где добавленное химическое соединение не препятствовало активации p53, клетки становились голубыми после окрашивания на бета-галактозидазу (белок цветовой окраски); и только лунка, содержащая пифитрин, после активации адриамицином на окрашивание не прореагировала, что позволило предположить, что именно данное химическое соединение способно эффективно подавлять p53.

Механизм работы пифитрина до конца не ясен; экспериментально показано, что он препятствует миграции вновь синтезированного белка из цитоплазмы в ядро и таким образом выполнению p53 своих функций как индуктора апоптоза. Если мышам с нормальным p53 за час до облучения ввести внутривенно пифитрин, то они, в отличие от контрольных животных, переживают летальную дозу облучения и гораздо меньше теряют в весе. На клеточном уровне наблюдается похожая картина: 10 мкМ (микроМоль, 10^{-6} Моль) концентрации пифитрина достаточно, чтобы мышинные и человеческие фибробласты избежали апоптоза, вызываемого облучением или сильными химиотерапевтическими препаратами, такими как таксол, этопозид или адриамицин. То, что эффект данного химического соединения связан именно с ингибированием p53, ясно из опытов с клетками и мышами, нокаутами по p53, где данный эффект выживания от летальных доз облучения пропадает. Таким образом, данный препарат является прямым кандидатом на применение в качестве сопутствующей терапии при особо злокачественных опухолях, что позволит вести лечение высокими дозами химиопрепаратов или радиоблучения, защищая при этом непораженные и особенно чувствительные органы и ткани.

Сейчас ведется поиск химических аналогов пифитрина, не обладающих токсичностью для человеческого организма, и сохраняющих при этом способность эффективно подавлять p53 на время ведения необходимого лечения. Но замечательно уже то, что открытие пифитрина показало, что, модулируя, изменяя стресс-ответ p53, можно не только повышать эффективность химиотерапии, но и защищать другие органы и ткани, в которых активация p53 в ответ на стресс, нежелательна. Примером является ишемия клеток сердечной мышцы и мозга, когда активация p53 в ответ на локальную гипоксию (недостаток кислорода) приводит к губительной для этих органов и организма в целом массовой апоптотической гибели клеток.

Интересно, что p53 выполняет свои функции стража генома не только и не столько сам по себе, сколько через «своих друзей и сподвижников». Стресс-ответ p53 происходит через запуск каскада генов, зависящих от p53, экспрессия которых повышается или понижается в зависимости от происходящих в клетке процессов. И таких генов великое множество. Помимо гена Mdm2, обеспечивающего регуляцию самого p53 (его деградацию и поддержание в клетке на постоянном уровне) идентифицировано более сотни генов, являющихся мишенями транскрипционных активностей p53. Они могут быть разделены на несколько групп, исходя из их физиологических функций: это гены, регулирующие клеточный цикл (WAF-1, GADD45 и др.), белки, индуцирующие апоптоз (BCL2, BAX, PUMA, PIG3 и др.), контролирующие прорастание сосудов (VEGF, TSP-1, HIF-1), и, наконец, гены, продукты которых регулируют морфологию и миграцию клеток (β -актин, фибронектин и др.).

Некоторые из p53 зависимых генов настолько тесно связаны с p53, что их независимое функционирование невозможно. Интересным в этом отношении является недавно открытый новый опухолевый супрессор p33 или ING-1. Биологические эффекты p33 и p53 взаимосвязаны и требуют активности обоих генов. На клеточном уровне это означает, что если один из генов блокирован, т.е. его активность подавлена или временно отключена, второй проявляет себя во много раз слабее или не проявляет совсем. Данные, полученные в ходе исследований, свидетельствуют о том, что белки p33 и p53 физически взаимодействуют, формируя сложный комплекс. Кроме того, p33 не может препятствовать размножению клеток опухоли, когда в них не хватает p53. И наоборот, способности белка p53 к подавлению роста клеток снижаются, если активность p33-ING1 понижена или блокирована. Таким образом, гены p53 и p33, по всей видимости, принадлежат к одному сигнальному пути и играют «в одной команде», выполняя функцию регуляции процессов апоптоза, клеточного старения и защиты клеток от опухолевого перерождения.

Подобных примеров сложного и порой запутанного взаимодействия генов в клетке немало, и почти всегда во взаимодействии при каком-либо биологическом процессе, будь то реакция организма на тот или иной лекарственный препарат или превращение клетки из нормальной в раковую, участвуют не один и не два гена, а десятки и сотни. Только по поведению нескольких генов невозможно получить полную картину происходящего процесса. А сравнивать экспрессии по

одному гену в одной реакции по гибридизации РНК (Нозерн-блот гибридизации) — это долго-временная и трудоемкая процедура. Поэтому исследователей давно интересовало, как сделать так, чтобы в одном эксперименте увидеть взаимодействие и активность десятков и даже сотен генов одновременно. Это особенно важно при исследованиях эффекта того или иного нового лекарственного препарата, его влияния на организм и отдаленных по времени последствий, когда важно выяснить, какой генетический каскад событий при этом индуцируется.

Замена Нозерн-блот гибридизации (когда на нитроцеллюлозу наносится РНК, выделенная из клеток, подвергшихся действию какого-то препарата, и гибридизуется с пробой того или иного — но только одного в одном эксперименте — гена) была придумана сравнительно недавно, около 10 лет назад, в виде технологии биочипов (microarray technology). Эта технология, простая и красивая по своей задумке и имеющая много подводных камней в реальном исполнении, произвела поистине революционный переворот в биологии и медицине.

Остановимся поподробнее на основной схеме по приготовлению и обработке биочипа. Точнее, на одной из его форм — кДНК биочипе (кДНК это ДНКовая копия клеточных РНК). Биочипы по природе нанесенного на подложку материала исторически делятся на две основные формы — «олигонуклеотидные», когда на специально обработанную поверхность наносятся короткие, 20–60 нуклеотидов, фрагменты ДНК (по несколько для каждого гена); и биочипы на основе кДНК, когда робот наносит на стекло фрагменты длиной до 1000 нуклеотидов, обычно соответствующие кДНК данного гена.

Представим, основываясь на примере с р53, что нам надо проследить реакцию всех генов, зависимых от р53, которые увеличивают или уменьшают свою активность в ответ на облучение или обработку клеток тем или иным лекарственным препаратом. Таких генов можно насчитать около 200.

Интересующие нас фрагменты кДНК каждого гена специальным роботом наносятся в виде точек на предметные стекла, химически активные в отношении связывания молекул ДНК. Таких стекол с точно заданным месторасположением фрагментов генов можно напечатать сколько угодно, а достаточное количество молекул кДНК каждого гена создаются в процессе полимеразной цепной реакции (PCR), или амплификации.

После того, как генетический материал нанесен на стекло, иначе говоря «напечатан» и химически к нему пришит, начинается собствен-

но сам процесс биочиповой гибридизации. Идея состоит в том, чтобы сравнить, как изменилась экспрессия тех или иных генов после обработки клеток, например адриамицином. Значит, нам необходима РНК не только из клеток, обработанных лекарством, но и из нормальных, контрольных, клеток. Как проявился, или проэкспрессировался, тот или иной ген, станет ясно в результате гибридизации — процесса, основанного на правиле образования комплементарных пар между одноцепочечными фрагментами ДНК на стекле и пробы из раствора, в который помещают стекло с напечатанным биочипом.

Пробы в растворе — это те самые РНК из обработанных адриамицином (опыт) и необработанных (контроль) клеток. При приготовлении проб в реакцию добавляют флуоресцентные красители, сложные химические соединения, цианиды, которые прикрепляются к нуклеотидам пробы. Существует множество красителей, отличающихся диапазоном волн излучаемого света (или попросту цветом). Использование красителей разного цвета (например, красного Су5 и зеленого Су3) для маркировки РНК из проб опыта и контроля позволяет проводить сравнение экспрессии генов на одном и том же стекле, в одном и том же эксперименте.

Итак, в ходе реакции гибридизации молекулы каждого типа РНК пробы связываются (в лучшем случае) с единственным типом молекул из зафиксированных на биочипе. Те молекулы, которые не связались, смываются, а связавшиеся светятся одновременно двумя цветами, причем соотношение интенсивности красного и зеленого цветов, которое определит лазерный сканер, будет соответствовать соотношению количества РНК в двух пробах. Это соотношение и будет являться тем самым изменением экспрессии генов в клетках после обработки их лекарственным препаратом.

Картину поверхности стекла с нанесенным биочипом получают в многоканальном лазерном сканере, где каждый канал настроен на длину волны соответствующего маркера, краски. Точки, обозначающие гены, интенсивность свечения которых в красном и зеленом свете будет одинакова, — это гены, уровень активности которых после воздействия лекарства не изменился (серый цвет точек). Гены же, уровень экспрессии которых увеличился или уменьшился, будут ярко-зелеными или ярко-красными (рисунки 1 и 2).

Цветовые характеристики каждой точки получают свои числовые выражения, которые и являются определяющими при сравнении экспрессии различных точек-генов. На следующем этапе обработки полученных данных гены

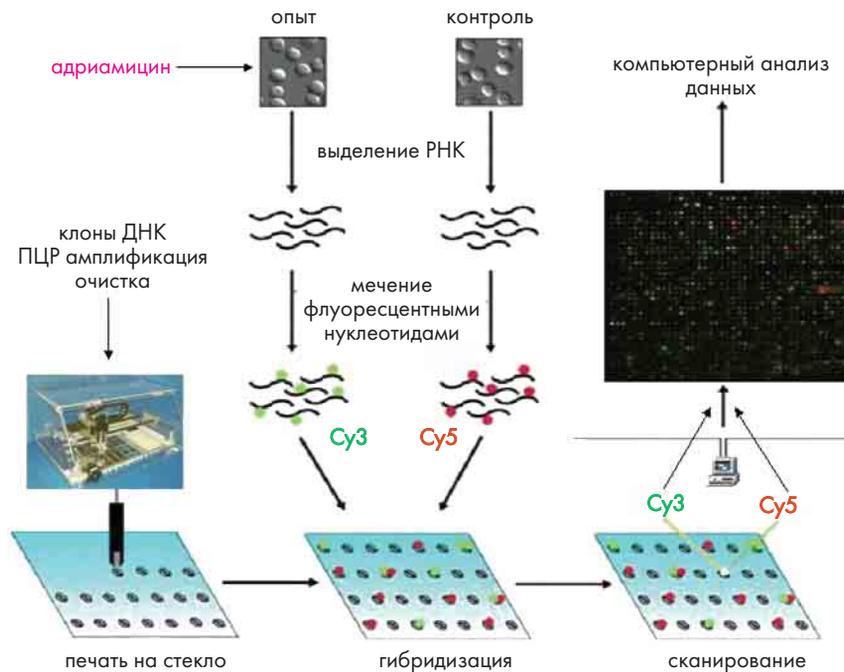


Рисунок 1. Схема приготовления и обработки биочипа.

объединяют в группы, или кластеры, по схожести изменению уровня экспрессии. Это делается с помощью компьютерных программ сравнения биочиповых данных и на основе биологических знаний о каждом конкретном гене и взаимодействии генов друг с другом. Обнаружение подобных кластеров — это начало формирования новых взглядов на заданную биологическую проблему на основе взаимовлияния генов и

изменения их экспрессии под воздействием тех или иных факторов. Например, в рассмотренном выше эксперименте были найдены группы генов, зависимые от p53 и принадлежащие к различным группам по типу контролируемых ими процессов. Некоторые из белков, продуктов этих генов, могут быть использованы в химиотерапии раковых опухолей, если изменение их активности, как в случае p53 и пифитрина, может принести пользу клетке и организму в целом.

На один чип, на одно стекло, можно поместить, к примеру, весь мышинный геном. И таким образом всего за один-два эксперимента определить, какие группы генов ведут себя одинаково, а какие — по-разному в разных условиях, таких как этапы эмбрионального развития и дифференцировки; стадии лечения, ремиссии или рецидива того или иного заболевания; во время, до и после введения в организм того или иного лекарства.

За 10 лет с момента создания биочиповой технологии появилось множество ее вариантов: уже созданы белковые чипы и даже тканевые чипы, когда срезы с обычных гистологических парафиновых или креостатных блоков одного или многих органов и тканей переносятся на одно и то же стекло и анализируются с помощью как гистохимического и иммунологического окрашивания, так и гибридизацией *in situ* (рисунок 3). Нетрудно вообразить, насколько более экономичен и информативен такой метод, особенно если речь идет о биопсийном (т.е. взятом от больных) материале, количества которого всегда ограничены.

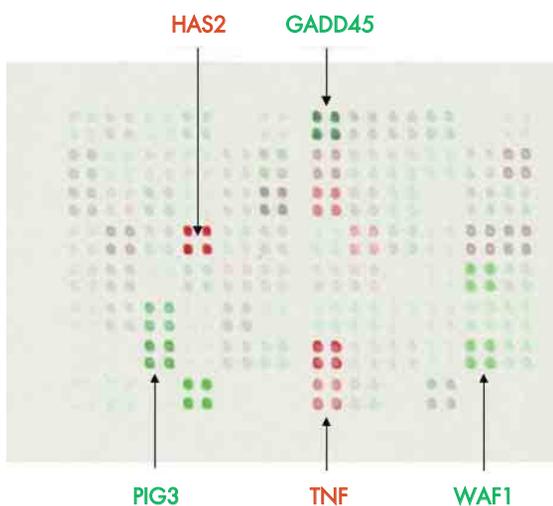


Рисунок 2. Фрагмент изображения биочипа, прошедшего гибридизацию с пробами РНК из клеток мышинных фибробластов, обработанных адриамицином, в сравнении с необработанными нормальными мышинными фибробластами. Точки, обозначающие гены, уровень экспрессии которых после воздействия адриамицина не изменился, выглядят серыми; гены, уровень экспрессии которых возрос, — зелеными, уменьшился — красными.

От определения взаимодействия генов до ранней диагностики тяжелых и опасных заболеваний, таких как лейкозы и другие формы опухолевой трансформации, — таковы еще не вполне исчерпанные и перечисленные возможности этой красивой и на первый взгляд простой технологии.

Литература

- Cheung V.G., Morley M., Aguilar F., Massimi A., Kucherlapati R., Childs G.** 1999. Making and reading microarrays // *Nat. Genet.*, 21 (1 suppl.): 15–19.
- DeRisi J., Penland L., Brown P.O., Bittner M.L., Meltzer P.S., Ray M., Chen Y., Su Y.A., Trent J.M.** 1996. Use of a cDNA microarray to analyze gene expression patterns in human cancer // *Nature Gen.*, 14: 457–460.
- Grigorian I.A., Garkavtsev I., Ossovskaya V.S., Chernov M.V., Chumakov P.M., Gudkov A.V.** 1998. The candidate tumor suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control // *Nature*, 391: 295–298.
- Komarov P.G., Komarova E.A., Kondratov R.V., Christov-Tselkov K., Coon J.C., Chernov M.V., Gudkov A.V.** 1999. A Chemical Inhibitor of p53 That Protects Mice from the Side Effects of Cancer Therapy // *Science*, 285: 1733–1737.

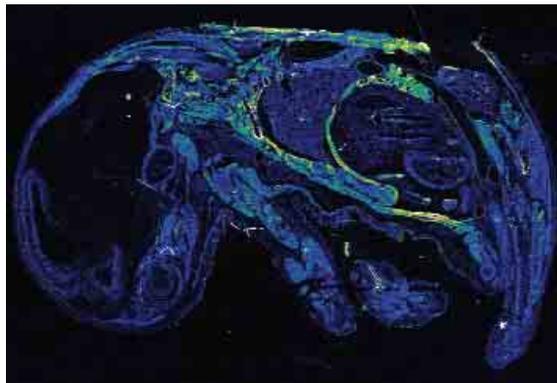


Рисунок 3. Возможности биочиповой технологии. Гистоблот мышинного эмбриона. Гибридизация с помеченной Cy3 (зеленая краска) кДНК актина.

- Lane D.P.** 1994. The regulation of p53 function: Steiner Award Lecture // *Int. J. of Cancer*, Jun 1; 57(5): 623–627.
- Lowe S.W., Cepero E., Evan G.** 2004. Intrinsic tumour suppression // *Nature*, 432: 307–315.
- Lee J.K., Bussey K.J., Gwadry F.G., Reinhold W., Riddick G., Pelletier S.L., et al.** 2003. Comparing cDNA and oligonucleotide array data: concordance of gene expression across platforms for the NCI-60 cancer cells // *Genome Biol.*, 4 (12): 53.
- Vousden, K.H.** 2000. Death star // *Cell*, 22: 691–694.

Сигнальные молекулы и поведение. Сравнительный подход

В. Дьяконова



Варвара Дьяконова
8-й выпуск биокласса (Микробоссы), школа № 520 (1986 г.), закончила кафедру физиологии ВНД Биофака МГУ (1992 г.), к.б.н., старший научный сотрудник в Институте биологии развития РАН, dyakonova@nm.ru

Когда мы учились в 10-м классе, меня попросили однажды в качестве домашнего задания приготовить доклад по опиоидным пептидам. Эти вещества были открыты около десяти лет назад в мозге млекопитающих, и изучение их функций находилось тогда на переднем крае физиологических и медицинских исследований.

Я выяснила, что опиоидные пептиды, или опиоиды, вырабатываются определенными нервными клетками и, в свою очередь, влияют на другие клетки, имеющие опиатные рецепторы, т.е. определенные молекулярные структуры в мембране, которые узнают и связывают эти пептиды. Уже было известно, что опиоиды вызывают обезболивание и положительное подкрепление (чувство удовольствия), а опиатные рецепторы связывают также морфий и отвечают за его наркотические эффекты.

Через несколько лет, уже при подготовке диплома, я узнала о работе немецкого исследователя Нерешаймера 1903 г., в которой описывалось действие морфина на поведение ресничной инфузории *Stentor* (трубач) (рисунок 1). У трубача морфин вызывал эффект, сходный с обезболивающим действием опиатов у высших животных: он подавлял сокращение в ответ на тактильную стимуляцию (прикосновение). В конце 1980-х гг. у инфузории нашли уже и настоящие опиатные рецепторы, описали внутриклеточные механизмы, обеспечивающие подавление сократительного ответа при действии опиатов.

Меня поразило тогда, что вещество воспринималось сходно одноклеточным организмом и человеком. Это было случайное, кажущееся

сходство или мы, в самом деле, унаследовали реакцию на эти вещества от фантастически далеких предков? Не является ли вообще «химия» — универсальным языком, который используют и понимают одинаково все организмы от простых до сложных?

Естественно, появилось желание узнать, как обстоят дела с опиоидной регуляцией у представителей других групп животных. Прежде всего у разных типов беспозвоночных. К 1990-м гг. опиатные рецепторы и опиоидные пептиды были обнаружены у представителей практически всех крупных таксономических групп беспозвоночных. Поиск литературы по их поведенческим эффектам и собственные эксперименты показали, что у всех исследованных беспозвоночных опиаты также подавляют защитное и болевое поведение, а их антагонисты, наоборот, усиливают ответ на «пугающие» или болевые стимулы. Такие эффекты наблюдали у пиявок (annelиды), у наземных, морских, пресноводных гастропод (моллюски), у крабов (ракообразные), у представителей разных отрядов насекомых (рисунок 2). У беспозвоночных были выявлены условия, при которых происходит активация опиоидной системы и выброс эндогенных опиоидов. Как и у млекопитающих, это были разные виды стрессов и половое поведение. В этих условиях у животных наблюдалось такое же снижение болевой чувствительности (аналгезия), как и при введении опиатов. Аналгезия снималась опиатным антагонистом налоксоном.

У высших беспозвоночных — брюхоногих моллюсков, крабов и насекомых — были обнаружены и другие функции опиоидов, известные для млекопитающих, например участие в обучении, регуляция пищевого, полового поведения, общей активности. Стимуляцию опиоидергической зоны в мозге улитки можно использовать

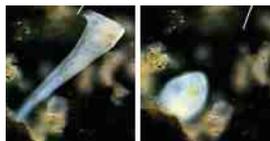


Рисунок 1. Инфузория *Stentor* (трубач) сокращается в ответ на тактильную стимуляцию (прикосновение).

Эту реакцию блокирует морфин, а также опиоидный пептид человека — β-эндорфин. Оба вещества влияют на один и тот же опиатный рецептор.

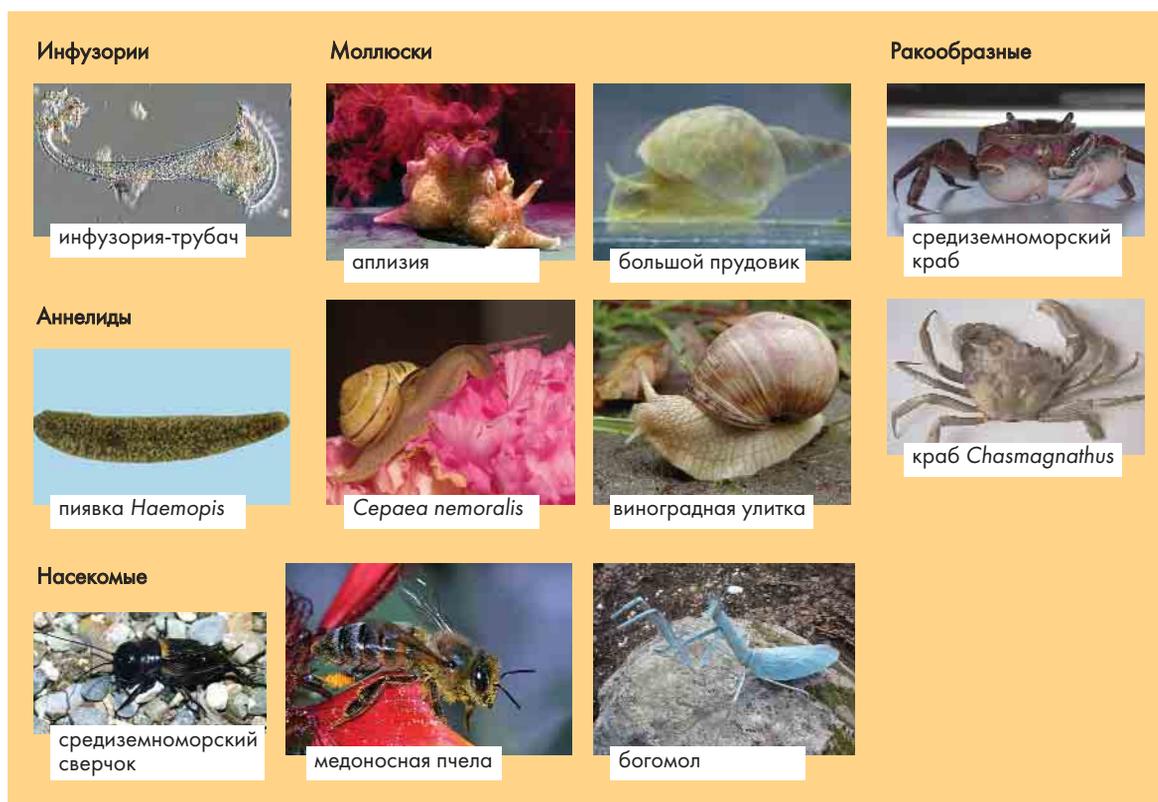


Рисунок 2. Беспозвоночные, у которых исследовали роль опиоидов в регуляции защитного и болевого поведения.

Инфузория трубач. Пиявка *Haemoris marmorata*. Моллюски: аплизия, большой прудовик, виноградная улитка, *Ceraea nemoralis*. Крабы: *Carcinus mediterraneus*, *Chasmagnathus*. Насекомые: медоносная пчела, богомол, сверчок *Gryllus bimaculatus*. У всех исследованных видов опиоиды подавляют защитные и болевые реакции, а их антагонисты наоборот усиливают пугливость и болевую чувствительность.

в качестве подкрепления в экспериментах с обучением. Так же, как и у высших животных, у улиток опиоидная система активируется во время любовных ласк и вызывает обезболивание (рисунок 3).

У ручейника (насекомые) при подавлении опиоидной системы замедляется строительство домика (рисунок 4). При этом животное двигается и работает не меньше, чем в норме. Оказалось, что дом строится медленно оттого, что ручейник с подавленной опиоидной системой «отбраковывает» и отбрасывает гораздо большее количество строительного материала. Можно предположить, что когда опиоидов не хватает, ручейнику



Рисунок 3. Ласкающиеся виноградные улитки.

Также, как и у высших животных, у моллюсков такое поведение вызывает активацию опиоидной системы и обезболивание.

все, что он ни возьмет, — «не нравится», также как и человеку при пониженном тоне опиоидной системы или в период наркотической абстиненции.

Некоторые формы поведения, контролируемые опиатными рецепторами, присущи не всем видам. К ним, помимо упомянутого строительства домика у ручейника, относится, например, межсамцовая агрессия: ритуальные или реальные драки самцов за лидерство (рисунок 5). Это поведение может проявляться сходно у животных, крайне далеких друг от друга в систематическом отношении, и отсутствовать у видов, близких «драчунам». В такой ситуации тем более трудно себе представить, чтобы сохранились и передались через гипотетического общего предка химические механизмы регуляции этого поведения. И тем не менее изучение действия опиатов на агрессивность самцов разного социального ранга у мыши и у сверчка выявили поразительное сходство. Результаты свидетельствовали о том, что опиоидная система принимает участие в подавлении агрессивности проигравших, субординантных самцов и у млекопитающих, и у насекомых.



Рисунок 4. Опиоиды необходимы для принятия положительного решения о пригодности материала при строительстве домика у ручейника.

Слева — ручейник, тестирующий частичку, справа — законченный домик. Подробнее о строительном поведении ручейника см. <http://www.gotai.net/documents/doc-art-002-06.aspx>. Печать фото — с любезного разрешения В.А. Непомнящих.

Таким образом, оказалось, что такая функция опиоидных пептидов, как контроль за уровнем защитных реакций, появилась в эволюции очень рано и, по-видимому, имела существенный адаптивный смысл уже для сравнительно просто организованных животных. Действительно, существуют ситуации, когда пассивные защитные реакции (или боль) мешают более важным для выживания программам поведения, тогда очень полезно иметь систему, способную эти реакции подавлять. Это исходное, наиболее древнее, сигнальное значение опиоидов могло стать основой для дивергентного развития их новых функций в эволюции, многие из которых, появились, по-видимому, еще у низших беспозвоночных.

К таким выводам привел сравнительный анализ поведенческих эффектов опиоидных пептидов. А как в отношении других сигнальных молекул? Можно ли считать, что, вообще, функции регуляторных веществ консервативны, т.е. сходны у всех животных?

Сейчас уже можно с уверенностью говорить о том, что судьба разных регуляторных систем в эволюции была различной. Для одних молекул консервативность функции четко прослеживается даже на больших таксономических расстояниях, для других — только в пределах одной или нескольких групп. К числу первых, помимо опиоидных пептидов, еще можно с уверенностью отнести инсулин, функция которого в энергетическом обмене остается неизменной у самых разных и эволюционно далеких представителей животного мира.

Хорошим примером сигнальной молекулы, функции которой сохраняются в пределах одной или нескольких таксономических групп, может служить серотонин. Серотонин выделяется во

время голода и координирует пищевое поведение у разных моллюсков. При этом у каждого исследованного вида он активирует свою видоспецифическую программу поиска пищи. Например, у фильтратора беззубки (двустворчатые моллюски) это проявляется сначала в ускорении движений раковины, обеспечивающих закачку воды в фильтрующую систему, а затем в инициации локомоторной активности и поиске более обеспеченного пищей участка дна. У пресноводного моллюска большого прудовика серотонин активирует локомоцию и поисковое поведение. У хищного морского ангела (крылоногий моллюск) — специфическую комплексную программу охотничьего поведения. Все известные эффекты серотонина у моллюсков, не только поведенческие, но и метаболические, хорошо согласуются между собой и, в целом, обеспечивают то поведенческое состояние, которое вызывает голод. Сходные функции серотонина обнаружены у представителей другого типа беспозвоночных — пиявок.

Но вот в еще одном крупном таксоне беспозвоночных, у насекомых, практически все эффекты серотонина отличны и даже противоположны тем, что описаны для моллюсков и пиявок. Зато «знакомый» серотониновый набор

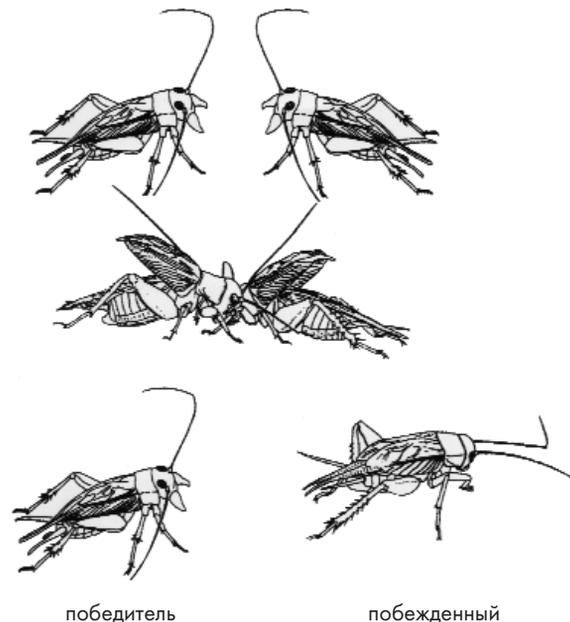


Рисунок 5. Демонстрация, драка и установление социального ранга у самцов средиземноморского свечка *Gryllus bimaculatus*.

Опиоидная система принимает участие в регуляции поведения и победителя, и побежденного после драки. У первого она подавляет избгательное поведение и пугливость, у второго — агрессию. Опиатный антагонист налоксон делает доминанта пугливым, а субординанта — агрессивным. Сходное влияние налоксона описано у побежденных самцов мышей (из Stevenson et al., 2005, с изменениями).

эффектов, обеспечивающих интенсификацию поведения и метаболизма при голоде, обнаружен у другого вещества — октопамина. Почему? На этот вопрос пока нет ответа, существуют только гипотезы.

Похожую ситуацию наблюдали и у низших позвоночных: серотониновая система, хорошо развитая у ланцетника, асцидии, миноги, катастрофически деградировала у низших рыб на фоне бурного развития катехоламиновой системы. Предполагается, что эти изменения связаны с переходом от древнего фильтрационного питания к челюстному. Что произошло при переходе к челюстному питанию, почему пришлось поменять звено химической регуляции, тоже пока неизвестно.

Иногда одна и та же регуляторная молекула, в каждой крупной таксономической группе приобретает новую функцию. Например, пролактин, связанный с такой специфической функцией млекопитающих, как лактация, химически вовсе не был изобретен млекопитающими. Он есть и у других позвоночных, однако выполняет у них совсем другие функции. У рыб пролактин отвечает за осморегуляцию, у амфибий вызывает метаморфоз, у тетрапод стимулирует рост.

У организмов, перешедших к паразитизму, основной функцией синтезируемой сигнальной молекулы может быть регуляция не собственного поведения, а поведения хозяина. Паразиты с выгодой для себя умеют химически стимулировать пищевое поведение хозяина, подавлять его общую активность, снижать иммунитет. Существует пример, когда простейшее, передающееся половым путем, научилось даже активно стимулировать половое поведение хозяина, синтезируя стероидные половые гормоны последнего. Такая изобретательность кажется удивительной только на первый взгляд. На самом деле, стероидные гормоны были изобретены еще на заре эволюции и используются многими свободноживущими одноклеточными в регуляции собственной жизнедеятельности. Паразиту было достаточно активировать уже имеющийся аппарат для синтеза этих молекул. Он воспользовался тем, что высшие животные когда-то сами «позаимствовали» эти сигнальные молекулы у своих давних предков.

Идея о том, что язык химической сигнализации унаследован многоклеточными организмами от одноклеточных, была впервые высказана уже более 50-и лет назад Х.С. Коштойанцем. Тогда список известных сигнальных молекул был еще очень скромным. За прошедшее время открыто огромное количество регуляторных молекул, принадлежащих по химическому строению к

совершенно разным классам веществ (пептиды, стероиды, модифицированные аминокислоты и нуклеотиды, производные жирных кислот, газы). Каждое новое открытое сигнальное вещество почти всегда оказывалось эволюционно «старым», т.е. обнаруживалось у представителей низших позвоночных и беспозвоночных. Очевидно, что в ходе эволюции язык химической сигнализации тоже эволюционировал. Какие законы (или хотя бы закономерности) управляют функциональной эволюцией сигнальных молекул? Сохраняется ли донервное значение сигнальной молекулы у многоклеточных животных? Как появляются новые функции у сигнальных молекул? В какой момент и почему возникает необходимость в смене сигнального значения вещества? На эти вопросы ищет ответы сравнительная физиология сигнальных систем.

Несколько слов следует сказать о методах, о том, как изучают роль сигнальных молекул в регуляции поведения. Сейчас нормой для сравнительно-физиологических исследований стал комплексный подход. Поведенческие функции сигнальных молекул изучают в фармакологических опытах *in vivo*, когда животному вводят вещество и наблюдают за изменениями в поведении. Находят клетки, вырабатывающие данную сигнальную молекулу, изучают, где, в каких отделах организма они расположены, в какие области происходит секреция вещества. В распоряжении морфологов сейчас два основных метода, позволяющих выявить клетки, синтезирующие определенное вещество: иммуногистохимия (использование антител к нужной молекуле) и гибридизация *in situ*. Последний метод позволяет выявить экспрессию гена, отвечающего за синтез данного вещества или ферментов, участвующих в его синтезе. Этот метод является к тому же количественным, он позволяет оценивать изменения в уровне экспрессии гена. В количественной оценке синтеза сигнальных молекул большую роль играют химические методы, жидкостная хроматография и др. Количественные методы необходимы, чтобы понять, как и при каких условиях меняется в организме синтез данной сигнальной молекулы.

У многих модельных беспозвоночных известны нейроны, отвечающие за то или иное поведение. В электрофизиологических экспериментах можно исследовать характер активности этих клеток и непосредственное влияние на нейроны исследуемых веществ. Для некоторых простых ритмических программ, например локомоции или жевания, найдены клеточные генераторы повторяющихся движений. Они состоят из последовательно работающих нейро-

нов, выбрасывающих каждый свое сигнальное вещество, или нейротрансмиттер. Клетки, входящие в состав таких генераторов, можно изолировать и высадить в культуру, в которой через определенное время они вновь объединяются в работающий генератор (рисунок 6). Тогда свойства генератора, зависимость их от окружающей химической среды можно изучать уже в изолированном виде, отдельно от сенсорных и двигательных отделов.

Методы молекулярной биологии, позволяющие изменять экспрессию генов, связанных с метаболизмом сигнальных молекул, и изучать последствия таких изменений, разработаны пока только для небольшого числа видов: мыши, человека, дрозофилы и червя ценорабдидиса. Эти методы настолько перспективны, что современная научная политика склоняется к тому, чтобы большинство исследований свести к изучению упомянутых четырех видов. Однако, воплощение в жизнь такого подхода, конечно, означает ущемление сравнительных исследований. К счастью, отдельные герои продолжают создавать генные библиотеки для разных видов животных. И сравнительные физиологи им благодарны за это.

Литература

Обзоры:

- Дьяконова В.Е.** 2001. Поведенческие функции опиоидных пептидов у беспозвоночных. // Журн. эвол. биохим.-физиол., 37 (4): 253–261.
- Сахаров Д.А.** 1990. Интегративная функция серотонина у примитивных Metazoa // Журн. общ. биол., 51: 437–449.
- Сахаров Д.А.** 1990. Множественность нейротрансмиттеров: функциональное значение // Журн. эвол. биохим.-физиол., 26 (5): 733–741.
- Bicker G, Menzel R.** 1989. Chemical codes for the control of behaviour in arthropods // Nature, 337: 33–39. Обзор.
- Harrison L.M., Kastin A.J., Weber J., Banks W., Hurley D., Zadina J.** 1994. The opiate system in Invertebrates // Peptides, 15: 1309–1329.
- Libersat F., Pflueger H.I.** 2004. Monoamines and the orchestration of behavior // BioScience, 54: 17–25.
- Nagabhushanam R., Sarojini R., Reddy P.S., Devi M., Fingerman M.** 1995. Opioid peptides in invertebrates: Localization, distribution and possible functional roles // Curr. Sci., 69: 659–671.
- Stoka A.M.** 1999. Phylogeny and evolution of chemical communication: an endocrine approach // Journal of Mol. Endocrinology, 22: 207–225.

Статьи:

- Дьяконова В.Е., Сахаров Д.А.** 1994. Участие эндогенной опиоидной системы в регуляции пищевого и защитного поведения моллюска // Журн. высш. нервной деятельности, 44 (2): 316–322.

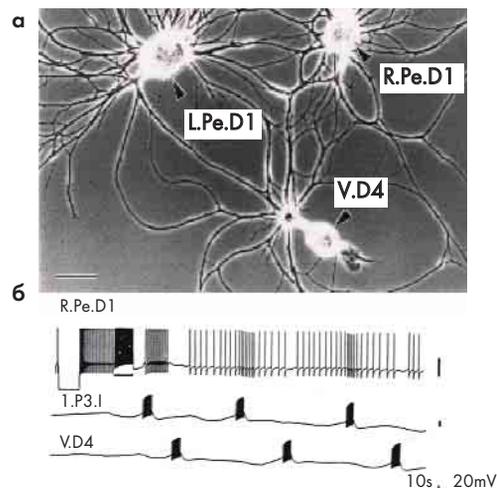


Рисунок 6. Центральный генератор дыхания моллюска в культуре. Три нервные клетки, обеспечивающие полный цикл дыхательных движений. Внизу — регистрация их активности. Клетки разряжаются последовательно, каждая в свою фазу. Из статьи Lukowiak *et al.* (Science, 1991).

Дьяконова В.Е., Сахаров Д.А. 1994. Нейротрансмиттерная основа поведения моллюска: управление выбором между ориентировочным и оборонительным ответом на предъявление незнакомого объекта // Журн. высш. нервной деятельности, 44 (3): 526–531.

Непомнящих В.А., Подгорный К.А. 1994. Формирование упорядоченного поведения при случайной последовательности раздражителей у личинок ручейника // Журн. общ. биол., 55: 328–336.

Dyakonova V.E., Elofsson R., Carlberg M., Sakharov D.A. 1995. Complex avoidance behaviour and its neurochemical regulation in the land snail *Cepaea nemoralis* // Gen. Pharmac., 26: 773–777.

Dyakonova V.E., Sakharov D.A., Schuermann F.-W. 1999. Effects of serotonergic and opioidergic drugs on escape behavior and social status of male crickets // Naturwissenschaften, 86: 435–437.

Dyakonova V.E., Schuermann F.-W., Sakharov D.A. 2002. Effects of opiate ligands on intraspecific aggression in crickets // Peptides, 23 (5): 835–842.

Dyakonova V.E., Schuermann F.-W., Dolgov V.V., Kudryavtseva N.N., Sakharov D.A. 2001. Increase of aggressiveness by opiate antagonists is common to rodent and insect submissive males. Proc. 28th Gottingen Neurobiol. Conference.

Lent C.M., Dickinson M.H. 1984. Serotonin integrates feeding behaviour of the medicinal leech // J. Comp. Physiol., 154A: 457–471.

Maksimova O.A., Balaban P.M. 1999. Two modulatory inputs exert reciprocal reinforcing effects on synaptic input of premotor interneurons for withdrawal in terrestrial snails // Abstr. from the Conference «Conceptual Advances in the Studies of Associative Learning and Memory»: 67.

Stevenson P.A., Dyakonova V.E., Rillich J., Schildberger K. 2005. Octopamine and Experience-Dependent Modulation of Aggression in Crickets // J. Neurosci., 25 (6): 1431–1441.

Глобальное сокращение численности земноводных и роль рыбы ротана в этом процессе

А. Решетников



Андрей Решетников
8-й выпуск биокласса
(Микробоссы), школа
№ 520 (1986 г.), закончил
Биофак МГУ, к.б.н., сотруд-
ник Института проблем
экологии и эволюции им.
А.Н. Северцова РАН,
anreshetnikov@yandex.ru

В различных районах Земли, в том числе в Европейской части России, сокращается численность популяций многих видов амфибий и снижается разнообразие видов этой группы позвоночных, что подробно отражено в научных трудах, справочных изданиях и информационных бюллетенях. Скорость сокращения популяций амфибий нарастала с середины к концу XX столетия.

Факторы, негативно влияющие на популяции амфибий

Предполагается, что на состояние популяций амфибий могут влиять различные факторы — от локальных до глобальных. Выявление факторов, ведущих к угнетению популяций, в частности к сокращению численности, исчезновению амфибий из отдельных регионов или местностей, является весьма сложной задачей. Прежде всего, угнетение популяций в результате влияния негативных факторов необходимо отличать от колебаний численности этих популяций как естественного процесса. Для достоверного различия этих явлений требуется проведение многолетнего мониторинга, поскольку естественное падение численности (например, в результате повторяющихся климатических отклонений) может смениться подъемом. Отдельные факторы могут усиливать действие других. Помимо этого, выявление факторов угнетения популяций амфибий затрудняется сложностью

жизненного цикла этих животных, поскольку они могут подвергаться отрицательным воздействиям в водоемах (икра, личинки и взрослые особи), в наземных биотопах (сеголетки и взрослые), а также на путях миграций (сеголетки и взрослые).

Научные исследования, связанные с проблемой уменьшения численности амфибий, группируются вокруг нескольких вероятных основных причин этого процесса: увеличение ультрафиолетового облучения вследствие истончения озонового слоя Земли; изменение климата; распространение инфекционных заболеваний; загрязнение наземных биотопов и мест размножения, включая закисление нерестовых водоемов; разрушение биотопов; всееление чужеродных видов животных.

Истончение озонового слоя Земли ведет к повышению в солнечном спектре доли ультрафиолетового излучения, представляющего определенную опасность для популяций тех видов амфибий, которые откладывают икру в открытых мелких частях водоемов. У таких видов может наблюдаться значительная гибель оплодотворенной икры. По-видимому, ультрафиолетовые лучи способны разрушать внутримолекулярные связи в молекулах ДНК. В результате нарушается нормальное развитие эмбрионов и личинок, что приводит к возникновению уродств или гибели животных. К естественным механизмам защиты эмбрионов и личинок амфибий от последствий воздействия ультрафиолетового излучения относится функционирование ферментов-фотолиаз, восстанавливающих нормальную структуру ДНК.

Негативное влияние ультрафиолетового излучения выявлено для многих видов амфибий в Северной Америке, в Австралии и в Европе. Чувствительность разных видов к действию солнечного облучения неодинакова. Икра тритонов особенно чувствительна к облучению, поэтому специализированные формы поведения (оборачивание самками икринок при откладке) могут повышать их выживаемость. В природных водоемах на выживаемость икры влияют высотность территории, облачность, присутствие в водоеме

растительности, закрывающей икру от света, и длительность инкубации, которая зависит от температуры воды. Головастики защищены от облучения лучше эмбрионов благодаря наличию в коже головастиков светопоглощающих образований. Однако недавно выявлен «перенесенный» эффект: особи, подвергнутые повышенному облучению на эмбриональных стадиях, завершали личиночное развитие позже, при меньших размерах и часто вовсе останавливались в развитии.

Таким образом, по крайней мере для некоторых видов, показаны негативные последствия истончения озонового слоя планеты, однако пока трудно однозначно делать выводы о значении и глобальности такого воздействия.

Климатические изменения могут по-разному влиять на отдельные виды амфибий. Так, общее потепление климата в Англии в последние 20 лет явилось причиной того, что тритоны размножаются на несколько недель раньше, чем в прежние годы, однако у серой жабы *Bufo bufo* время пробуждения и нерестовой активности зависит не от абсолютных температур, а от средних значений за некоторый период времени, предшествующий нересту. В целом, обнаружение фенологических изменений в жизненном цикле и выявление корреляций между сокращением отдельных видов и потеплением климата не дают ответ на вопрос: насколько этот фактор ответствен за сокращение популяций амфибий? Лишь для отдельных видов, например для семиреченского лягушкозуба *Ranodon sibiricus*, в качестве причины вымирания можно указать климатические факторы (в данном случае аридизацию, т.е. снижение влажности).

Распространение заболеваний нередко называют причиной сокращения популяций амфибий в различных районах Земли. Заболевания амфибий могут вызывать грибки, простейшие, паразитические рачки, трематоды, паразитические насекомые, вирусы и бактерии. Одним из самых распространенных грибковых заболеваний является сапролегниоз, значительно повышающий смертность икры. Весьма опасными для амфибий признаны эпидемии цитридомикоза. Это смертельное заболевание также вызывается грибами и ведет к поражению кожных покровов. Наиболее полные обзоры по этой теме содержат указания на резкое увеличение частоты регистрации различных катастрофических эпидемий среди амфибий и числа известных опасных заболеваний.

Загрязнение нерестовых водоемов и наземных станций может служить еще одной причиной угнетения популяций амфибий. Такие явления характерны для районов Земли с хорошо разви-

той промышленностью и сельским хозяйством, прежде всего для стран Северной Америки и Европы. Наиболее существенными для амфибий загрязнителями признаны соединения тяжелых металлов и химикаты, используемые для обработки сельскохозяйственных угодий. Иногда популяции амфибий испытывают воздействие различных видов загрязнений одновременно.

Вредное влияние ионов металлов показано на личинках и эмбрионах ряда видов амфибий, однако для некоторых видов установлено, что негативное воздействие ионов некоторых металлов проявляется лишь при низких значениях pH.

Весьма интересны работы, посвященные воздействию на амфибий азотных удобрений, широко применяемых в сельском хозяйстве России и других стран. На пагубное влияние нитрата аммония впервые обратил внимание Л. Бергер. Установлено, что нитраты и нитриты влияют на темпы роста и смертность личинок амфибий. Таким образом, при попадании азотных удобрений в водоемы личинки амфибий подвергаются определенной опасности.

Взрослые амфибии также восприимчивы к воздействию азотных удобрений. Для этих животных гранулированный нитрат аммония, применяемый для удобрения полей, высокотоксичен в концентрациях много ниже рекомендованных для использования. Однако это соединение теряет свою токсичность при растворении в почве. Даже в относительно сухой (при влажности около 7%) почве гранулы растворяются примерно за 3 часа. Обработка полей нитратом аммония, которая осуществляется весной в дневное время, по-видимому, может не оказывать значительного эффекта на половозрелых амфибий, весенние миграции которых происходят преимущественно в темное время суток.

Существенный вред популяциям амфибий может причинить применение инсектицидов, фунгицидов и гербицидов.

В последние два десятилетия повысились темпы *закисления природных водоемов* из-за выпадения кислых осадков, загрязненных выбросами промышленных предприятий. Только в Швеции к 1998 г. значительному закислению подверглись примерно 16 000 озер из имеющихся 85 000, и для спасения водных экосистем 8 000 озер были обработаны известковым порошком. Наиболее подвержены резким изменениям кислотности воды небольшие временные водоемы, которые часто используются амфибиями для размножения. Механизм воздействия кислой воды на личинок амфибий обсуждается, но, вероятно, в кислой среде нарушается структура и функционирование жабер так же, как это установлено для рыб.

Отрицательное влияние низких значений рН воды показано на личинках ряда видов амфибий, наиболее чувствительны к закислению хвостатые земноводные. Взрослые амфибии менее чувствительны к действию этого фактора.

Разрушение биотопов также ведет к угнетению популяций амфибий. Этот процесс наблюдается на всех континентах (кроме Антарктиды, где нет амфибий) и выражен по-разному: от тотального сведения гигантских площадей тропического леса до локальных, но разнообразных проявлений хозяйственной деятельности человека, таких как затопление или застройка территорий, разрушение убежищ, перевыпас скота, загрязнение скотом водоемов, ликвидация рисовых чеков, дорожные работы, расчистка берегов водоемов и сооружение набережных. Сокращение численности амфибий происходит одновременно с уменьшением общего числа малых водоемов, характерным прежде всего для сельскохозяйственных регионов развитых стран и связанным с интенсификацией производства и укрупнением хозяйств. Неиспользуемые человеком сельские пруды относительно быстро исчезают из-за естественной сукцессии, часть прудов засыпают грунтом. Кроме того, показано отрицательное влияние сети дорог и фрагментации ареала на урбанизированных территориях, поскольку для необходимого поддержания генного обмена в пределах метапопуляции амфибий важны расстояния между соседними водоемами размножения. Для поддержания популяций амфибий в некоторых европейских странах осуществлены специальные «прудовые проекты» по созданию водоемов размножения амфибий.

Из сказанного видно, что сокращение популяций амфибий может происходить по самым различным причинам. Вероятные факторы, влияющие на состояние популяций амфибий, можно разделить на локальные и глобальные. К первым можно с некоторой долей условности отнести гибель амфибий на дорогах, распространение заболеваний, загрязнение и разрушение мест размножения, изоляция популяций вследствие урбанизации и некоторые другие. Значительное число работ посвящено факторам,



Рисунок 1. Рыба ротан, *Perccottus glenii* Dybowski (сем. *Odontobutidae*), впервые завезенная в Европу в 1912 г. из бассейна р. Амур.

которые могут претендовать на роль общих или глобальных, т.е. таких факторов, чье распространение не поддается контролю, и чье действие охватывает большие территории: климатические изменения, трансформация ландшафтов.

Воздействие рыбы ротана на популяции амфибий

Помимо перечисленных, весьма существенным фактором угнетения популяций амфибий в различных регионах Земли является *вселение чужеродных видов животных*. Целенаправленная или случайная интродукция животных и даже растений может отрицательно влиять на состояние популяций амфибий. Из интродуцированных животных различными систематическими групп наиболее опасными для популяций амфибий оказываются рыбы. Интродукция рыб нередко приводит к тому, что водоемы перестают использоваться амфибиями для размножения, поскольку многие виды рыб активно поедают их личинок.

В районе подмосковного заказника «Озеро Глубокое» на относительно небольшой площади (50 км²) отмечены 18 чужеродных видов животных, преимущественно млекопитающих. География регионов-доноров весьма обширна, но в подавляющем большинстве они относятся к Северному полушарию. Анализ времени и способов вселения показывает, что темпы вселения чужеродных видов животных неуклонно повышаются, что происходит всецело благодаря человеческой активности. Наиболее уязвимыми оказались водные экосистемы, в которые проникли «ключевые» виды, т.е. виды, присутствие которых определяет структуру всей экосистемы. Многолетние наблюдения подтверждают существование постоянного фона потенциальных биологических инвазий. Другими словами, из-за человеческой активности в природе постоянно оказываются чужеродные виды, некоторые из которых размножились и уже образовали устойчивые популяции. Как показали проведенные исследования, наибольшее влияние на популяции амфибий оказывает рыба-вселенец ротан *Perccottus glenii*, в начале XX в. случайно интродуцированная в Европейскую Россию из бассейна р. Амур. Ротан способен колонизовать малые водоемы — лучшие места размножения местных амфибий. Влияние ротана на фауну гидробионтов изучали в ходе мониторинга 38 малых водоемов (сельские пруды, придорожные каналы, запруды), который проводили с 1994 г. Диета этой рыбы включает широкий спектр видов животных, принадлежащих ко

ко всем трофическим уровням. В малом водоеме практически все трофические цепи заканчиваются ротаном. Оказалось, что ротан также существенно снижает видовое разнообразие водных макробеспозвоночных и личинок амфибий. Это происходит потому, что, как правило, большинство видов амфибий: гребенчатый и обыкновенный тритоны (*Triturus cristatus*, *T. vulgaris*); травяная (*Rana temporaria*), остромордая (*R. arvalis*) и прудовая (*R. lessonae*) лягушки, а также золотой карась *Carassius carassius*, не могут успешно размножаться в прудах, населенных ротаном. Ротаны уничтожают относительно мелких взрослых обыкновенных тритонов и личинок обоих видов тритонов. Атакуя и кусая за конечности и хвост, ротаны способны нарушить нерестовое поведение относительно крупных гребенчатых тритонов, представляющее сложный комплекс движений, складывающихся в так называемый брачный танец. Хотя взрослые лягушки ежегодно посещают водоемы, населенные ротаном и откладывают икру, развивающиеся головастики в подавляющем числе случаев еще до выхода на сушу полностью выедаются ротаном. Учитывая безвозвратную потерю энергетических ресурсов лягушек, Ю.Б. Мантейфель предложил называть такие водоемы «черными дырами» метапопуляций.

В отличие от ситуации с остальными видами амфибий, в прудах, населенных ротаном, в течение многих лет наблюдали успешное размножение серой жабы *Bufo bufo*. При этом не было отмечено признаков угнетения популяций. Открытие этого феномена опровергло устоявшееся мнение, что после проникновения ротана в пруд исчезают все амфибии. Для выяснения причин устойчивости серой жабы к хищничеству ротана были проведены лабораторные эксперименты. Была обнаружена избирательность питания ротана головастиками обычных в Московской области видов бесхвостых амфибий. Ротаны активно потребляли всех схваченных головастиков травяной и остромордой лягушек, но съедали значительно меньшее количество головастиков серой жабы. Ротаны отвергали головастиков жабы после обработки в ротовой полости (в результате интраорального тестирования). При этом большинство головастиков оставались малоповрежденными. Таким образом, серая жаба способна беспрепятственно размножаться в водоемах, населенных ротаном: ее личинки обладают «химической защитой»: неприятным для ротана вкусом. Выявленная избирательность питания ротана меняет сложившееся представление о том, что ротан «ест все подряд».

Для сравнения в вышеизложенный эксперимент в качестве хищников были включены так-

же некоторые крупные беспозвоночные, населяющие малые водоемы. Пережевывающие схваченную добычу личинки стрекозы коромысла синего *Aeschna cyanea* также активно поедали почти всех схваченных головастиков остромордой лягушки и часто отвергали личинок серой жабы, но при этом существенно повреждали их. После отказа от поврежденного головастика жабы личинки стрекоз незамедлительно схватывали следующего головастика, уничтожая большое число особей. Высасывающие схваченную добычу личинки жука плавунца окаймленного *Dytiscus marginalis* одинаково интенсивно питались головастиками лягушки и жабы, не отвергая их. Итак, сниженное потребление головастиков серой жабы двумя избирательно питающимися хищниками может обеспечивать этим головастикам относительную защиту от одного из них (ротан) и не давать им преимущества при встречах с другим (личинка стрекозы). Защитная адаптация личинок серой жабы носит узконаправленный характер.

При дальнейшем анализе было поставлено под сомнение широко распространенное, переписываемое из книги в книгу утверждение, что ротан поедает икру амфибий. Эксперименты были проведены с рыбами, приученными брать корм с пинцета. За малым исключением ротаны отвергали схваченную икру амфибий (остромордой и травяной лягушек, серой жабы) так же, как это наблюдалось в экспериментах с малосъедобными головастиками серой жабы.

Для выяснения причин, по которым ротаны отказывались поедать схваченную икру амфибий, был поставлен эксперимент по выявлению защитной роли внешних оболочек (галерты) икринки лягушек. С этой целью рыбам были предложены как собранная в водоеме икра остромордой лягушки с разбухшими галертами, так и икра, взятая непосредственно из яичников самок. В противоположность икре, взятой из водоема (ее съели лишь частично 2 ротана из 20), все рыбы охотно поедали икру с неразбухшими оболочками. Этот опыт наглядно продемонстрировал защитную роль разбухшей галерты, препятствующей поедаемости эмбриона рыбой.

Наблюдения в природных условиях выявили, что успешное размножение отдельных видов амфибий из года в год происходит лишь в определенных водоемах. Для изучения особенностей этих водоемов проводили ежегодный экосистемный мониторинг, регистрируя более 50 биотических и абиотических характеристик водоемов. Для оценки ассоциированности (совместной встречаемости) видов амфибий и рыб использовали данные об их успешном размножении в соответствующих водоемах. По результатам

были выделены три основных типа группировок: 1) ротан + серая жаба; 2) гребенчатый тритон + обыкновенный тритон + прудовая лягушка; 3) остромордая лягушка. Для каждой группировки были перечислены характерные параметры водоемов, позволившие выделить водоемы I, II и III категорий соответственно. При анализе характеристик водоемов II категории отмечено сравнительно небольшое число отличий от водоемов I и III категорий, что отражает промежуточный («переходный») тип этой категории. Действительно, для многих признаков (например, глубина, стабильность, степень зарастания макрофитами, степень затененности, присутствие отмершей растительности в качестве донного субстрата, рН воды) средние значения для водоемов II категории располагаются между таковыми для двух других категорий. Сравнительный анализ этих характеристик позволяет утверждать, что выделенные три категории водоемов отражают последовательные стадии изменений типичного сельского копаного пруда. То есть при сукцессии водоем I категории превращается в водоем II категории, потом — в водоем III, а затем заболачивается и исчезает. Изменение видового состава амфибий и рыб в ходе сукцессии экосистемы малого водоема происходит от группировки первого типа к группировке третьего, причем внедрение ротана в глубокие, стабильные и наиболее благоприятные для размножения большинства амфибий водоемы I категории значительно обедняет видовой состав амфибий и ведет к исчезновению множества локальных популяций. Размножение лягушек и тритонов приурочено к временным водоемам II и III категорий, представляющих собой менее подходящие водоемы последних стадий сукцессии.

Для установления географических масштабов воздействия ротана на виды амфибий и пресноводные экосистемы в целом была проведена работа по выявлению его современного ареала. С этой целью было проведено анкетирование ученых европейских и ряда азиатских государств, проведены маршрутные экспедиции по малоизученным районам Западной и Восточной Сибири. Оказалось, что современный ареал ротана многократно превышает его исходный ареал в бассейне р. Амур. За пределами своего исходного ареала ротан был обнаружен в 14 (!) странах.

Таким образом, полевые и экспериментальные исследования позволили выявить особенности взаимодействий интродуцированной рыбы ротана и аборигенных видов амфибий, описать закономерности сукцессии пресноводных экосистем, обусловленные присутствием этой рыбы. Особенности биологии ротана, в настоя-

щее время относительно быстро распространяющегося в европейских странах, позволяют рассматривать его внедрение в экосистемы как мощный негативный фактор, ведущий к исчезновению множества локальных популяций амфибий. Дальнейшее распространение ротана несет угрозу целому ряду европейских видов амфибий. Учитывая значительную величину территорий, занятых к настоящему времени приобретенным (инвазийным) ареалом ротана, его неконтролируемое распространение можно отнести к глобальным факторам наряду с климатическими изменениями, трансформацией ландшафтов, урбанизацией территорий и т.п.

Подведем итоги

В различных районах Земли, в том числе в Европейской части России, сокращается численность популяций и снижается разнообразие видов амфибий. Сокращение популяций амфибий может происходить по самым различным причинам: от загрязнения локальных водоемов до климатических изменений и истончения озонового слоя Земли. Вероятные факторы, влияющие на состояние популяций амфибий, можно разделить на локальные и глобальные.

Весьма существенное влияние на популяции амфибий оказывает рыба-вселенец ротан *Percottus glenii* из семейства Odontobutidae, в начале XX в. случайно интродуцированная в Европейскую Россию из бассейна р. Амур. Эта рыба способна колонизовать малые водоемы — наиболее благоприятные места размножения местных амфибий. Полевые и экспериментальные исследования позволили выявить особенности взаимодействий интродуцированной рыбы ротана и аборигенных видов амфибий, описать закономерности сукцессии пресноводных экосистем, обусловленные присутствием этой рыбы. Особенности биологии ротана, в настоящее время относительно быстро распространяющегося в европейских странах, позволяют рассматривать его внедрение в экосистемы как мощный негативный фактор, ведущий к исчезновению множества локальных популяций амфибий. Дальнейшее распространение ротана несет угрозу целому ряду европейских видов амфибий. Учитывая значительную величину территорий, занятых к настоящему времени приобретенным (инвазийным) ареалом ротана, его неконтролируемое распространение можно отнести к глобальным факторам наряду с климатическими изменениями, трансформацией ландшафтов, урбанизацией территорий.

Гены и Чебурашки — генетика возникновения новых форм

Ю. Гольцев



Юрий Гольцев
11-й выпуск биокласса
(Петрашевы), школа
№ 520 (1989 г.), закончил
Физтех (1995 г.), к.б.н.,
научный сотрудник
Калифорнийского универ-
ситета, Беркли,
goltsev@berkeley.edu

Наука и общество

В середине прошлого века, и скорее даже в первой его половине, коренным образом изменилась структура финансирования многих прикладных областей естествознания, связанных прежде всего с военной промышленностью. Огромные средства, вложенные в создание центров физических и химических исследований, неожиданно эффективно оправдали себя. Новые виды вооружений — авиация, отравляющие газы, ядерные бомбы — были незамедлительно применены на практике, что привело к территориальному переустройству мира, общественного сознания и науки в том числе. Многие базовые, традиционно маргинальные с денежной точки зрения области пережили и до сих пор переживают небывалый расцвет, поднявшись на волне всеобщей веры, что развитие фундаментальной науки может быстро оправдать себя, как это было с атомной бомбой, вакцинацией и т.д. Вот, в сущности, история открытия генетического кода, структуры ДНК и появления новых смежных областей науки, которые стали изучать исконные вопросы медицины, физиологии и систематики с молекулярной точки зрения. Биология развития и, в частности, эволюция развития были в числе наук, «пересмотренных» с молекулярной точки зрения: каким образом гены управляют эмбриогенезом? какова динамика аллелей/ДНК последовательностей в популяции? и, наконец, как, на уровне ДНК, возникают новые признаки?

Ответы на эти вопросы важны не только с общенаучной точки зрения. Устранение физического неравенства и боли, продление жизни и

борьба с болезнями — вот одни из спорных целей науки, по крайней мере, с общественной точки зрения. Наша цивилизация вплотную подошла к решению этих задач генетическим способом — исправлению плохих копий генов и внесению генетического материала, способствующего борьбе с болезнями. Один пример — повсеместно распространенные трансгенные растения, несущие гены инсектицидов и устойчивости к заболеваниям. Другой и совсем недавний — создание гипоаллергенной кошки посредством модификации генов, кодирующих аллергенную компоненту шерсти. Применение подобных технологий не всегда удачно. Один из вариантов невирусного иммунодефицита — неизлечимая болезнь SCID-X1 — связана с мутацией гена, ответственного за созревание определенного типа лимфоцитов. Лекарственная или спонтанная коррекция этого синдрома невозможна. Сравнительно недавно был успешно опробован генно-терапевтический способ. Клетки-предшественники, взятые у пациента, заражались ретровирусом, встраивающимся в ДНК и несущим правильную копию гена. Затем эти клетки реинъецировались больному и впоследствии наблюдалось восстановление нормального состава иммунной системы, а главное — дифференцированных лимфоцитов. В одном из многих случаев, когда иммунная система больного была восстановлена, он тем не менее умер от рака крови. Оказалось, что ретровирус встроился и разрушил антираковый ген. Каким образом вносить сбалансированные изменения в генотип? Почему природа может, а мы — нет? Как создавать новые признаки по своему желанию? В конце концов, почему мухи разносят болезни, а сами не болеют?

Генетика и семантика

Однако, есть аспекты более интересные, нежели затронутые в приведенной выше поверхностной аргументации. Вопрос семантического значения гена: есть ли определенная роль у конкретного гена? Насколько роль зависит от контекста? Подавляющее число современных биохимических исследований задаются

вопросом: какова роль/функция того или иного гена? Если биохимик говорит, что данный ген блокирует некую биохимическую реакцию, вызываемую раковым белком, то врач или физиолог идет и проверяет, насколько данный ген способен блокировать образование опухоли. Если же затем биохимик утверждает, что вообще-то данный белок активирует некий третий ген, который вызывает рак, то теперь врач, мало что понимающий в биохимии, рассматривает наш ген в качестве активатора рака. Таким образом, в зависимости от ролевого ярлыка, приклеенного на ген, его изучение будет двигаться в том или ином направлении. По мере усложнения организмов геномы пополняются новыми генами, несущими новые функции, в то же время старые гены, продолжая играть прежнюю роль, берут на себя новые обязанности, совмещая таким образом несколько функций. Понять, какова роль гена, как устроен ген и почему именно так, а не иначе, можно лишь рассмотрев развитие гена в историческом аспекте. Есть ли унифицированные законы эволюции генов? Можем ли мы использовать их в создании новых генов по собственному усмотрению?

Какие вопросы решает данная область науки

Итак, как уже замечено выше, эволюция развития изучает изменение генов по мере возникновения новых признаков. Где и как записано в ДНК, что у одного человека нос длиннее, а у другого короче; у двукрылых насекомых два крыла, а у бабочек — четыре? Если серьезно, то в целом в данной области можно выделить два направления.

Первое в качестве материала берет признаки (скорее, частные аспекты развития или даже отдельные гены), детально изученные с молекулярной и физиологической точек зрения. Наибольший интерес для данного направления представляет реконструкция во временной шкале изменений гена, приведших к возникновению новых признаков, а также установление факторов, благоприятствующих фиксации этих модификаций. Интересно, что одной из наиболее оптимальных моделей для данной области служит ситуация, когда признак не меняется вообще, а гены претерпевают взаимокompенсирующие модификации (так называемая нейтральная селекция).

Второе направление в качестве начальных данных рассматривает достаточно хорошо изученное событие развития, по-разному выраженное в двух организмах. Детальное знание

генетики процесса в первом «исходном» организме облегчает идентификацию генетической составляющей, лежащей в основе различия по изучаемому признаку, наблюдаемому во втором организме. Таким образом, окончательной целью является а) идентификация генетических различий, приводящих к морфологической разнице; б) доказательство достаточности найденной генетической разницы для реконструкции, пусть даже частичной, элементов, присущих одному организму — в другом. В этой статье мы в основном будем рассматривать второй сценарий. Решение подобных задач лежит на пути к внесению в человеческий или иной организм новых «улучшающих» признаков по нашему усмотрению.

Для рассмотрения подобных задач:

1. Необходим модельный организм, и не один, а два или больше — для установления сравнительной системы.
2. Модельные организмы должны содержать легко отличимые признаки (собственно то, что мы будем изучать).
3. Механизм или, по крайней мере, физиология развития исследуемого признака в обоих организмах должны быть хорошо установлены (иначе прежде придется устанавливать материал для сравнения)
4. Геномная ДНК обоих организмов должна быть отсеквенирована, т.е. известна ее полная последовательность.
5. Организмы не должны отстоять слишком далеко друг от друга на эволюционном древе, наша задача — найти наименьший генетический комплемент, соответствующий возникновению нового признака или фенотипической разнице, поэтому нас интересуют организмы, максимально близкие друг к другу по ДНК, но в то же время анатомически разные.

Найти подобные два организма непросто. Во-первых, исторически, эмбриология стремилась выработать унифицированный язык, подходящий для описания развития в любом организме, и вследствие этого фенотипически разный эмбриогенез зачастую описывается одинаково для филогенетически близких животных. Во-вторых, лишь недавно появилась возможность секвенировать целые геномы и даже теперь количество «отсеквенированных» организмов ограничено.

Тем не менее на данный момент уже выработан определенный консенсус относительно типов молекулярно-эволюционных задач и типов сравнительных систем, подходящих для их решения. Так, например, для изучения нейтральной селекции и выделения консервативных, а следовательно, и функционально важных элементов

ДНК используется выборка родственных видов из насекомых семейства *Drosophilidae*. Раннее развитие мух данного семейства практически не содержит различий, по крайней мере — в рамках некоторых процессов, генетика которых хорошо изучена. Подобный же анализ применяется к «секвенированным» позвоночным животным (человек, крыса, мышь, рыбка-зебра). Он позволяет идентифицировать законсервированные элементы ДНК, не меняющиеся между этими организмами. Существует мнение, что подобная консервация — признак функциональной значимости ДНК-элементов.

В своей работе я использую сравнительный анализ развития зародышей плодовой мухи *Drosophila melanogaster* и малярийного комара *Anopheles gambiae*. Меня интересует следующий вопрос: каким образом изменение морфологии развития животных отражено в ДНК? Можно ли превратить одно животное в другое путем нескольких генетических модификаций? Каковы законы эволюции генетических сетей, ответственных за формирование?

Филогенетический метод и реконструкция истории развития вида

Прежде всего введем несколько понятий, важных для чтения этой статьи. Эволюционный взгляд на биологическое формирование предполагает постепенное возникновение жизни на Земле. Грубо говоря, исторически, каждый момент был представлен в природе определенным разнообразием видов, часть из которых вымирала, а часть служила предшественниками новых видов. Одной из проблем эволюционной биологии является то, что достоверно можно судить лишь о видовом многообразии, существующем на данный момент. Все, что касается прошлого, — область более или менее достоверных гипотез. Как же реконструировать историю возникновения нового вида (или, что то же самое, — нового признака или органа), не имея исторического материала? Используется филогенетический метод. Он состоит в том, что история возникновения вида реконструируется по присутствию в современной фауне признаков, присущих этому виду. Представим себе лежащие на столе пустую тетрадь, заполненную тетрадь, толстую книгу, глянецовый журнал, ежедневник и электронную записную книжку. Все эти предметы, изготовленные в наше время, служат для передачи информации, как правило, в форме слов. Большинство из них сделано из бумаги и вследствие этого имеет одинаковую структуру. Исходя из преобладания в нашей комнате книг над

электроникой, можно предположить, что электронная записная книжка — сравнительно недавнее изобретение. Остальные вещи различаются количеством страниц, но, тем не менее, состоят из них. Из этого можно сделать вывод, что когда-то предшественником этих изделий была книга всего из одной страницы, а переплет — позднейшее изобретение. Двигаясь в подобном ключе, можно также прийти к выводу, что еще более древним предшественником этих изделий является источник целлюлозы, т.е. древесина. В этой статье мы рассмотрим эмбриогенез комара и мухи и, в частности, развитие так называемых *экстраэмбриональных мембран*. У комара их две (амнион и сероза), а у мухи одна (амниосероза). Практически у всех насекомых, кроме небольшого подотряда двукрылых, две мембраны — как у комара. Это позволяет нам предположить, что предшественник современных мух имел две экстраэмбриональные мембраны, и комар является моделью этого предшественника.

Как работает ген?

Несмотря на то, что продукция белка составляет основной результат экспрессии гена, лишь малая его часть участвует в кодировании белка. Этот участок находится внутри зоны, покрытой непрерывной чередующейся последовательностью экзонов и интронов. Интроны удаляются из конечной «кодирующей РНК», а экзоны сшиваются вместе.

Значительная часть гена не транскрибируется в РНК, а содержит компактные зоны, содержащие участки (сайты) связывания транскрипционных факторов (обычно это белки). Эти зоны называются энхансерами. Чем лучше сайты в энхансере, тем сильнее связывание транскрипционного фактора, тем более чувствителен ген к низким концентрациям активаторов (транскрипционных факторов, усиливающих продукцию РНК) или репрессоров (белков, блокирующих продукцию РНК).

На рисунке 1 показан ранний эмбрион мухи, покрашенный специальным образом для детекции РНК гена *eve*. Вторая полоса *eve* задектирована отдельно с помощью синего красителя. Ниже приведена диаграмма гена *eve*, в которой начало транскрибируемой области *eve* показано стрелкой, а конец — нуклеотидной последовательностью конца последнего экзона. Регуляторные участки (энхансеры) обозначены подписанными четырехугольниками. Цифры внутри обозначают номера полос, регулируемых данным энхансером.

Под диаграммой гена размещена диаграмма регуляторного участка, управляющего экспрессией второй полосы. Ниже приведен небольшой фрагмент этого участка и показаны нуклеотиды, вовлеченные в связывание конкретных транскрипционных факторов.

Чем родственнее два организма, тем меньше отличий в последовательности ДНК конкретного гена в обоих геномах (копии одного гена в разных геномах называются ортологами — например, мышиная ДНК-полимераза является ортологом человеческой). Исследования показали, что некодирующие участки ортологичных генов содержат больше отличий, чем кодирующие. Необходимость «удерживать» последовательность белка от мутаций препятствует их накоплению в кодирующих областях. Таким образом, некодирующие участки гена (содержащие энхансеры и другие регуляторные элементы) значительно более пластичны с эволюционной точки зрения. На данный момент преобладает мнение, что формообразование и модификация признаков в первую очередь происходят за счет разницы в некодирующей ДНК. В этой статье рассмотрен подобный пример.

Эмбриогенез насекомых. Генетические сети

Яйца насекомых являются удобной эмбриологической моделью. Во-первых, в силу сравнительной легкости поддержания колонии насекомых и сбором яиц, во-вторых, в связи с относительно быстрыми темпами развития: у плодовых мух — 24 ч от оплодотворения ооцита до вылупления личинки.

Небольшие размеры допускают легкое изготовление срезов, а также зачастую позволяют уместить целый эмбрион в поле зрения микроскопа. Создание описательной базы по раннему развитию насекомых шло по мере развития методов микроскопии. С первой половины XX века применение физиологических методов (перезимания яиц, трансплантации цитоплазмы из разных частей ооцита, трансплантации фрагментов эмбриона) позволило установить наличие эмбриональных центров, производящих растворимые факторы, определяющие судьбу клеток в зоне их действия. Однако истинным прорывом стало применение технологии мутационного скрининга (выработанной на бактериях и дрожжах к 60–70 гг. XX века) к изучению генетики развития плодовых мух *Drosophila melanogaster*. К моменту проведения этих экспериментов было понятно, что гены являются фундаментальной единицей биохимических процессов, ответст-

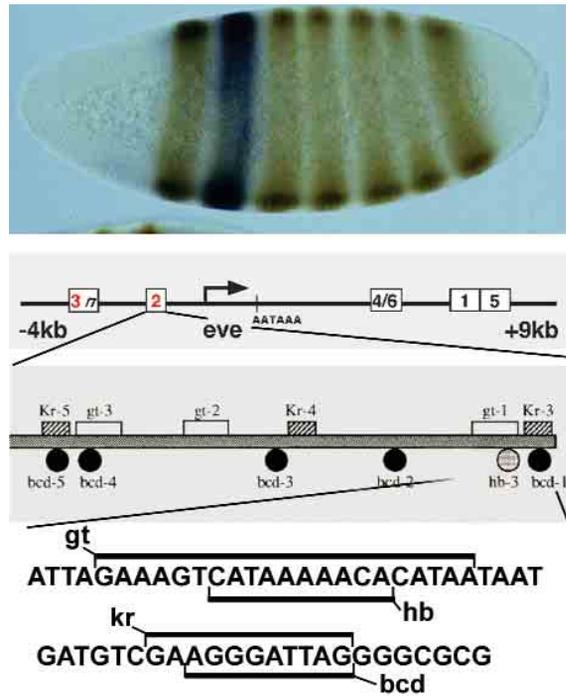


Рисунок 1. Экспрессия гена *eve* в раннем эмбрионе мухи (пояснения в тексте).

венной за отдельный признак в наиболее примитивных случаях. Однако считалось что глобальные признаки (определение эмбриональных осей развития: антеро-каудальной (между головой и хвостом) и дорсо-вентральной (т.е. спинно-брюшной); детерминация типа и числа сегментов; пространственная спецификация конечностей и т.д.) являются полигенными и едва ли будут расшифрованы в ближайшие десятилетия. К удивлению исследователей, в первых же скринингах были получены мутантные мухи, производящие эмбрионы, целиком вентрализованные, дорсализованные, потерявшие строго определенный сегмент или группу конечностей.

На рисунке 2 в верхней панели показаны некоторые последовательные стадии эмбриогенеза плодовой мухи. На всех иллюстрациях в этой статье эмбрионы показаны так, что головной отдел находится слева, а хвостовой — справа. Фотографии сделаны с помощью сканирующей электронной микроскопии. На нижней панели — эмбрион мухи, мутантной по гену *bcd*. Заметно, что головной отдел (слева) копирует морфологию хвостового отдела.

Таким образом, были идентифицированы несколько иерархических групп взаимосвязанных генов, ответственных за раннюю пространственную разбивку эмбриона. По большей части эти гены кодируют транскрипционные факторы. Внутри группы гены нижнего уровня являются мишенью для активации или ингибирования

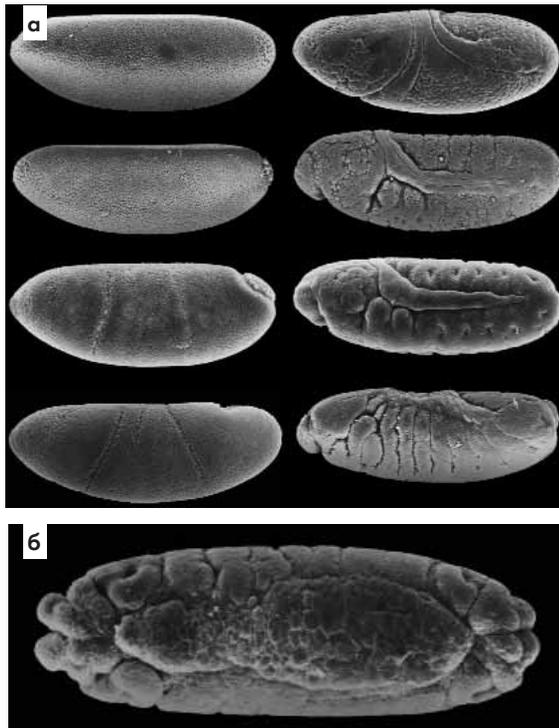


Рисунок 2. (а) — стадии эмбриогенеза мухи (дикий тип); (б) — эмбрион мухи, мутантный по гену *bcd*.

генами, стоящими выше по иерархии. Такая структура групп напоминает компьютерную или нейронную сеть, и далее мы будем называть ее генной сетью. В этой статье я расскажу о вариациях между видами и эволюции двух таких сетей: дорсо-вентральной и антеро-каудальной.

Рассмотрим вкратце генную сеть, управляющую антеро-каудальной разбивкой (рисунок 3). В случае фруктовой мухи исходными элементами этой сети являются гены *bcd* и *nos*. РНК этих генов размещается материнским организмом соответственно в головном и хвостовом отделе яйца. РНК другого важного гена *cad* равномерно распределена по яйцу. Белковый продукт, синтезирующийся с РНК гена *bcd* (транскрипционный фактор BCD), распределен в виде градиента от головы к хвосту по раннему эмбриону. BCD обладает свойством достаточно необычным для транскрипционного фактора — он способен ингибировать трансляцию белка CAD с РНК гена *cad*. Таким образом создается противоположный BCD градиент CAD, исходящий из хвостового отдела яйца. BCD активирует в головном отделе эмбриона экспрессию гена *hb*, которая убывает по мере истощения количества BCD в градиенте. Кроме того, BCD активирует в головном отделе эмбриона экспрессию гена *gt*, которая убывает быстрее, чем *hb*, потому что регуляторная ДНК *gt* менее чувствительна к низким концентрациям *bcd*, чем энхансер *hb* (рисунок 4, заимствовано у

Д.Папаценко — выпуск 1984 г., Терапсиды). В заднем отделе эмбриона *hb* активируется градиентом CAD. *Gt* тоже экспрессируется в хвостовом (каудальном) отделе, причем его зона экспрессии находится впереди зоны *hb*. Механизмы репрессии *hb* и *gt* в полярных отсеках переднего и заднего отделов эмбриона известны, но не будут обсуждаться в этой статье. Ген *Kr* активируется BCD и одновременно ингибируется HB (см. рисунок 4). Регуляторные последовательности (enhancer — энхансер) этого гена более чувствительны к низким концентрациям BCD, нежели энхансер *hb*, поэтому область его экспрессии простирается далее области, занятой HB. Вследствие ингибирования в головном отделе создается характерная колоколообразная зона экспрессии гена *Kr*. Аналогичные механизмы с CAD активатором вместо BCD вовлечены в образование колоколообразного домена экспрессии гена *kni*. Гены *hb*, *Kr*, *kni* в совокупности называются GAP-генами (*gap* — в переводе — пробел). Гены называются так потому, что в случае мутации личинка мухи теряет сегменты, расположенные в зоне нормальной экспрессии GAP-гена.

Сегментация эмбриона является кульминационной ступенью в раннем развитии насекомых. Более того, несмотря на большие различия в предшествующих и последующих стадиях, она наблюдается у всех членистоногих (Arthropoda) и у кольчатых червей (Annelida). Подобные стадии развития называются филотипическими. На

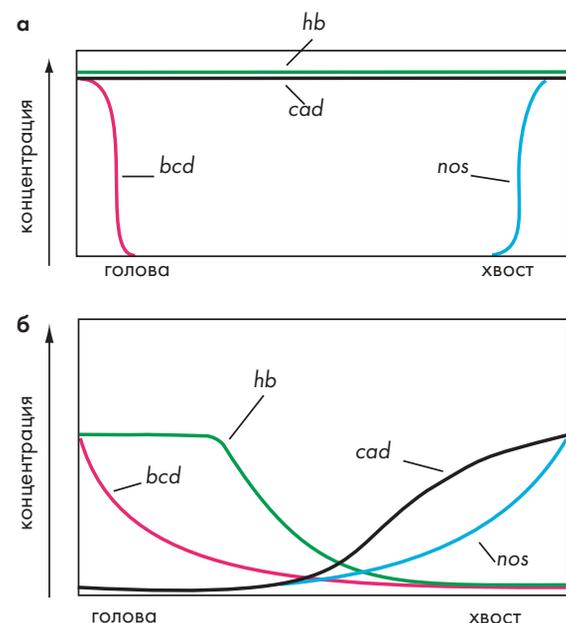


Рисунок 3. Генная сеть, управляющая антеро-каудальной разбивкой.

(а) — распределение РНК генов *hb*, *cad*, *bcd* и *nos* в ооците; (б) — распределение соответствующих белков в раннем эмбрионе.

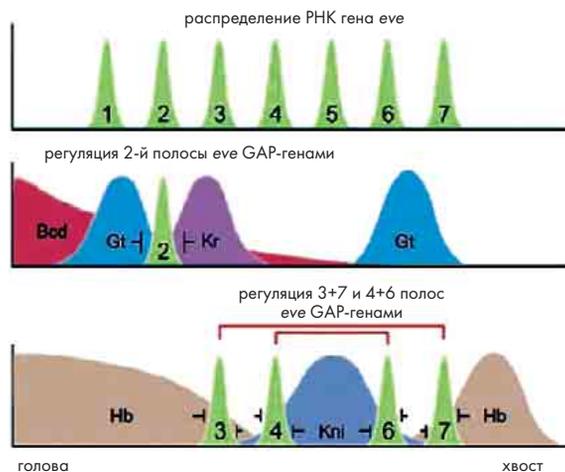


Рисунок 4. Регуляция гена *eve* GAP-генами (пояснения в тексте).

генетическом уровне повторяющиеся сегменты возникают вследствие повторной экспрессии определенных генов вдоль антеро-каудальной оси эмбриона. Примером может служить начальная экспрессия мушиного гена *eve* в каждом четном сегменте зародыша.

Экспрессия генов сегментации, таких как *eve*, непосредственно регулируется GAP-генами. Более того, фактически каждой полоске экспрессии соответствует свой регуляторный элемент, независимо позиционирующий этот домен в эмбрионе. Рассмотрим механизм установления семи полосок экспрессии гена *eve*. Как правило, узкие окончателные зоны экспрессии гена «вырезаются» репрессорами из более широких доменов действия активаторов. Итак (см. рисунок 4), вторая полоска — активатор *bcd*, репрессоры *Kr* и *gt*; третья и седьмая полоски — активатор неизвестен (по всей видимости, он равномерно распределен по всему эмбриону), репрессоры *hb* и *kni*; четвертая и шестая полоски — активатор неизвестен (по всей видимости равномерно распределен по всему эмбриону), репрессоры тоже *hb* и *kni*.

Похожие и разные стадии в развитии плодовых мух и малярийного комара

На первый взгляд личинки комара и мухи сильно различаются (рисунок 5). Это неудивительно: на стадии личинки комар — водное насекомое, в связи с этим ему необходимы специальные органы дыхания. Кроме того, личинка комара обладает специальным челюстным аппаратом. Личинка плодовой мухи обитает в гниющих фруктах. Ее строение (короткие щетинки на кутикулярной оболочке) оптимально

для облегчения ввинчивания в мякоть плодов. Однако с эмбриологической точки зрения зародыши обоих насекомых практически неразличимы — они содержат одинаковый набор органов и проходят через идентичные ступени развития.

Рассмотрим первые, самые ранние, стадии эмбриогенеза. Вначале оплодотворенное яйцо представляет собой одну гигантскую клетку, заполненную питательным желтком. Первые 14 ядерных делений происходят без дробления ооцита. Ядра выстраиваются по периферии клетки, образуя так называемый ядерный бластодерм. После 14-го деления клеточные мембраны стремительно прорастают между ядрами, разделяя их на индивидуальные клетки. Эта стадия называется *клеточный бластодерм* (рисунок 6, панель 1). Особенность эмбриогенеза насекомых отряда двукрылых (Diptera) состоит в том, что на стадии клеточного бластодерма практически завершена клеточная спецификация и территориально представлены фактически все будущие органы личинки. Иначе говоря, можно предсказать, предшественником или частью какого будущего органа является та или иная клетка. Следующая стадия характеризуется морфологическим обособлением так называемой эмбриональной пластинки. Клеточная бластодерма сдвигается в вентральном (брюшном) направлении, таким образом вентральные клетки (предшественники мезодермы, образующей внутренние органы) приобретают колоннообразную форму (вытянутую по вертикальной оси), а дорсальные клетки уплощаются (рисунок 6, панель 2). Интересно, что дорсальные (спинные) клетки и их потомки не будут представлены в личинке. Дорсальные клетки образуют так называемые экстраэмбриональные мембраны, клетки которых отмирают на завершающих стадиях эмбриогенеза. Напротив латерально-вентральные (боковые и брюшные) клетки являются предшественниками всех органов личинки.

Таким образом, континуум клеток-предшественников личинки не замкнут с дорсальной стороны, что и позволяет говорить о так называемой эмбриональной пластинке.

На следующей стадии начинается рост-вытяжение эмбриональной пластинки (рисунок 6, панели 2, 3, 4). До сих пор развитие эмбрионов



Рисунок 5. Личинки мухи и комара выглядят по-разному.

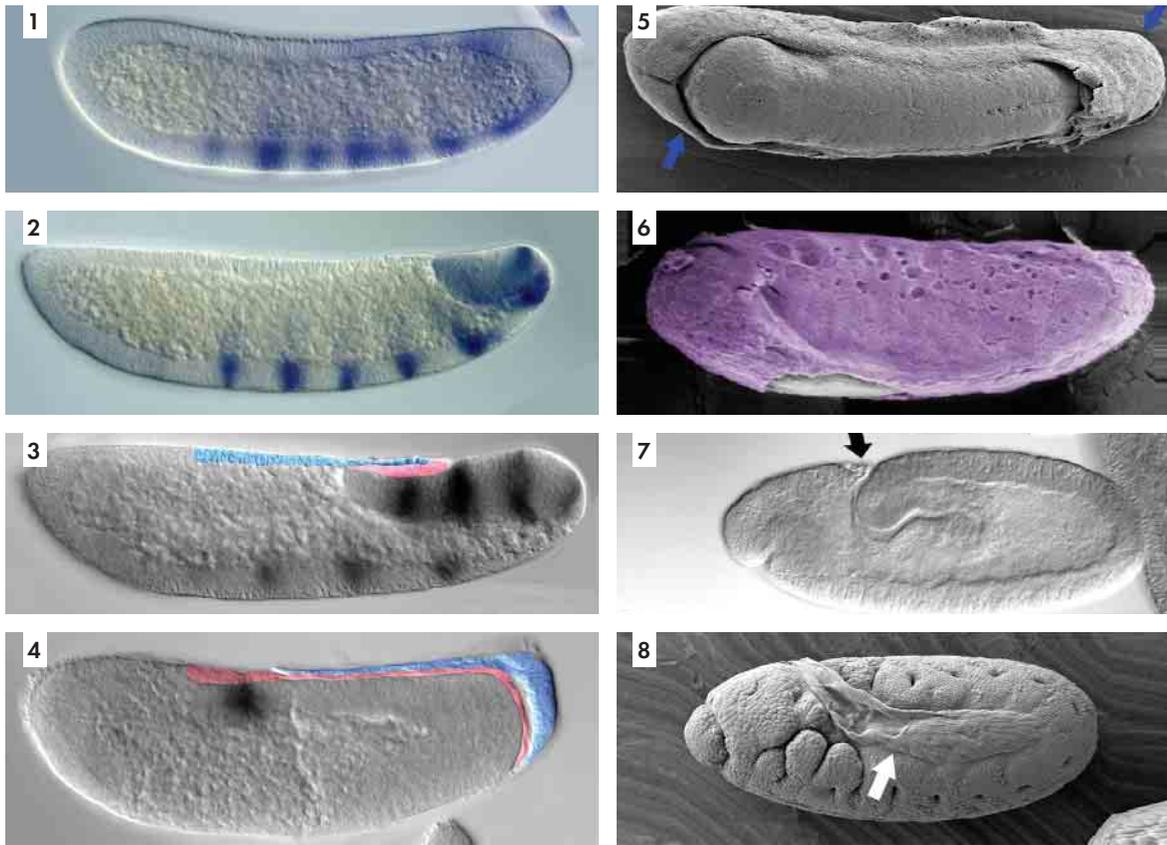


Рисунок 6. Движение эмбриональной пластинки и образование экстраэмбриональных мембран в зародышах мухи и комара (пояснения в тексте).

комара и мухи происходило одинаково, но на этой стадии наиболее наглядно проявится разница. В случае мушиного зародыша эмбриональная пластинка растет, огибая задний полюс яйца. По мере роста она сминает дорсальные клетки (рисунок 6, панель 7, стрелкой показаны сдавленные клетки экстраэмбриональной мембраны, амниосерозы; панель 8 — сканирующая электронная микроскопия той же стадии). В случае комара эмбриональная пластинка не сминает дорсальные клетки, но, напротив, проползает под ними (рисунок 6, панели 2, 3, 4, на панелях 3 и 4 экстраэмбриональные мембраны обозначены голубым — сероза и розовым — амнион). Таким образом, создается зачаток трехслойной структуры. Нижний слой — эмбриональная пластинка, промежуточный слой экстраэмбриональных клеток, который называется амнионом, и внешний (верхний) — сероза. Амнион начинает мигрировать по поверхности эмбриональной пластинки и растягивает вокруг нее серозу (рисунок 6, панели 5 и 6 — две последовательные стадии инкапсуляции эмбриона серозой; на панели 6 сероза обозначена розовым; миграция амниона в головном отделе не видна на панели 4 в силу проблемной фиксации). В итоге эмбрион кома-

ра, как и практически всех остальных насекомых, кроме «высших двукрылых», оказывается внутри серозного мешка. Такая структура очень важна для развития насекомых, особенно тех, чьи яйца должны переживать период засухи (яйца многих видов комаров устойчивы к высыханию). Дополнительная хитинсодержащая оболочка, секретируемая серозой, предохраняет эмбрион от высыхания. Мушинные эмбрионы не используют этот механизм.

Различия генетических сетей управляющих антеро-каудальной разметкой

Таким образом, с анатомической точки зрения развитие мушиного и комариного эмбриона по антеро-каудальной оси происходит одинаково, однако в процессах происходящих вдоль дорсо-вентральной оси наблюдается существенная разница. Есть ли отличия в структуре генетических сетей, управляющих пространственной разбивкой эмбриона по этим осям? Для ответа на этот вопрос мы решили исследовать экспрессию генов, ответственных за эмбриогенез, в зародышах мухи и комара. Для локализации экспрес-

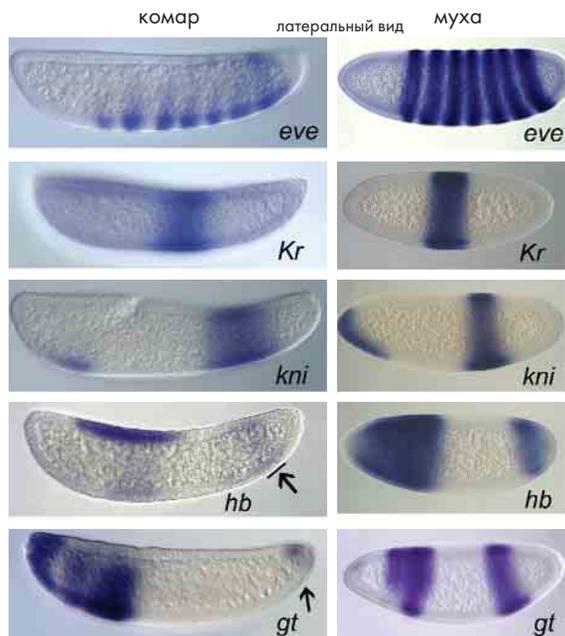


Рисунок 7. Экспрессия генов антеро-каудальной разметки в эмбрионах мухи и комара (пояснения в тексте).

сии использовали химически меченые анти-комплементарные пробы к РНК интересующих нас генов. Ген регулятор сегментации *eve* выглядит одинаково в мушином и комарином зародыше, что соответствует филогенетичности этой стадии у насекомых и членистоногих в целом (рисунок 7). GAP-гены *Kr* и *kni*, регулирующие независимую экспрессию разных полосок *eve*, тоже занимают сравнительно похожие домены. Расположение головных доменов *hb* и *gt* также одинаково. Однако в то время, как у мухи задняя полоска *hb* расположена позади каудального домена *gt*, у комара все наоборот: каудальный домен *gt* расположен позади каудального домена *hb*. Эта, казалось бы, незначительная разница имела бы катастрофические последствия для развития комара, если бы регуляция экспрессии *eve* осуществлялась так же, как у мухи. Дело в том, что шестая и седьмая полоски *eve* у мухи расположены между зонами экспрессии репрессоров *kni* и *hb* (рисунок 8). У комара задние полоски *kni* и *hb* (генов, ингибирующих экспрессию *eve*) оказываются столь близко друг к другу, что поместить даже одну полоску между ними невозможно. По всей видимости, экспрессия шестой и седьмой полоски *eve* у комара регулируется комбинацией *kni* и *gt*. Как уже было замечено выше, у мухи третья и седьмая полоски регулируются одновременно одним энхансером. Аналогично, четвертая и шестая полоски тоже регулируются совместно одним регуляторным элементом. Судя по одинаковому расположению доменов

экспрессии GAP-генов в передней части зародыша, регуляция третьей и четвертой полоски *eve* у мухи и комара не различается. Однако механизмы установления шестой и седьмой полосок различны. Следовательно, у комара есть дополнительные независимые регуляторные элементы (энхансеры), регулирующие шестую и седьмую полоски. То есть у комара в два раза больше энхансеров *eve*, чем у мухи. Плодовая муха — значительно более динамичный организм, чем комар. Мухи откладывают больше яиц и развиваются значительно быстрее. Очевидно, что редукция и оптимизация регуляторных элементов у мухи суть проявления более динамичного жизненного цикла. В данном случае различия в архитектуре генетической сети регуляции гена *eve* не приводят к изменению картины распределения продукта гена в эмбрионе. То есть осуществляется компенсаторная, нейтральная селекция гена, не приводящая к изменениям в морфологии филогенетической стадии. Вопрос — можно ли предсказать альтернативные формы генетических сетей, исходя из знания одного из вариантов? Как происходит компенсаторная эволюция в историческом плане?

Различия генетических сетей управляющих дорсо-вентральной разметкой

Противоположный сценарий реализуется вдоль дорсо-вентральной оси. Основой данного элемента разбивки является внутриядерный градиент транскрипционного фактора DL, который в зависимости от контекста может быть как активатором, так и репрессором (рисунок 9, DL обозначен красным цветом). DL (не путать с белком Delta) активирует серию генов вдоль дорсо-вентральной оси. Чем более чувствителен энхансер гена к белку DL, тем выше расположена зона его экспрессии. Другим кардинальным элементом данной генетической сети является

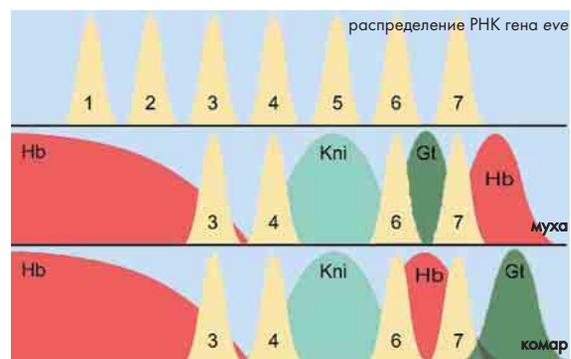


Рисунок 8. Регуляция гена *eve* в эмбриогенезе мухи и комара.

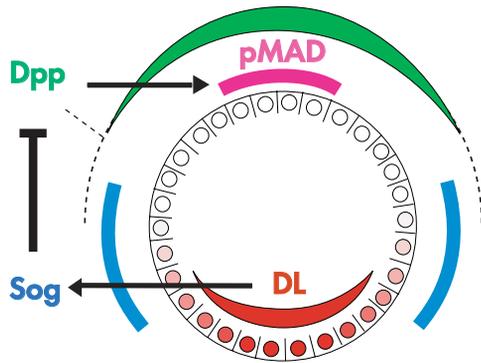


Рисунок 9. Экспрессия генов дорсо-вентральной разметки в эмбрионе мухи (пояснения в тексте).

ген *dpp*. Он кодирует внеклеточный белок, экспрессия которого ингибируется DL (рисунок 9, DPP обозначен зеленым цветом). DPP диффундирует в вентральном направлении и включает в клетках транскрипционный фактор MAD (pMAD — в активной форме), который активирует гены в дорсальной части зародыша. Мушиный *sog* — один из наиболее чувствительных к DL генов (его энхансер содержит очень сильные сайты связывания DL). Зона экспрессии *sog* расположена в латеральной части эмбриона мухи. В вентральных клетках мушиного эмбриона экспрессия *sog* ингибируется DL-зависимым репрессором *sna* (не показан на рисунке). В то время как DPP присутствует во всей дорсо-латеральной зоне эмбриона, DPP-зависимый транскрипционный фактор MAD включается лишь вдоль узкой полоски наиболее дорсальных клеток-предшественников экстраэмбриональных мембран. Ограничение действия DPP вдоль дорсо-вентральной оси происходит за счет того, что белок Sog связывается с ним и блокирует его действие. Таким образом, умозрительно можно предсказать, что чем выше зона экспрессии *sog*, тем уже полоска pMAD (зона действия *dpp*). Так почему же у комара — две экстраэмбриональные мембраны, а у мухи — одна редуцированная? Ответ на этот вопрос дает анализ экспрессии генов на стадии бластодермы.

И у комара, и у мухи часть дорсальных генов, таких как *zen* и *hnt*, одинаково экспрессируются в дорсальном эпителии (рисунок 10, зона предшественников серозы комара обведена красным). Однако другие гены, такие как *tup* и *doc*, образуют петлеобразный рисунок (репрессия в наиболее дорсальном эпителии — предшественнике серозы), отличный от мушиного (рисунок 10). Более того, гены *hb* (рисунок 7) и *emc* (рисунок 10), традиционно детектируемые в головном отделе эмбриона мухи, экспрессиру-

ются в дорсальном эпителии комара как раз там, где наблюдается репрессия *tup* и *doc* (см. рисунок 10). Наконец, самым значительным отличием является то, что у комара *sog* экспрессируется в вентральных клетках эмбриона, а не в латеральной зоне, как у мухи (рисунок 11a). Сдвиг зоны экспрессии *sog*, как уже сказано ранее, должен вызывать расширение зоны активности *dpp*. Это подтверждается специальной покраской, детектирующей активную форму MAD (рисунок 10). Таким образом, зона спецификации экстраэмбриональных мембран у комара значительно шире, чем у мухи. Шире настолько, что в этой зоне уместаются два типа клеток вместо одного. Расхождение клеточных типов дорсальной области эмбриона комара на предшественников амниона и серозы, по всей видимости, происходит за счет привлечения репрессорной активности *hb* (рисунок 7) или *emc* (рисунок 10).

Почему у комара происходит смещение активности гена *sog* к брюшной стороне? Путем компьютерного анализа мы изолировали участок *sog* комара, ответственный за экспрессию гена в вентральной области. Трансгенные мухи, несущие репортерный (т.е. маркерный) ген *LacZ* под контролем комариного энхансера *sog*, экспрессируют этот ген в вентральной области эмбриона мухи (рисунок 11б). Оказывается, сайты связывания *dl* в комарином энхансере значительно хуже, чем в мушином. Кроме того, комариный энхансер, в отличие от мушиного, не содержит сайтов связывания репрессора *sna*, — что позволяет ему работать в вентральной области. Суммируем (рисунок 12), как происходит

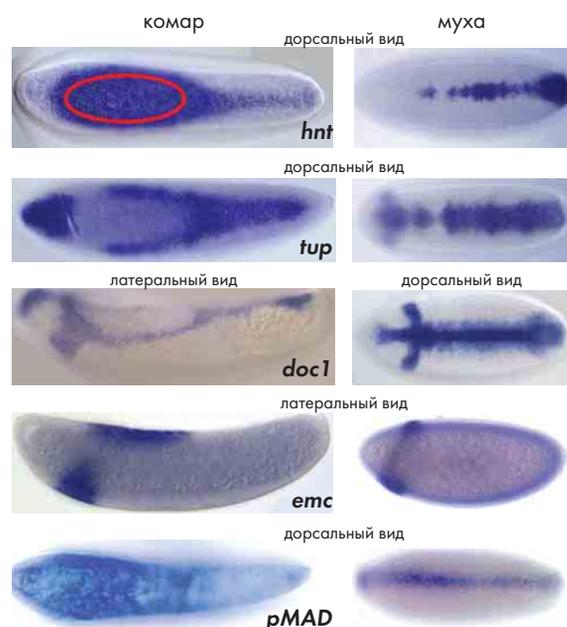


Рисунок 10. Экспрессия генов дорсо-вентральной разметки в эмбрионах мухи и комара. Пояснения в тексте.

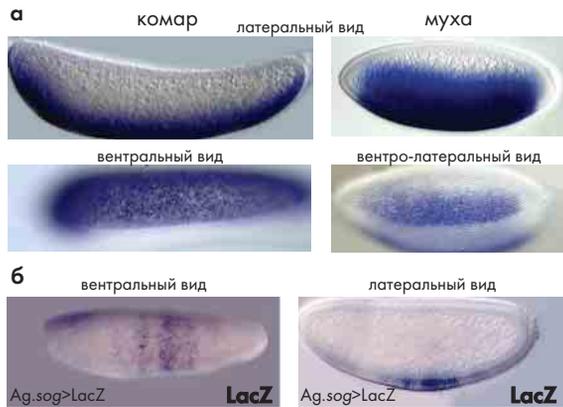


Рисунок 11. (а) — Экспрессия гена *sog* в эмбрионах мухи и комара. (б) — Экспрессия гена репортера под контролем комариного энхансера гена *sog* в эмбрионах трансгенной мухи.

редукция двух типов ткани у комара к одному у мухи. По нашим данным, этот процесс — двух-компонентный если не в историческом, то по крайней мере в механистическом аспекте. Во-первых, наблюдается эволюция энхансера *sog* у мухи — дрософилиные сайты связывания *dl* лучше комариных, и вследствие этого уровень экспрессии *sog* у мухи «выше» комариного. При увеличении зоны экспрессии *sog* уменьшается зона активности *dpp*, который определяет участок эмбриона, дифференцирующийся в экстраэмбриональную ткань. Зона *dpp* активности у мухи слишком мала для дифференциации двух типов тканей (как у комара). По-видимому, вследствие потери дорсальной экспрессии *hb* и *etc* происходит слияние двух типов клеток (как у комара) в один (у мухи). Таким образом, мы проследили эволюцию новой ткани от морфологии до генетики.

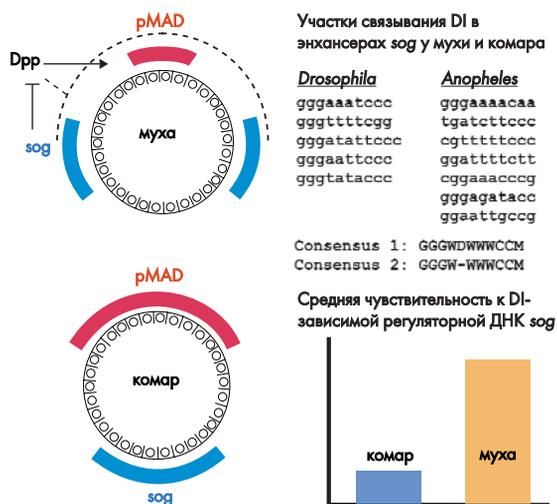


Рисунок 12. Как происходит редукция двух типов ткани у комара к одному у мухи.

Куда же нам плыть?

Что существует вначале — вопросы, на которые хочется ответить, или же материал для исследований? Трудно представить себе первобытного человека, вышедшего из пещеры, взглянувшего на небо и немедленно задавшего целью построить звездолет, да не простой, а чтоб непременно летал быстрее света. Хотя бы по той причине, что во многих культурах звезды считались светильниками, закрепленными на голубой сфере, не говоря уже о представлении о природе света. Таким образом, научный материал сам по мере изучения предоставляет ученому вопросы, и в этом плане роль науки весьма пассивна.

Тем не менее... Можно ли, сдвинув вентрально мушиный *sog*, воссоздать двухслойную структуру экстраэмбриональных мембран в мухе? Как работает энхансер *sog* у других насекомых? Можно ли, применив филогенетический метод, восстановить историю развития этого генетического элемента? Исходя из восстановленной истории, можно ли составить некоторое представление об экологических силах, вызвавших эти генетические изменения?

Эти и многие другие вопросы... скорее всего отпадут в ходе исследований за ненадобностью, поскольку они — всего лишь светильники на небосводе. Содержание этих вопросов вызвано не научным материалом, а лишь нашим представлением о нем. Так что будем двигаться дальше и посмотрим, какой сюрприз преподнесет нам природа, которую мы изучаем.

Список дополнительных и вспомогательных материалов

FlyMove — очень увлекательный сайт, где можно посмотреть ускоренное кино различных стадий развития мухи.

<http://flymove.uni-muenster.de/Homepage.html>

The Interactive Fly — более серьезный, образовательный сайт с описательным разделом по каждому изученному гену.

<http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm>

Ensemble — интерактивная база данных, где хранятся отсеквенированные геномы. Можно без усилий добраться до

нуклеотидной последовательности любого интересующего вас участка ДНК. http://www.ensembl.org/Drosophila_melanogaster/index.html

BDGP in situ — база данных, хранящая фотографии паттернов экспрессии генов мухи во время эмбриогенеза. Для примера впечатайте *bcd* и нажмите Enter. <http://www.fruit-fly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl>

FlyBase — научная база данных, содержащая информацию по существующим линиям мух. <http://flybase.org/>

PubMed — база данных по научной литературе.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

Оседакс — червь-зомби

А. Жадан



Анна Жадан (Суханова)
11-й выпуск (Петрашевец),
школа № 520 (1989 г.),
закончила кафедру зоо-
логии беспозвоночных
Биофака МГУ, к.б.н.,
старший научный сотрудник
беломорской биологической
станции МГУ им. Н.А. Пер-
цова, azhadan@mail.ru

Проникновение в глубины океанов продолжает приносить новые открытия. В феврале 2002 г. во время исследования скелетов китов в заливе Монтерей (Калифорния) на глубине около трех километров ученые обнаружили два новых для науки вида червей, обитающих на костях китов. Строением тела и образом жизни они не похожи ни на каких других животных. У этих червей нет глаз, нет конечностей, нет рта и кишечника, зато имеется ярко окрашенный перистый венчик на переднем конце и разветвленные зеленые «корни» на заднем. Морской биолог из Австралии Грег Роуз совместно с учеными из Института Аквариума Монтеррея Шаной Гоффреди и Робертом Вриженхоеком описали этих червей, поместив их в новый род с названием Оседакс, что означает на латыни «пожиратель костей». Два тихоокеанских вида получили названия *Osedax frankpressi* и *O. rubiplumus*. За необычное местообитание их также называют «черви-зомби».

Первое, что бросается в глаза при изучении оседакса — это красный перистый венчик, который омывается водой и играет роль жабр. Венчик соединяется с мускулистым телом, при опасности втягивающимся в прозрачную трубочку. На другом конце, погруженном в китовую кость, тело расширяется в большой яйцевой мешок. Зеленоватые «корни», отходящие от яйцевого мешка, наполнены бактериями, которые раздражают жиры, содержащиеся в китовой кости.

Вначале ученые были озадачены тем фактом, что все добытые особи оседаксов оказались самками. Однако, когда они стали изучать самок (их размер от 2 до 7 см) под микроскопом, оказалось, что внутри трубок самок обитают десятки микроскопических самцов! Эти самцы выглядят

как только что осевшие личинки, в их телах даже сохраняется желток, но при этом они буквально набиты спермой. Чем крупнее самка, тем больше самцов живет в ее трубке. Ученые предположили, что пол оседакса определяется в момент оседания личинки: если личинка попадает на кость, она вырастает в самку, а если на самку — то больше не растет и становится самцом. Такое определение пола известно для другого класса морских червей — эхиурид.

Самки всех размеров содержат огромное количество яиц. Это можно объяснить их жизненной стратегией: оседаксы могут жить, только пока существует китовый скелет. Когда он полностью перерабатывается, все черви умирают. Поэтому за время существования такого эфемерного биоценоза они должны произвести огромное количество личинок. Личинки разносятся океанскими течениями, и можно только представить, какой ничтожный процент из них имеет шанс найти другой китовый скелет.

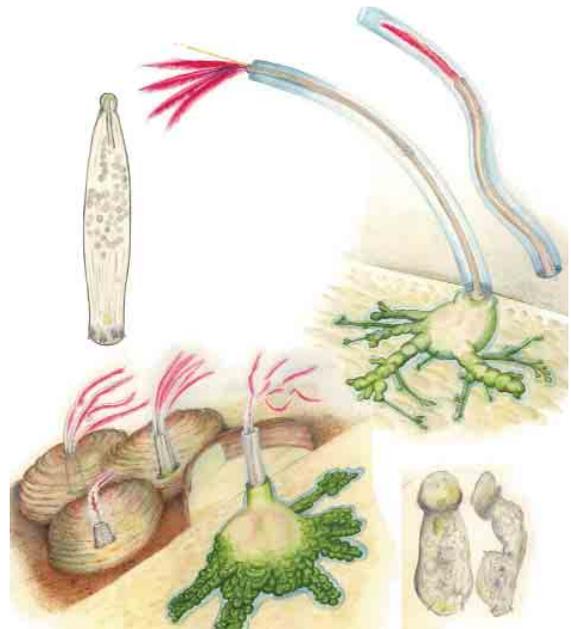


Рисунок 1. Акварельный рисунок, показывающий самок и самцов двух тихоокеанских видов оседакса.

Показано, как самки обитают в своих трубках, а также китовая кость в разрезе, на котором виден большой яйцевой мешок и «корни», пронизывающие толщу кости. Вверху слева: самец *Osedax rubiplumus*. Вверху справа: самки *Osedax rubiplumus*. Самцы, обитающие в трубках самок, показаны черными штрихами. Внизу слева: самки *Osedax frankpressi*. Внизу справа: самец *Osedax frankpressi*.

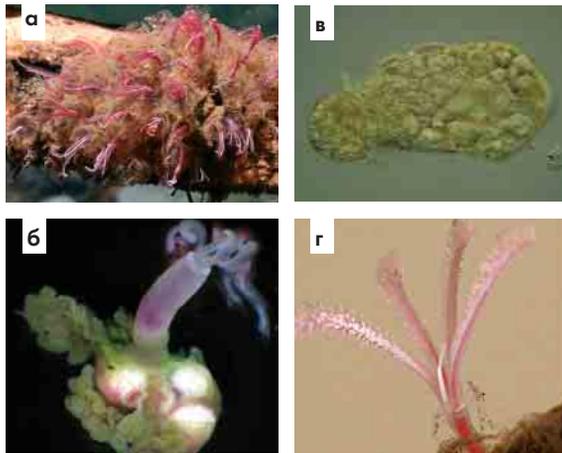


Рисунок 2. Фотографии оседакса.

(а) Поселение *Osedax frankpressi* на китовой кости. (б) Самка *Osedax frankpressi*. Виден перистый венчик, цилиндрическое тело, яйцевой мешок и зеленые корневые выросты, наполненные бактериями. (в) Самец *Osedax frankpressi* 0.2 мм в длину. На переднем конце у него развит ресничный пояс, характерный для личинок многощетинковых червей. Средняя часть тела наполнена спермой, ближе к краям – запасы желтка. (г) Самка *Osedax mucofloris*. Этот вид найден на сравнительно небольшой глубине в Северном море. Самки отличаются от тихоокеанских родственников светло-розовой окраской венчика.

Ученые долго не могли отнести оседакса к какому-либо типу животных: слишком необычно его строение. И только исследование генома оседакса показало, что он принадлежит к группе многощетинковых червей (полихет), а ближайшими родственниками оседакса являются вестиментиферы – обитатели глубоководных гидротермальных источников. Они также не имеют рта и кишечника, а питаются за счет симбиотических бактерий. Строение оседакса, как и вестиментифер, очень сильно изменено из-за приспособления к необычным условиям обитания. Только самцы сохранили характерный для личинок полихет ресничный венчик и 4 пары щетинок на заднем конце тела.

Дальнейшие исследования ДНК оседакса принесли новые сюрпризы. Например, было показано, что два вида оседакса имели общего предка, жившего примерно 42 миллиона лет назад – в то же время, когда только появились первые киты, такие, как базилозавры. Анализ генетического разнообразия оседаксов также показал, что мы имеем дело с большой (около миллиона взрослых самок) и активно размножающейся популяцией, спрятанной от человеческих глаз в глубине океанов. Это позволяет предположить, что там накопилось достаточно много китовых останков.

Вскоре после открытия оседакса в Калифорнии, в 2003 г. команда английских и шведских

ученых затопила останки выброшенного на берег кита в Северном море на сравнительно небольшой глубине – 120 м, недалеко от шведского побережья. Менее чем через год на костях обнаружили новый вид оседакса – *Osedax mucofloris*. Новый вид оказался весьма сходным с тихоокеанскими оседаксами, хотя расстояние между находками составляет более 25 000 км. Наружные части червей заключены в толстый слизистый чехол. (Видовое название означает цветок, покрытый слизью, или сопли-вый цветок.) Как размножается новый вид оседакса, неизвестно. Все добытые особи оказались самками, но никаких карликовых самцов обнаружено не было. Эту загадку еще предстоит разрешить.

Каждый мертвый кит представляет собой весьма значимый источник пищи в бедных органикой глубоководных районах. Одна китовая туша дает столько же органики, сколько за тысячи лет оседает из поверхностных слоев воды на дно (так называемый морской снег). На мертвых китах развивается целая экосистема, включающая сотни видов организмов: червей, крабов, моллюсков, рыб. Такие сообщества могут существовать довольно долго – десятки лет, особенно на богатых жиром китовых костях. Некоторые параллели можно провести между «китовыми» биоценозами и оазисами жизни, развивающимися вокруг гидротермальных источников – черных и белых курильщиков. В них источником энергии служит сероводород, который дает пищу хемосинтезирующим бактериям, а они, в свою очередь, многочисленным животным – червям, моллюскам, ракообразным. Так же, как и останки китов, гидротермальные высачивания представляют собой локальные, относительно недолго существующие источники пищи на фоне очень бедного органикой окружения. На китовых тушах также развиваются серобактерии, существующие за счет сероводорода, образующегося при разложении белков. Но бактерии, живущие в корневых выростах оседакса, – особый случай. Они разлагают липиды – жиры из костей и напрямую снабжают пищей своих хозяев. Это первый описанный случай симбиоза липид-разлагающих бактерий с другими организмами.

Биоценозы, развивающиеся на китовых останках, напрямую зависят от численности китов, которая очень сильно сократилась за последние полвека, «благодаря» охоте и общему ухудшению экологической обстановки в Мировом океане. Недавно открытые сообщества находятся под угрозой исчезновения. Ведь если личинки не найдут себе места, где они смогут вырасти и дать потомство, вид попросту вымрет.

Здоровье людей в ранних земледельческих общинах Северного Китая

Е. Печенкина



Екатерина Печенкина
11-й выпуск биокласса
(Петрашевы), школа
№ 520 (1989 г.), к.б.н.,
сотрудник отдела
антропологии Королевского
колледжа Нью-Йоркского
университета,
pechenkina@yahoo.com

Введение

В 6 лет у меня была огромная книга (ростом примерно в полметра в то время) с большими цветными картинками доисторических людей. Когда мы переезжали из Ташкента в Москву, книга потерялась, и теперь уже невозможно узнать ни ее автора, ни названия. Однако я очень ясно помню картинки и текст, которые были в ней. Они изображали разные виды древних людей: походившего на шимпанзе австралопитека, который ходил на полусогнутых ногах; сутулых питекантропа и синантропа, темнокожих и покрытых волосами; неандертальцев с неопрятными бородами и грубыми копыями и, наконец, *Homo sapiens*, которые были представлены голодным охотником и более поздним земледельцем.

Многие из этих стереотипов оказались неверны. Например, сейчас уже вполне ясно, что австралопитеки, между 4 и 1,5 миллионами лет назад жившие в Африке и, вероятно, не умевшие еще делать каменные орудия, уже ходили совершенно прямо, практически так же, как современные люди. Питекантропов и синантропов сейчас относят к одному виду *Homo erectus* — человек прямоходящий, а кроме него обнаружено еще несколько видов древнейших людей.

Что поразило меня больше всего, — это, что в книге говорилось об очень малой продолжительности жизни человеческих предков. Утверждалось, что питекантропы едва доживали до 20 лет, а 25-летние могли рассматриваться как настоя-

щие старцы. Продолжительность жизни неандертальцев была несколько выше, но и среди них мало кто доживал до 30–35 лет. Жизнь первых *Homo sapiens* была немногим длиннее, хотя продолжительность жизни возрастала с освоением земледелия и одомашниванием животных.

Это предположение о постепенном удлинении срока жизни человека было не совсем безосновательным и присутствовало в большинстве трудов по антропологии вплоть до последней четверти прошлого века. Исторические документы XVIII, XIX и начала XX века говорят о постепенном повышении средней продолжительности жизни в течение последних 200 лет. Однако в густонаселенных городах Европы в более ранние исторические времена тяжелый груз инфекционных болезней, загрязненность воды, обилие крыс и мышей, недостаток продовольствия — все это вместе вело к высокому уровню заболеваемости и смертности, особенно среди детей и женщин после родов.

При этом, если беспристрастно посмотреть на жизнь доисторических людей, наши оценки заболеваемости и продолжительности жизни для них должны существенно отличаться от тех, что известны для ранней истории Европы. Низкая плотность населения, кочевой или полукочевой образ жизни должны были препятствовать накоплению отбросов вокруг их поселений. Большинство инфекций не могли распространяться в связи с малой численностью групп. В случае болезни такая группа либо вымирала в течение нескольких недель, либо ее численность сокращалась, но члены группы приобретали иммунитет к данному заболеванию. В любом случае болезнь быстро прекращалась и не возникала вновь. Долго существовать в таких человеческих популяциях могли только паразиты, которые наносили небольшой вред хозяевам или вызывали нетяжелые хронические заболевания. Острицы и вши, которые помимо человека могут заражать многих других приматов, вероятно, существовали в популяциях древних людей. Но в таких группах не было чумы, холеры, оспы и дизентерии; пища была богата витаминами и

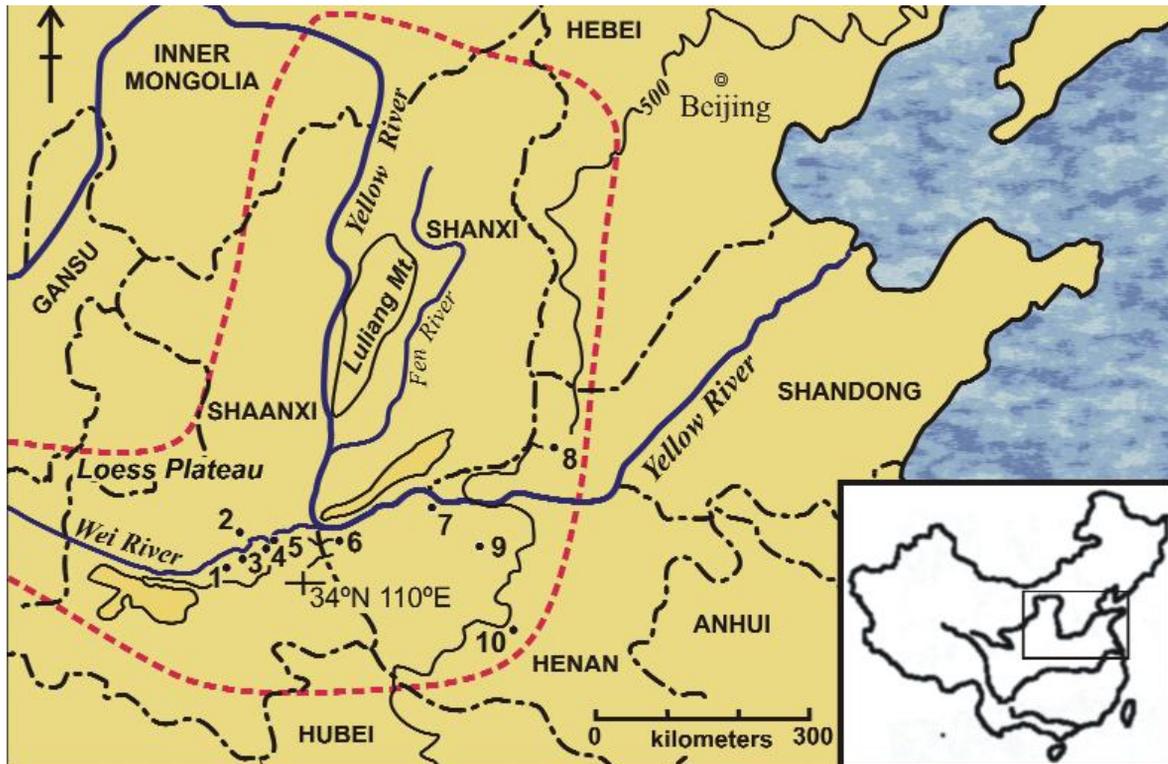


Рисунок 1. Схема района исследований.

Пунктирной линией отмечена приблизительная граница распространения культур группы Яншао. Цифрами отмечены поселения 1 — Банпо; 2 — Кангя; 3 — Джянгчай; 4 — Шидия; 5 — Белу; 6 — Щипо; 7 — Гуандья; 8 — Менгжуанг; 9 — Мейшан; 10 — Джяху.

белками. При этих условиях нет оснований предполагать, что древние люди жили меньше 70–80 лет.

И это подтверждается рядом находок. На скелете неандертальца из La Chapelle-aux-Saints во Франции, который жил около 60 000 лет назад, обнаружены следы заболевания остеоартритом на шейных и грудных позвонках, сросшийся перелом среднего ребра, тяжелый остеоартрит левого бедра и головки плечевой кости, а также небольшие экзостозы (костные разрастания) на правом плече и костях предплечья (Trinkaus, 1985). Остеоартрит прогрессирует с возрастом и в своей далеко зашедшей форме, в какой он был виден на этом скелете, свидетельствует о том, что его обладатель был достаточно стар. К тому же этот человек явно жил некоторое время после утраты задних зубов, что заметно по рассасыванию альвеол на верхней и нижней челюстях. Аналогично на недавно найденном черепе из Дманиси в Грузии видно, что его владелец еще при жизни потерял все зубы, и судя по степени рассасывания альвеол на челюстях, некоторое время жил без них.

Зубы другого индивида из Дманиси, хотя и сильно сточены, но крепки и свободны от кариеса. Похоже, что Дманиси 4 (так называют пер-

вого, беззубого, человека) потерял зубы в очень преклонном возрасте просто в результате их износа. На нескольких человеческих скелетах, относящихся к периоду палеолита, заметны следы сросшихся переломов. На других видны признаки нарушений развития и врожденных пороков. А вот признаки инфекционных заболеваний или болезней, связанных с неадекватным питанием, таких как анемия или цинга, чрезвычайно редки на останках древних людей. Череп из Брокен Хилл из Кабве в Замбии, который относят к виду *Homo rudolfensis* и датируют периодом 300 000 — 125 000 лет назад, несет следы зубного кариеса и вызванного кариесом абсцесса корня на верхней челюсти. Зубной кариес — инфекционное заболевание, вызываемое бактерией *Streptococcus mutans* и лактобактериями, которые питаются остатками пищи, приставшей к зубной поверхности. Кариес на черепе Брокен Хилл — необычный пример для своего времени. Подавляющее большинство черепов древних людей, датированных до 12 000 лет назад, следов кариеса не имеют. По мнению исследователей, высказанному в книге Марка Натана Кохена и Джорджа Армелагоса (1984), основанному на изучении скелетных останков из разных частей света, здоровье древних людей было лучше, а продолжительность

жизни — больше до того, как переход к оседлому образу жизни и зависимость от сельского хозяйства повысили общий уровень заболеваемости.

Мои исследования последнего времени были посвящены изучению здоровья ранних земледельцев из Северного Китая (рисунок 1). Не вполне ясно, как повлиял на них переход к земледелию в этом районе, для которого характерен очень специфический набор сельскохозяйственных культур и домашних животных. Обычно земледелие в Китае ассоциируется с выращиванием риса. Однако в зоне моих исследований, на берегах р. Хуанхэ (Yellow River) и ее притоков, в неолите в основном культивировали группу злаков, известную под общим названием millet. Обычно это название переводят как просо, хотя в группу культивируемых растений, помимо собственно проса (*Panicum miliaceum*), входили еще чумиза (*Setaria italica*) и гаолян (*Andropogon sorgum*). Позже они были вытеснены пшеницей. Свиньи были одомашнены в Китае и содержались там в большом количестве, так же как собаки и, возможно, куры. Здесь я хочу рассказать о моих исследованиях заболеваний на основе коллекций из Северного Китая.

Здоровье людей Пелиганга: начало земледелия

Прошлой осенью мне посчастливилось работать с коллекцией скелетов из раннего неолитического поселения Джяху (Jiahu), связанного с культурой Пелиганг (7000–5000 лет до нашей эры) (рисунок 2). Джяху было довольно большим для своего времени поселением. Оно занимало около 5,5 га, причем территория разделялась на несколько жилых участков. Более типичные поселения периода Пелиганг занимали от 1 до 2 га (Liu, 2004). Известность раскопкам в Джяху принесли два типа найденных там предметов: костяные флейты, самый древний китайский музыкальный инструмент (Zhang *et al.*, 2004), и



Рисунок 2. Посуда эпохи Пелиганг.



Рисунок 3. Перелом дистальной части лучевой кости.

панцирь черепахи, покрытый самыми древними китайскими иероглифами, которые положили начало китайской письменности не менее, чем 8 000 лет назад (Хуецин *et al.*, 2003). Остатки семян и фитолитов (кремневых тел) риса, найденные в Джяху, указывают на одомашнивание этого важнейшего пищевого растения (Chen *et al.*, 1994). Также были найдены остатки проса. Каждая группа жителей Джяху имела свое кладбище, более 200 скелетов были собраны при раскопках, однако доступно для изучения гораздо меньшее число.

Хотя сохранность костного материала из Джяху довольно плохая и скелеты в основном фрагментированы, некоторые стороны жизни людей этого поселения все же могут быть восстановлены по ним. Первое, что удивило меня при работе с коллекцией из Джяху, был рост жителей этого поселения. Я оценивала его по длине бедренной и большой берцовой костей, и он оказался в среднем равен 173,69 см. Для современных китайцев это очень большой рост. Кости оказались толстыми и тяжелыми, с хорошо развитыми поверхностями прикрепления мышц. Довольно часто встречались следы переломов и остеоартроза. Несколько ключиц и одна плечевая кость были сломаны посередине и потом срослись. У двух индивидов был обнаружен перелом дистальной части лучевой кости (рисунок 3). Такой перелом чаще всего бывает вызван выставлением вперед руки при падении. Бедро одной из женщин было сломано в средней трети, но вполне зажило при жизни.

Высокая частота остеоартрозов у жителей Джяху говорит как о тяжелой работе, которой им приходилось заниматься (поскольку излишние механические нагрузки на сустав усугубляют развитие этого заболевания), так и о том, что многие из них доживали до преклонного возраста. На рисунке 4 показаны два верхних шейных позвонка (С2 и С3) мужчины из Джяху. Костные выросты, остеофиты, хорошо заметны на суставных поверхностях, а сами поверхности уплощены и деформированы. Такие серьезные изменения могли быть вызваны либо травмой, сместившей позвонки, либо постоянным ношением тяжестей на голове.

Хотя в коллекции останков из Джяху сохранилось совсем немного зубов, все же можно с



Рисунок 4. Остеоартрит на шейных позвонках из Джяху.

достаточной вероятностью говорить о плохом здоровье ротовой полости у жителей Джяху. На одной из челюстей был обнаружен глубокий абсцесс, проникающий в носовую пазуху. Вероятно, он был вызван тяжелым кариесом (рисунок 5, слева). На другой челюсти можно заметить сильный кариес, который разрушил коронки моляров с обеих ее сторон (рисунок 5, справа). Изношенность зубов на этой челюсти также очень высока: резцы стерты почти до основания и закруглены со стороны губ. Это может говорить о том, что зубы использовались как инструмент при обработке шкур или волокон. Материал зажимали между верхними и нижними зубами и тянули руками вперед и вниз. Возможно, таким образом жители Джяху обрабатывали шкуры свиней. Похожие повреждения были обнаружены у эскимосских женщин, которые пользуются зубами при обработке звериных шкур.

Янгшао: больше свиней, больше проса — ведет ли это к увеличению заболеваемости?

Янгшао (около 4900–3000 гг. до н.э.) — это неолитическая культурная группа, которая доминировала в среднем течении Хуанхэ. Она хорошо известна по полихромной (черный на красном) керамике с зооморфными, антропоморфными, а позже — и с абстрактными изображениями (Liu, 2004) (рисунок 6). В этот период



Рисунок 5. Состояние зубов в Джяху.

постепенное потепление климата увеличило урожаи проса. В поселениях эпохи Янгшао были обнаружены ограмные ямы-хранилища, наполненные просом. Деревни были повсюду, и, как правило, по размеру они превосходили поселения эпохи Пелиганг. В ранний период Янгшао важными отраслями хозяйства оставались охота и рыболовство, но все более распространенным делалось выращивание свиней. В поселении Шипо (Xipo), относящемся к середине эпохи Янгшао, около 90% найденных при раскопках костей принадлежали свиньям.

Я изучала коллекцию останков эпохи раннего Янгшао из двух поселений провинции Шаанхи (Shaanxi): Джянгцай (Jiangzhai) и Шидия (Shijia) (см. рисунок 1) Поселение Джянгцай занимало площадь около 5 га и было ограничено солидным рвом. Более сотни домов смотрели на центральную площадь, окруженную строениями, которые интерпретируют как загон для свиней. Поселение имело две зоны заселения. Захоронения были найдены в центральной части поселка, а также в нескольких местах снаружи от рва. Шидия располагается на западном берегу р. Ки и относится к периоду раннего Янгшао. Здесь мертвых хоронили в согнутом положении. Большинство захоронений множественно, тела в них уложены рядами (Gao, Lee, 1993).

Прошлой осенью я также работала с коллекцией из двух поселений эпохи Янгшао в провинции Хенан (Henan): Шипо (Xipo) и Гуандья (Guanjia). Это более поздние поселения, чем Джянгцай и Шидия, они относятся к середине эпохи Янгшао.

Шипо находится в западном конце провинции Хенан, в верховьях р. Ша, примерно в 3 км от гор Кинлинг (Qinling) (Ma, 2005). Шипо — большое поселение, которое было окружено рвом с водой. Общая площадь его — около 40 га. Население составляло примерно 640–900 человек. Предполагают, что это был центр района. Дома в нем были разного размера. В ходе раскопок последних четырех лет были обнаружены остатки двух крупных зданий. Самое большое из них (обозначенное F105) занимало площадь 516 м² и, как предполагают, было местом общих собраний и ритуальных действий. Кладбище располагалось сразу за рвом, там было найдено 22 захоронения с индивидуальными погребениями в положении ничком. Вещи в захоронениях были распределены неравномерно. В некоторых были найдены церемониальные топоры из неф-рита, керамика, костяные орудия, другие не содержали вообще никаких предметов, что указывает на социальное расслоение жителей. Интересно, что самой богатой была могила ребенка 3–5 лет.



Рисунок 6. Типичная посуда эпохи Янгшао.

В отличие от Щипо, Гуандья было сравнительно небольшим поселением, около 9 га по площади. Оно располагалось на узкой террасе на южном берегу р. Хуанхэ (Fan, 2000). Рвы ограничивали его с запада и с юга, где оно не граничило с рекой. Кладбище было расположено на северо-востоке, по обе стороны рва. В большинстве захоронений не было обнаружено никаких предметов.

Состояние зубов

В коллекциях эпохи Янгшао распределение маркеров здоровья зубов сильно варьировало. В останках периода раннего Янгшао зубы были в прекрасном состоянии. Лишь немногих зубов не хватало, еще реже встречались случаи кариеса. Корневые абсцессы практически отсутствовали. Так в Джянгцай и Шидия только 1,37% и 3,47% зубов носили признаки кариеса. В среднем Янг-

шао, в поселениях Щипо и Гуандья, кариес встречался по крайней мере в 10 раз чаще, в 10,47% и 11,06% случаев соответственно. В Щипо на удивление велик процент прижизненных утрат зубов (16,9%). В Гуандья он был несколько ниже (8,6%), и существенно ниже — в Джянгцай и Шидия (4,2% и 2,9%, соответственно). Одна из нижних челюстей, найденных в Гуандья, была полностью лишена зубов (рисунок 7, Гуандья M26).

Какие же факторы могли привести к столь существенным различиям в здоровье зубов у людей эпохи раннего и среднего Янгшао? Обычно плохое состояние зубов связано с углеводной диетой, поскольку бактерии, питающиеся углеводами, выделяют кислоту, которая разрушает зубную эмаль. Просо богато углеводами. Но просо выращивалось в поселениях обоих периодов. Возможно, ухудшение состояния зубов в Щипо и Гуандья связано с изменением технологии приготовления пищи (рисунок 8). Горшки эпохи раннего Янгшао широкие и плоские, они не подходят для долгой варки зерна. В поселениях среднего Янгшао находят глубокие полузакрытые сосуды с маленькими глиняными печками под ними. Эта посуда позволяет разваривать зерно при невысокой температуре в течение длительного времени. При этом получается клейкая мягкая каша, которая способствует возникновению кариеса.



Рисунок 7. Состояние зубов в Щипо и Гуандья.

Болезни, связанные с неполноценным питанием, в эпоху Янгшао

В отличие от других растительных продуктов, большинство зерновых не содержат витамин С и содержат мало ниацина (витамина В3). Меньше всего ниацина содержится в просе, гречке, рисе и кукурузе. И хотя просо содержит относительно много железа, поглощение его из растительных источников происходит с очень низкой эффективностью, особенно при недостатке витамина С. Большинство зерновых также содержат мало белка, и часто их аминокислотный состав недостаточен для поддержания нормального метаболизма. В просе, например, содержится крайне мало лизина. Дефицит лизина приводит к ряду физиологических нарушений, наиболее частыми среди которых являются анорексия (болезненное исхудание и отвращение к еде), задержка роста, недостаточный вес, медленный белковый обмен, структурные аномалии коллагена и миозина, а также анемия.

При анемии разрастание красного костного мозга приводит к повышенной пористости черепных костей и ведет к костным патологиям, известным под названием пористый гиперостоз (рисунок 9а) и sibia orbitalia (рисунок 9б). Эти



Рисунок 8. Горшок из Шипо.

патологии позволяют по скелету сделать заключение о наличии у человека железодефицитной анемии (Ortner *et al.*, 1999). Они выражаются в повышенной пористости теменной, лобной и затылочной костей, а также свода орбиты. Эти аномалии обычно формируются у хронически анемичных детей в течение первых четырех лет жизни, когда кости черепа быстро растут. Анемия в более позднем возрасте не приводит к таким изменениям. Таким образом, во взрослом черепе пористый гиперостоз и *cribia orbitalia* являются индикатором того, что данный индивид в детстве перенес анемию.

Цинга определяется на останках по макропористости сфеноида (клиновидной кости) и височных костей. Эта макропористость возникает в результате частых кровотечений, вызванных давлением жевательных мышц на подлежащие кровеносные сосуды, стенки которых повреждаются при цинге (Ortner *et al.*, 2001).

Встречаемость индикаторов анемии и цинги в разных популяциях эпохи Янгшао была существенно разной. Несмотря на широкое употребление проса в Джянгтай и Шидия, в коллекциях из этих мест нам встретилось неожиданно мало случаев пористого гиперостоза (ПГ) и *cribia orbitalia* на взрослых черепах (частота ПГ в Джянгтай — 0%, в Шидия — 8%). Пористые повреждения костей чаще встречались на черепах из провинции Хенан. В том числе на образцах эпохи Пелиганг (до эпохи Янгшао) в поселении Джяху частота ПГ составила 19%. На образцах эпохи среднего Янгшао из поселений Шипо и Гуандья частота ПГ составляла 12% и 14% соответственно. Индикаторы цинги были выявлены только на образцах эпохи раннего Янгшао из Джянгтай и Шидия (11–15%), но отсутствовали в образцах из Шипо и Гуандья.

Линии остановки роста на зубах, или гипоплазия зубной эмали (ГЗЭ), были весьма распространены во всех коллекциях эпохи Янгшао. Исключение составляло поселение Шидия (частота ГЗЭ 9%). Наибольшая частота ГЗЭ была выявлена в поселении Гуандья (76%). Гипо-

плазия зубной эмали является обычным следствием диареи, возникающей при отнятии ребенка от груди, или острых инфекционных заболеваний, перенесенных в раннем детстве. При этом рост ребенка тормозится и на зубах формируется горизонтальная линия темного цвета. К такому же эффекту могут приводить перенесенные периоды голода. Таким образом, острые инфекции были, вероятно, весьма распространены в поселениях эпохи Янгшао. Также в сельскохозяйственных популяциях вследствие небольших урожаев часто возникают голодные зимние периоды. Однако стоит заметить, что гипоплазия формируется только в том случае, когда после периода задержки продолжается нормальный рост. Многочисленные случаи ГЗЭ в поселениях эпохи Янгшао позволили мне сделать вывод, что жители этих поселений часто выжили после перенесенных инфекций и оправлялись от тяжелых зим и периодов голода.

Можно ли обнаружить следы инфекционных заболеваний на неолитических останках из Китая?

Как правило, следы на костях оставляют только хронические инфекции. Острые инфекционные заболевания убивают или излечиваются так быстро, что след на костях остаться не успевают. Однако в случае быстро развивающейся агрессивной инфекции, затрагивающей костную ткань, кость в очаге инфекции может рассасываться. Такие повреждения типичны для туберкулеза, который затрагивает кости, обильно снабженные кровеносными сосудами, такие как кости позвоночника и свода черепа.

Заболевания, затрагивающие мягкие ткани, которые соседствуют с костью, часто ведут к повреждениям надкостницы. Надкостница представляет собой тонкий волокнистый слой, покрывающий всю кость. В этом слое обитают остеобласты (клетки-строители кости). В ответ

Рисунок 9. Пористый гиперостоз (а) и *cribia orbitalia* (б).



Рисунок 10. Поражения надкостницы.

на повреждение они начинают продуцировать костный материал. Повреждения надкостницы выглядят как «плетеная кость», где немногочисленные участки нового костного материала лежат поверх старой кости (рисунок 10). Такие повреждения часто встречаются у людей, страдающих сифилисом, и иногда могут быть следствием заболевания проказой. Сами по себе эти повреждения не диагностичны, поскольку такой же эффект может возникать при ушибах и кровотечениях. Однако местоположение, степень заживления и морфология дефекта могут помочь при установлении диагноза. Так, при сифилисе, как правило, повреждаются большая и малая берцовые кости.

Очень немногие ученые занимались исследованием распространенности заболеваний в Древнем Китае. Сузуки с коллегами (2005) изучал останки людей бронзового века из трех поселений культуры Кайе (1000 г. до н.э. – 500 г. н.э.) в провинции Квингхай на предмет обнаружения следов системных инфекций. Поражения надкостницы в основном затрагивали большую берцовую кость и наблюдались на длинных костях 15 индивидов. На двух скелетах были обнаружены типичные для сифилиса поражения, однако дефектов черепа обнаружено не было.

С помощью метода ПЦР (полимеразной цепной реакции) в 3 образцах из 15, полученных при раскопках в провинции Ксинян-Угур (возраст образцов около 2000 лет), была идентифицирована ДНК микобактерий. Определенный вид микобактерий вызывает туберкулез, однако никаких макроскопических повреждений костной ткани, которые свидетельствовали бы о заболевании костным туберкулезом, обнаружено не было (Fusegawa *et al.*, 2003). К тому же использованные для ПЦР праймеры были специфичны не только для *Mycobacteria tuberculosis*, но также для *M. bovis* и *M. microti*, которые обычно поражают грызунов. Поэтому невозможно с уверенностью утверждать, что обнаруженная ДНК принадлежит *Mycobacteria*, поражающим человека.

Мне удалось обнаружить очень немного примеров хронических системных инфекций в коллекциях эпохи Янгшао. Повреждения надкостницы были связаны исключительно с травмами. На одном скелете подростка 12–14 лет из Шидия присутствовали следы воспалительного процесса на наружных частях диафизов обеих бедренных костей. Рентгенография (рисунок 11а) выявила патологические изменения под надкостницей и внутри кости на обоих бедрах (отмечено цифрой 2), которые могли свидетельствовать о хронической инфекции. На этих же рентгенограммах были видны поперечные линии над наружной частью эпифиза (отмечено цифрой 1), которые могли свидетельствовать о периодических задержках роста, вызванных хронической инфекцией.

Я нашла также вероятный случай туберкулеза на останках из коллекции Лонгшан (3000–2000 лет до н.э.) более позднего, чем Янгшао, периода. Этот индивид имел угловую деформацию позвоночника, возникшую в результате почти полного рассасывания тела девятого грудного позвонка и частичного рассасывания восьмого (рисунок 11 б и в). Такие повреждения являются следствием туберкулезной спондилоартропатии или болезни Потта (Ortner, Putschar, 1985).

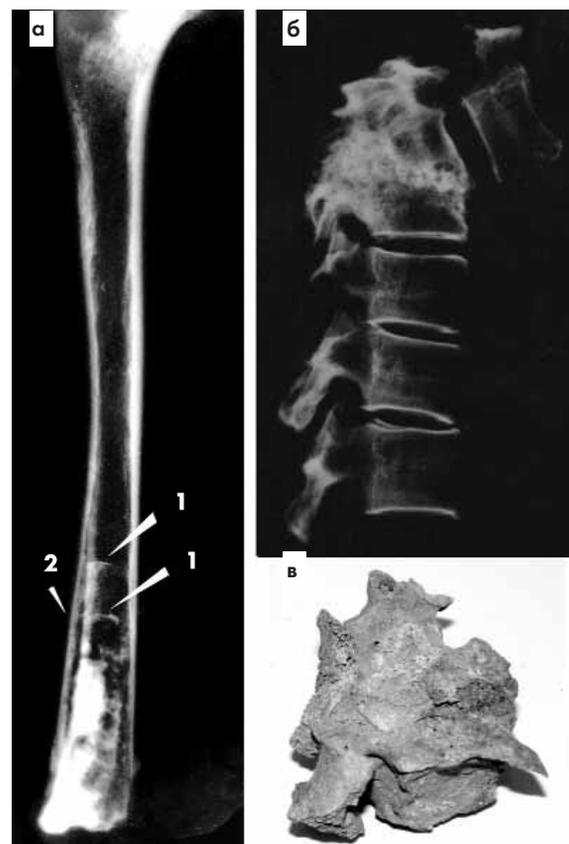


Рисунок 11. Костные инфекции в неолитическом Китае.

Костный туберкулез также мог быть причиной отдельного очага макропористости на левой теменной кости того же человека. Другие элементы скелета повреждены не были. Эти находки являются самыми ранними примерами костного туберкулеза в Восточной Азии. Однако для исключения других инфекционных заболеваний, таких как бруцеллез и бластомикоз, которые тоже могут приводить к подобным повреждениям (Aufderheide, Rodriguez-Martin, 1998), потребуются дополнительные молекулярно-биологические исследования.

Мирные земледельцы или грозные воины: насилие в неолитическом Китае

Общество эпохи раннего Янгшао обычно считают доклассовым. В поселениях практически отсутствуют следы сложных празднеств и ритуалов, накопления богатств, пышных похорон или монументальных построек, которые свидетельствовали бы о наличии элиты, управляющей жизнью других людей. Укрепления поселений были минимальны и обычно ограничивались рвом, который хорошо удерживал свиней внутри и волков снаружи, но вряд ли мог помешать вторжению вооруженных людей, которые явились грабить и умыкать женщин. Оружие, найденное в поселениях эпохи Янгшао, больше подходило для охоты, чем для войны. Похоже, что жители Янгшао были довольно миролюбивы и не участвовали в организованных военных действиях.

Однако значительное число травматических повреждений, обнаруженных на черепах эпохи Янгшао из провинции Шаанкси, может говорить о высоком уровне насилия. Высокая частота черепных травм была зафиксирована в образцах из трех поселений эпохи Янгшао в Шаанкси: Джянгцай (27,6%), Шидия (18,9%) и Бейлу (16,6%, или каждый шестой череп). Один череп из Бейлу, вероятно принадлежавший мужчине, носил следы надрезов на лбу, которые могли быть результатом скальпирования (рисунок 12а). На женском черепе из Джянгцай был обнаружен пролом в лобной кости, нанесенный тупым предметом примерно в момент смерти, который мог быть результатом удара камнем или дубинкой (рисунок 12б). Мужчина из Джянгцай имел сросшийся перелом левой скуловой кости (рисунок 12в), который мог появиться в результате удара, нанесенного противником, стоявшим напротив и имевшим в правой руке большой камень. Крупные вмятины на костях, которые окружены зоной повышенной пористости, были обнаружены на теменных костях двух черепов:

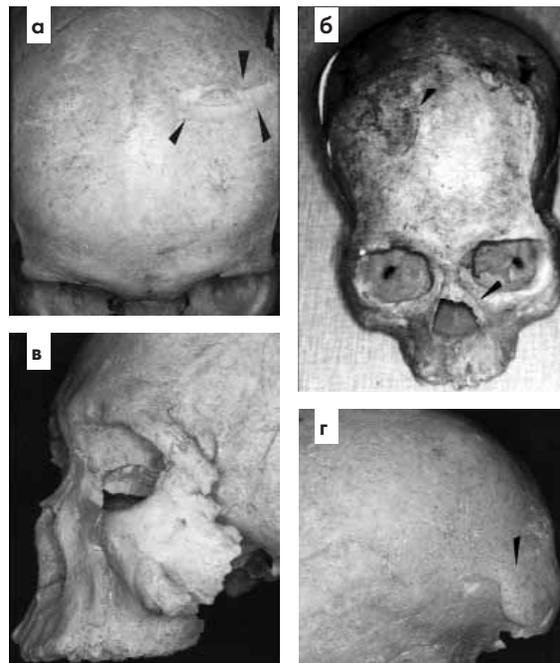


Рисунок 12. Черепные травмы в коллекциях эпохи раннего Янгшао.

мужского из Джянгцай и предположительно женского из Шидии. Эти вмятины, вероятно, являются результатом заживления раны от удара тупым предметом, похожей на описанную выше.

Также был найден череп мужчины из Шидии с зажившим проломом в лобной кости (рисунок 12г).

В коллекциях из Джянгцай и Шидии кости туловища представлены бедно. На останках одного из мужчин из Джянгцай виден смещенный перелом локтевой кости, который мог быть результатом парирования удара противника, хотя мог образоваться и при падении. Женщина из Бейлу имела сросшийся перелом левой лучевой и локтевой костей, который мог являться последствием выставления руки при падении. Женщина из Шидии имела перелом средней части бедренной кости. Заметна попытка лечить это повреждение, однако сращения кости не произошло. Замещающая кость не сформировалась, корковый слой на кости был толщиной всего 2–3 мм, что говорит о том, что конечность не использовалась до самой смерти. Следы сросшихся переломов, похоже, найдены еще на двух плечевых костях и двух ключицах людей эпохи раннего Янгшао.

Черепные травмы в коллекции из провинции Хенан встречались реже, чем в коллекции из Шаанкси. Только один из 21 черепа из Гуандя имел прижизненное повреждение. Переломы в других частях скелета были обнаружены в останках двух человек из одного поселения: у одного



Рисунок 13. Травмы скелета туловища из коллекции Гуандья.
(а) – Гуандья М2, плечевая кость; (б) – Гуандья М13, бедро.

был сломан эпифиз плечевой кости, а у другого – диафиз бедренной кости (рисунок 13). При обоих переломах имело места смещение, но в обоих случаях наблюдалось хорошее срастание, говорящее о том, что человек жил еще долго после получения травмы.

В поселении Шипо повреждений черепа обнаружено не было, однако у двоих представителей были найдены переломы ребер и у четверых (из 18) сросшиеся переломы локтевой кости. У одного человека были сломаны как левая, так и правая локтевая кости, а у другого наблюдался смещенный перелом эпифизов как лучевой, так и локтевой костей (рисунок 14). Переломы локтевой кости часто трактуют как травмы, возникающие при парировании удара. Они образуются, когда человек пытается защитить лицо или грудь путем выставления вперед предплечья. Переломы этого типа чаще встречаются на левой руке, которая служит для защиты, в то время как правая держит оружие. Во всех описанных переломах этого типа из Шипо, они были отмечены у мужчин и хорошо залечены. Поскольку в Шипо отсутствовали смертельные повреждения и не были обнаружены травмы подобного типа у женщин, можно предположить, что переломы были получены в «дружеских» мужских состязаниях, вроде кулачных боев, которые проводились в праздники. Шипо был для своего времени крупным поселением и мог функционировать как центр целой округи. Во время праздников в него, вероятно, съезжались жители соседних поселений, чтобы принять участие в состязаниях или посмотреть на них.

В период раннего Янгшао серьезные стычки были более распространены, поскольку среди останков жителей Шидии и Джянгцай встречаются смертельные и опасные для жизни повреждения. Они могли быть результатом домашнего насилия или ссор между соседями. Почему

повреждения такого рода практически отсутствуют в Шипо и Гуандья, не совсем ясно. Можно выдвинуть гипотезу, что в Шипо, где по захоронениям видно различие в имущественном положении жителей и имеются крупные здания, которые могли использоваться для общих собраний, правящая группировка умела сдерживать насилие среди жителей и разрешать конфликты мирным путем. Однако накопление богатства еще не привело к организации набегов на соседние территории.

Они жили долго и трудно: распространенные остеоартрита в период Янгшао

Определение возраста смерти человека из древней популяции – дело трудное, и результат часто бывает неточным. Если умершему менее 20 лет, его возраст можно определить по прорезыванию зубов и приростанию эпифизов костей. Для человека, рост которого уже закончен, антропологам приходится применять другие индикаторы, включая морфологию лобкового симфиза и боковых поверхностей таза, а также черепных швов. Не вдаваясь с подробности этих методов, что потребовало бы отдельной статьи, если не книги, достаточно сказать, что большинство изученных нами останков периода Янгшао принадлежали достаточно старым людям. Конечно, детская смертность в этих попу-



Рисунок 14. Переломы «парирования удара» из Шипо.

ляциях была весьма высокой. Однако те индивиды, которые дожили до половой зрелости, имели довольно высокие шансы достичь старости. Даже для женщин, вопреки ожиданиям, мы не обнаружили повышения смертности от родов между 15 и 25 годами. Конечно, возможно, что женщин, умерших при родах, хоронили в специальных местах, которые не были обнаружены в ходе археологических раскопок. Однако мы исследовали коллекции из разных поселений, которые имели весьма разные традиции захоронения умерших. Скорее всего, если такие отдельные захоронения существовали, они были бы обнаружены хотя бы в нескольких поселениях.

Подавляющее большинство людей эпохи Янгшао имели множественные костные выросты и эррозию суставных поверхностей, что позволяет предположить, что этим людям приходилось переносить серьезные нагрузки на суставы и что они жили достаточно долго. Остеоартрит часто затрагивает позвоночник, плечевой сустав, локоть, колено — набор, характерный для людей, занимающихся тяжелым физическим трудом. Часто встречались ямки в телах позвонков (рисунок 15а), так называемые ямки Сморла, вызванные ущемлением межпозвоночных дисков. Поднятие тяжестей обусловило компрессионные переломы в поясничном отделе позвоночника у многих жителей Шипо (рисунок 15б). У других обширное развитие выростов-остеофитов привело к срастанию нескольких поясничных позвонков (рисунок 15в).

Повреждения, вызванные трудовой деятельностью, часто приводят к развитию остеоартроза на одной стороне тела сильнее, чем на другой. На рисунке 15г видно, что на правой коленной чашечке выросты-остеофиты развиты гораздо сильнее, чем на левой, хотя болезнью затронуты обе. В других случаях мы видим, что на правом плече наблюдается больше остеофитов, чем на левом, или что правая локтевая кость повреждена остеоартрозом сильнее, чем левая.

Заключение

Изучая состояние здоровья неолитических земледельцев Северного Китая, мы обнаружили существенные различия по некоторым параметрам даже для популяций, живших на протяжении сравнительно короткого (с эволюционной точки зрения) времени и имевших довольно сходный образ жизни. Мы показали, что за краткий период в тысячу лет, отделяющий поселения раннего и среднего Янгшао, существенно ухудшилось состояние зубов и распространилась анемия среди детей. В то же время мы не нашли

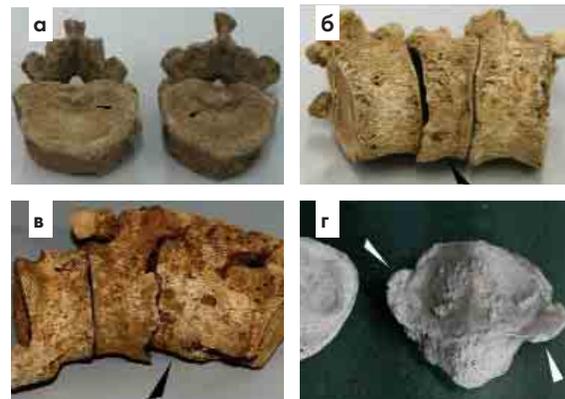


Рисунок 15. Остеоартрит на останках эпохи Янгшао.

индикаторов того, что неолитические земледельцы имели малую продолжительность жизни. Как среди жителей раннего, так и среди жителей среднего периода Янгшао значительная часть доживала до преклонного возраста и имела остеоартрит и другие возрастные заболевания, наряду с сильно сточенными зубами. Люди могли выживать при переломах длинных костей, даже таких, как бедренная, а также при полной потере зубов. Общество периода Янгшао не было свободно от насилия, и были найдены останки нескольких человек со смертельными травмами черепа. Практически не было найдено примеров хронических инфекций в популяциях периода Янгшао и Пелиганг. Признаки туберкулеза были обнаружены на одном скелете, относящемся к периоду Лонгшан.

Рассматривая полученные нами разнообразные результаты, которые отражают состояние здоровья в разных поселениях периода Янгшао, хочется отметить, что в доисторические времена разным группам людей были свойственны разные болезни и патологии. Некоторые группы были, вероятно, здоровее других. Поэтому нет оснований предполагать, что существует однозначная тенденция увеличения качества и продолжительности жизни. *Vive la difference!*

Благодарности

Эта статья посвящается Галине Анатольевне Соколовой, без которой данная статья была бы невозможна. Также хочется поблагодарить Женю Петраш, которая тщательно пыталась обучить меня русскому языку на протяжении года; за ее терпение и помощь — огромное спасибо. Всем моим одноклассникам и друзьям из 520-й за их поддержку, за их идеи, и за все, что невозможно забыть, — спасибо. Моему коллеге в Китае, Ма Хиаолину, который объяснил мне, что жареная

саранча ничуть не хуже жареной курицы, и научил фразе «Бу яо» — теплая благодарность. Вере Зелмановне Юровской, которая первая познакомил меня с такими замечательными словами, как «эпифиз» и «моляр», — добрая память.

Литература

- Aufderheide A.C., Rodriguez-Martin C.** 1998. The Cambridge Encyclopaedia of Human Paleopathology. Cambridge: Cambridge University Press.
- Chen B., Zhang J., Lu H.** 1995. Discovery of rice phytoliths in the Neolithic site at Jianhu of Henan Province and its significance // Chinese Science Bull., 40: 14.
- Cohen M.N., Armelagos G.** 1984. Paleopathology at the Origins of Agriculture. Orlando: Academic Press.
- Eisenach K.D., Cave M.D., Bates J.H., Crawford J.T.** 1990. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for Mycobacterium tuberculosis // J. Infect. Dis. 161: 977–981.
- Fan W.** 2000. A fruitful excavation at the Guanjia site // Zhongguo Wenwubao, Beijing.
- Fusegawa H., Wang B.H., Sakurai K., Nagasawa K., Okauchi M., Nagakura K.** 2003. Outbreak of tuberculosis in a 2000-year-old Chinese population // Kansenshogaku Zasshi, 77: 146–149.
- Gao Qiang, Lee Yun Kuen.** 1993. A biological perspective on Yangshao kinship // J. Anthropol. Archaeol., 12: 266–298.
- Larsen C.S.** 1995. Biological changes in human populations with agriculture // Ann. Rev. Anthropol., 24: 185–213.
- Li L.** 2004. The Chinese Neolithic: Trajectories to Early States. Cambridge University Press.
- Lordkipanidze D., Vekua A., Ferring R., Rightmire G.P., Agusti J., Kiladze G.** 2005. The earliest toothless hominin skull // Nature, 434: 717–718.
- Lovell N.C.** 1997. Trauma analysis in paleopathology // Am. J. Phys. Anthropol., 40: 139–170.
- Ma Xiaolin.** 2005. Emergent Social Complexity in the Yangshao Culture: Analyses of settlement patterns and faunal remains from Lingbao, western Henan, China (c. 4900–3000 BC), BAR International Series, 1453.
- Ortner D.J., Putachar W.** 1985. Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains, Washington, D.C: Smithsonian Institution Press.
- Ortner D.J., Kimmerle E., Diez M.** 1999. Skeletal evidence of scurvy in archeological skeletal samples from Peru // Am. J. Phys. Anthropol., 108: 321–331.
- Ortner D.J., Butler W., Cafarella J., Milligan L.** 2001. Evidence of probable scurvy in subadults from archaeological sites in North America // Am. J. Phys. Anthropol., 114: 343–351.
- Suzuki Takao, Matsushita Takayuki, Han Kangxin.** 2005. On the possible case of treponematosi from the Bronze Age in China // Anthropol. Sci., 113: 253–258.
- Trinkaus E.** 1985. Pathology and the posture of the La Chapelle-aux-Saints Neandertal // Am. J. Phys. Anthropol., 67: 19–41.
- Li X., Harbottle G., Zhang I., Wang C.** 2003. The earliest writing? Sign use in the seventh millennium BC at Jiahu, Henan Province, China // Antiquity, 77: 31–44.
- Zhang J., Xiao X., Lee Yun Kuen.** 2004. The early development of music. Analysis of the Jiahu bone flutes // Antiquity, 78: 769–779.

*Перевод с английского Е. Петраш
(5-й выпуск биокласса)*

Изучение флоры

Н. Решетникова



Наталья Решетникова
(Бурлешина), 11-й выпуск
биокласса (Петрашевы),
школа № 520 (1989 г.),
закончила Биологический
факультет МГУ, к.б.н., науч-
ный сотрудник лаборатории
Гербарий, Главный ботани-
ческий сад им. Н.В. Цицина
РАН, nmreshet@rambler.ru

Флорой называют совокупность всех видов растений на определенной территории. Это понятие отличается от понятия «растительность» тем, что при изучении растительности основное внимание уделяется фитоценозам (растительным сообществам) и первоочередное значение составляющим их основу, растущим в большом числе видам. Флориста же интересуют все растения (и обычные, и редкие, и заносные). Знание всего (или почти всего) требует большого времени для запоминания и регулярной тренировки.



а



б



в



г

Рисунок 1. Изучение флоры.

(а) – гладиолус; (б) – клематис; (в) – бодяк польский; (г) – жабрица порезникова.

Обычно каждую весну думаешь, что многое позабыл, и не узнаешь очевидных растений, не вспоминаются давно выученные названия, но каждый раз все восстанавливается.

По поводу знания всех названий растений есть вообще-то два мнения. Одно — В.Шекспира: «Что имя... Роза пахнет розой, хоть розой назови ее, хоть нет». Другое — А.Тарковского:

... Я в детстве боялся растений:
Я был, как звереныш в капкане,
Боялся травы по колени,
Деревьев еще без названий.

Но матери белое платье
Дохнуло прохладой и силой,
И душу мою исцелило.

— Акация — хмель — медуница —
крапива — камыш — клещевина —
мать-мачеха — ясень — кислица —
рябина — крушина — калина...

Мне кажется, что скорее прав второй, и именно называя по-разному, мы получаем возможность видеть разные виды, различать их и выявлять их характерные особенности, свойства. Именно называя одним родом, мы можем оценить сходство и систематизировать наши знания, а называя вид — оценить значимость различий при идентификации образцов. С названиями растений можно манипулировать... Используя их, мы можем обозреть полнее и полноценнее разнообразие и красоту окружающего мира. (Умение видеть и оценивать картину мира распространяется, видимо, не только на растения: несколько человек, окончивших кафедру высших растений, стали отличными фотографами.)

Способность различать растения требует тренировки и специального навыка. В.Р. Филин говорил, что есть вещи, которые нельзя выучить умозрительно, по книгам, их можно только показать, и поэтому, чтобы не прерывалась уже накопленная нить знаний, должны существовать люди, сохраняющие и передающие эти умения.

Да, каждый вид имеет свои названия и свои признаки. Стараешься знать как можно больше, но всего ведь не упомнишь. И гораздо важнее для специалиста научиться не только узнавать зна-



Рисунок 2. Лютик круглолистный.

комые растения, но и видеть незнакомые. Нередко бывает, что люди находят и собирают новые виды, но не различают их, принимая за знакомый объект. Например, на территории национального парка «Смоленское Поозерье» ботаники Смоленского университета, изучавшие преимущественно морфологию растений и систематику отдельных групп, но не очень тогда интересовавшиеся флорой, различили 480 видов. При описании его территории мы отметили около 900. Таким образом, почти половину того, что встречалось у них под ногами, студенты и преподаватели из Смоленска тогда не узнавали, а в гербарии Смоленского университета мы (разбирая его уже вместе со смоленскими коллегами) нашли два вида, которые в России растут только в Смоленской области. Гербарные сборы были в хорошем состоянии, поэтому то, что они в начале были неправильно определены, это не главное — самое важное, что их все-таки заметили и нашли, переопределяют потом, а образец останется.

Все интересные находки обязательно должны подтверждаться гербарным материалом. Когда меня спрашивают, сколько хранится гербарный лист, — я не могу ответить на это вопрос. Способ сушки растений в бумаге и хранения засушенных образцов был изобретен во времена Линнея — и образцы того времени до сих пор хранятся в знаменитых гербариях мира, а не только из них и у нас в МГУ им М.В. Ломоносова. Там же хранятся, например, и коллекции XIX века, присланные математику Цингеру, который решил подсчитать, как распространены растения по Средней России. Для этого он разослал циркуляры с просьбой собирать гербарии в лесничества, университеты и гимназии. Ему прислали более 330 крупных коллекций любителей из всех губерний Средней России. Гербарий собирали и Главный лесничий Смоленской губернии, и гимназистка первого класса Калуж-

ской гимназии, и старший лесной ревизор Костромской, и крестьянин Лезгунка из Нижегородской губернии, и княжна Голицына, и «неизвестная» из Смоленска, и многие студенты разных университетов, и известные ботаники Д.И. Литвинов, А.Ф. Флеров, М.И. Голенкин и другие, а самое главное — многие любители флоры. В результате вышла книга, которой ботаники пользуются до сих пор. Все эти сборы хранятся и сейчас в МГУ. Московские ботаники, создавшие школу гербаризации, и в первую очередь П.Ю. Смирнов, А.К. Скворцов, В.Н. Тихомиров (в отличие от питерской школы) считали, что растения не только должны быть собраны правильно, но и собраны красиво. На студенческой практике неудачно собранные образцы В.Н. Тихомиров кидал под стол «козе». Хорошо засушенные растения сохраняют свежий цвет по крайней мере 50, а то и 100 лет (а что будет дальше — посмотрим). Гербарный лист — уникальный документ, отражающий историю не только флоры, например, в МГУ Д.Д. Соколов видел сборы В.Н. Вехова, сделанные под Сталинградом, где он находился в действующей армии в 1943 г. Наверное, не мог не собрать. Разбирая растения и собирая гербарий, сам иногда ощущаешь, что существуешь вне времени.

Новое (или интересное) растение собрано, теперь его находку нужно правильно определить. Процесс определения напоминает иногда детектив. Есть подозрения, догадки, и в ходе чтения ключа они или подтверждаются, или опровергаются, снова догадки, подозрения, озарение — ура, «победа разума». Особенно приятно, когда находка редкая или новая. При поисках новых видов азарт охотника или первооткрывателя каждый раз захватывает и позволяет заново удивляться (чем больше знаешь, тем больше не понимаешь). У опытных флористов



Рисунок 3. Озеро Тишь.

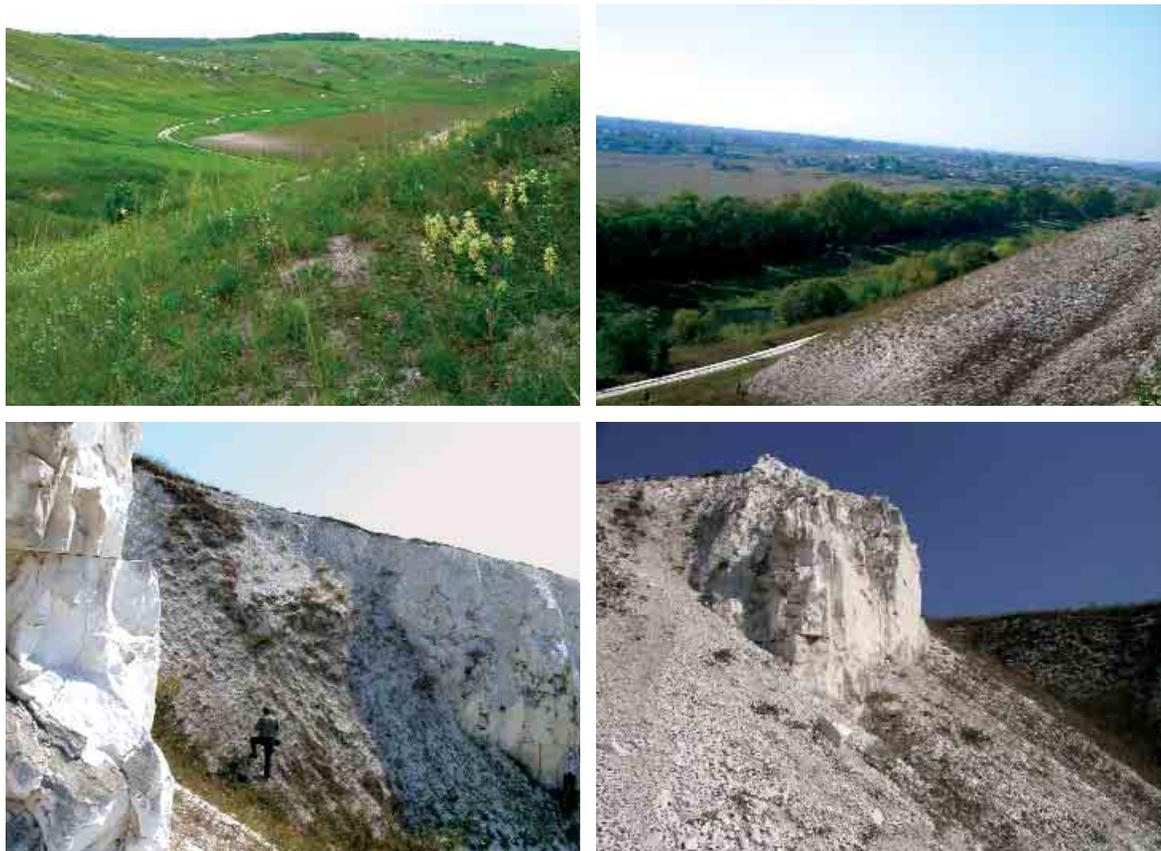


Рисунок 4. Белгородская область.

вырабатывается чутье, они «чуют», где искать. Сначала студент идет и радуется: «о, я это знаю, и это знаю», потом идет и радуется «всё знаю» (многие, к сожалению, останавливаются на уровне «всё знаю»), потом «всё знаю, а вот это и это не знаю» — и если работают дальше, то становятся специалистами, специалист ищет: «это знаю, это знаю, а дай-ка я посмотрю в той ложбинке — ура, это счастье — не знаю, что нашел». Начинается самое интересное: разобраться с летними сборами. Иногда, чтобы придумать название, уходит не один год.

Где сейчас актуально изучение флоры? Кому нужны люди, различающие много видов?

1. Основные «клиенты», использующие знания флориста, — это национальные парки и заповедники, которым важно знать, во-первых, что они сохраняют, во-вторых, какими ресурсами растений располагают. Поэтому все хорошие флористы — желанные гости на охраняемых территориях, и все лето есть возможность ездить по интереснейшим экспедициям и необыкновенно красивым местам.

2. Вообще в ботанике понятие «вид» неразрывно связано с территорией, на которой он обитает (академик Комаров давал определение вида как «морфологическая структура, помноженная

на географическую определенность»), поэтому сведения о распространении видов — это основа и их систематики.

3. При обследовании растительных ресурсов областей, или выявлении новых ценных и нуждающихся в охране территорий нельзя обойтись без конкретных данных о растениях.

4. Иногда к нам обращаются люди, использующие растения, которым нужны знания об определенных видах, их признаках и распространении на какой-либо территории, — молекулярные биологи, фитотерапевты, врачи, люди, изучающие аллергические реакции на растения, историки и пр.

Но знания о составе флоры имеют ценность и сами по себе. В.Н. Тихомиров в одной из своих начальных лекций говорил, что мир, в котором мы живем сейчас, «антропоцентричен», и это не изменилось со времен Аристотеля: «Человек есть мера всего», но, по-видимому, будущее за «биоцентрическим» мышлением, когда будут осознаны общие связи биологических видов. Е.Вилсон (цит. по А.К. Скворцову, 2005) сформулировал: «каждая страна имеет три достояния: материальное, культурное и биологическое. К биологическому богатству страны мы относимся недостаточно серьезно.



Рисунок 5. Рдейский заповедник.

Это крупная стратегическая ошибка, и о ней с течением времени мы будем сожалеть все больше». А.К.Скворцов писал, что мы не можем измерить ценности вида. Каждый вид невосполним. Нельзя считать человека вершиной эволюции, т.к. история «любого существующего сейчас организма, будь то человек, одуванчик, морской еж и т.д., можно протянуть до самых первичных начатков жизни. Можно нарисовать эту линию восходящей прямой, и принять за изначально заданное генеральное направление эволюции. И если бы морской еж мог рассуждать о филогенезе, целью и вершиной направленной эволюции он обозначил бы себя». Мне кажется, что это можно ощутить по аналогии: как я представляю собой целую бесконечную вселенную ощущений и воображения — вообще могу вообразить бесконечность вселенной, которая помещается во мне, так и другой человек, или вид представляет собой бесконечность. Без возможности увидеть и различить растения мы не сможем разобраться в закономерностях существующего под ногами мира.

Сейчас в знаниях по флоре России заканчивается описательный период, начавшийся с XIX века. Почти по всем областям уже есть данные по распространению видов, хотя некоторые

из них уже довольно устарели. Самая неизученная из областей средней России — пожалуй, Смоленская, я как раз работаю над описанием ее флоры: в определитель растений Смоленской области Я.Я. Алексеева включено всего 411 наиболее распространенных видов, в то время как, по нашим данным, в ней отмечено не менее 1200 видов, а из ряда районов вообще нет сведений о флоре.

Но выявить состав произрастающих растений — это только начало, основные данные, на основе которых далее начинается другой этап работы. Нужно найти участки территории, которые необходимо охранять, потому что если этого не сделать сейчас, через 50 лет будет уже поздно. А все относящееся к закономерностям формирования флоры — спорно и почти не изучено.

Почему один вид сменяет другой, насколько можно полагаться на индикаторную роль видов? Что является экологическим оптимумом вида и к чему можно относить эти понятия? В современной ботанике и фитоценологии нет ни общего мнения по этим вопросам, ни точных критериев их определения. Неясны закономерности смены биоценозов. Принадлежность растений к определенным группам определяется заранее: часто, допустим, говорят, что адокса мускусная — это



Рисунок 6. Река Ока.

растение широколиственных лесов. Между тем она растет и в тундрах, а образцы, вывезенные из тундры А.К. Скворцовым, не смогли выжить в Подмоскovie, несмотря на бережный уход. Часто можно слышать о том, что во флоре такое-то

число растений относится к растениям лесов, лугов, опушек, болот, но не потому, что они там росли, а потому, что они кем-либо были отнесены туда. Анализы флор и сравнения их по составу видов, обычно делаемые в дипломных и кандидатских работах, звучат так: так как большинство видов флоры — это виды с голарктическим (или бореальным и т.д.) ареалом, мы имеем дело с голарктической (или бореальной и т.д.) флорой. Между тем это было ясно и до начала исследований. А.В. Щербаков для сравнения провел анализ видов, найденных в четные дни и в нечетные дни отдельно, и нашел, что имеет дело с разными территориями — на основании принятых сейчас, по его выражению, «бухгалтерских анализов». Собственно «научная», а не описательная часть флористики пока еще в зачатке, почти не известны общие закономерности (типа физических законов), но тем больший простор для нашей дальнейшей деятельности.

Возрождение запаха

И. Гутерман



*Инна Гутерман
12-й выпуск (Школа
Лобачевского), школа
№ 520 (1990 г.), закончила
Московский Институт тон-
кой химической технологии
(1996 г.), к.б.н., научный
сотрудник в Университете
Йорка (Великобритания),
inna.guterman@gmail.com*

Очень давно, когда я еще жила в Москве, мне иногда дарили розы. Их можно было купить даже зимой, в мороз. Продавцы тогда прятали все цветы в такие стеклянные аквариумы и в них жгли для обогрева свечи. Розы были бордовые на высоких толстых и очень колючих стеблях. Форма бутона и цвет — все было прекрасно, и стояли розы в вазе на удивительно долго. До полного совершенства им не хватало только одного маленького, но важного штриха — запаха.

Через несколько лет, уже совсем в другой стране, мне вновь пришлось столкнуться с розами. Они предстали передо мной совсем в иной роли — объекта исследования. Я искала работу и пришла в Иерусалимский университет на факультет сельского хозяйства, где мне предложили делать диссертацию на тему «Геномика лепестков роз: идентификация и изучение новых генов, формирующих запах роз». Тема звучала весьма романтически и мне понравилась. Итак, можно ли вернуть розам их нежный аромат?

Что такое цветочный запах?

Большинство растений способны воздействовать на рецепторы человека, вызывая определенные обонятельные ощущения. Химическое различие между «приятным» и «неприятным» запахом может быть очень незначительным. При этом композиции одних и тех же веществ, взятых в различных концентрациях, могут ассоциироваться с совершенно различными запахами. Вещества, обладающие запахом, являются легко летучими, липофильными, легко диффундируют через мембрану и испаряются в атмосферу. Известно уже более 1000 летучих веществ (ЛВ),

синтезируемых растениями, и это количество увеличивается, поскольку появляются новые, более чувствительные, методы анализа ЛВ.

ЛВ синтезируются не только различными частями цветка, но и вегетативными частями растения (листьями, корнями и стеблем). Запахом могут обладать также и плоды растения. Спектр выделяемых веществ изменяется в зависимости от стадии развития, времени суток, а также от воздействий на растение в целом (например, стресс или повреждение).

ЛВ растений относят к группе так называемых вторичных метаболитов, названных так потому, что они, в отличие от первичных метаболитов, не являются универсальными веществами, необходимыми для жизнедеятельности всех растений. Вторичные метаболиты служат для привлечения насекомых-опылителей, многие из них синтезируются в ответ на повреждение растения и являются токсичными для патогенных бактерий, грибов и других вредителей; известны также вещества, которые могут подавлять рост соседних растений. В плодах вторичные метаболиты играют роль консервантов, а также являются сигналом (вкус, цвет, запах) для животных, употребляющих данные плоды в пищу и осуществляющих таким образом распространение семян. Некоторые специфические вещества синтезируются растениями в ответ на стресс, например в условиях засухи или повышенного содержания в почве солей.

Химический состав запаха

Несмотря на все разнообразие растительных ЛВ, большинство их относится к трем основным группам: терпены, фенилпропаноиды/бензеноиды и производные жирных кислот.

Терпены являются производными изопрена и в зависимости от количества изопреновых звеньев подразделяются на моно-, ди- (гиббереллины), три- (стероиды), сескви- и тетра-терпены (каротиноиды). Всего известно более 20 000 терпенов, более половины которых обнаружены в растениях. Не все терпены летучи, компонентами запаха в основном являются моно-, ди- и сесквитерпены. Большинство растительных терпенов — вторичные метаболиты. Терпены гиббереллин и абсцизовая кислота — фитогормоны и

относятся к «первичным метаболитам». Предшественником всех растительных терпенов является изопентенил дифосфат (IPP), который синтезируется как в цитоплазме (acetate/mevalonate pathway), так и в пластидах (pyruvate/glyceraldehyde-3-phosphate pathway).

Фенилпропаноиды (включая и бензеноиды) являются производными фенилаланина (L-Phe). Путь биосинтеза фенилпропаноидов пока не полностью изучен. Ключевым ферментом биосинтеза фенилаланина является фенилаланин аммоний-лиаза (PAL), дальнейшие превращения включают в себя реакции гидроксирования, метилирования и ацетилирования.

Летучие спирты и альдегиды образуются в результате деградации фосфолипидов и жирных кислот под действием липоксигеназ, гидропероксидаз, изомераз и дегидрогеназ.

Как собрать запах?

Для изучения химического состава запаха используются в основном различные хроматографические методы. Особенно часто применяют газовые или жидкостные хроматографы в сочетании с масс-спектрометрией (GC-MS или LC/MS).

Уже в Древнем Египте использовали ароматические масляные экстракты, которые изготавливали из различных трав и цветов. В современном варианте в качестве растворителя используют спирт, хлороформ и некоторые другие органические растворители. Существенным недостатком полученного экстракта является то, что кроме пахучих веществ в него попадают другие химические компоненты, причем в концентрациях, превышающих концентрации ЛВ в десятки, а иногда и сотни раз. Анализ такой смеси хроматографическими методами — задача весьма затруднительная.

Для изучения запаха больше подходят методы, позволяющие уловить и сконцентрировать именно легколетучие вещества, так называемый «анализ свободного пространства» (headspace). Например, метод твердофазной микроэкстракции (SPME) использует свойство определенных полимеров поглощать запахи. Тонкий стержень из такого полимерного материала инкубируют в плотно закрытом сосуде вместе с растением в течение 10–30 минут. Затем стержень вынимают и помещают в инжектор хроматографической колонки, где он нагревается до температуры 200–250 °С. При нагреве адсорбированные полимером молекулы высвобождаются и попадают в колонку, где тем или иным способом подвергаются фракционированию. Метод этот хорош

своей высокой чувствительностью, а также быстротой и простотой использования. Однако есть у него и определенные недостатки: из-за избирательности процесса адсорбции нельзя судить о количествах компонентов в анализируемой смеси, кроме того, на полимер могут адсорбироваться и совсем посторонние молекулы, например те, которые находились в помещении, где проводился анализ.

Название другого метода в буквальном переводе с английского звучит как «ловушка» (trapping). Метод заключается в том, что растение или какую-то его часть помещают в закрытый сосуд, через который с помощью насоса медленно прокачивается воздух. Подача воздуха осуществляется через фильтр. Запах адсорбируется на другом фильтре, который находится на выходе из сосуда. Для сбора запаха используют специальные полимеры. После окончания эксперимента полимер промывают растворителем (например, гексаном) и таким образом получают «экстракт чистого запаха». Этот метод позволяет судить не только о качественном, но и количественном составе запаха, а также сравнивать состав запаха, выделяемого растением в определенном промежутке времени (например, сравнить состав веществ, выделяемых одним и тем же растением в течение дня и ночи).

На каких растениях изучают запах?

В течение многих лет исследование запаха сводилось в основном к изучению химической структуры пахучих веществ и налаживанию их синтеза в промышленных количествах для применения в косметической и пищевой промышленности. При этом биохимические пути синтеза и механизмы регуляции выделения ЛВ до недавних пор не были объектом пристального изучения (Shalit *et al.*, 2003). Возможно, основной причиной такого невнимания было отсутствие методов, позволяющих регистрировать и определять компоненты запаха *in vivo*. Кроме того, использование наиболее популярного среди растительных биологов модельного растения *Arabidopsis thaliana* до недавнего времени казалось невозможным. Для молекулярных биологов арабидопсис представляет собой почти идеальную модель: высокоплодовитое, миниатюрное растение с небольшим по размеру геномом (5 хромосом общим размером 125 млн пар оснований) и коротким (около 6 недель от прорастания до зрелого семени) жизненным циклом является удобным для классического мутационного и генетического анализа. Геном *Arabidopsis* был полностью секвенирован еще в 2000 г.

Метод трансформации — внедрения в растение чужеродных генов — для арабидопсиса значительно проще и эффективнее, чем для всех остальных растений. Существует база данных <http://www.arabidopsis.org/>, в которой можно найти очень много информации, а также заказать семена. К сожалению, запах у арабидопсиса слабый, и только в 2003 г. ученым удалось проанализировать его состав методом твердофазной микроэкстракции (SPME) и установить, что более 60% выделяемых арабидопсисом летучих веществ относятся к группе терпеноидов. Таким образом, многие важные составляющие запаха других растений, а следовательно и гены, регулирующие выработку этих веществ, у арабидопсиса отсутствуют.

При сравнении данных о количестве секвенированных растительных транскриптов (см. сайт http://plantta.tigr.org/cgi-bin/plantta_release.pl) становится понятно, что и другие интенсивно изучаемые растения — рис, пшеница, картофель, помидоры, кукуруза — не могут являться хорошей моделью для экспериментов с запахом. Для исследования ЛВ используются менее «популярные», но обладающие более сильным запахом растения: кларкия Бревери (*Clarkia breweri*), львиный зев (*Antirrhinum majus*), садовая петуния (*Petunia × hybrida*), клубника (*Fragaria × ananassa*). В последние годы особенно модным стал глобальный подход, позволяющий работать с такими «непопулярными» растениями. Этот подход получил название «OMICS» и происходит от терминов геномика (genomics), транскриптомика (transcriptomics), протеомика (proteomics) и метаболомика (metabolomics). Геномика позволяет изучить геном организма в целом, транскриптомика определяет, какие гены экспрессируются в заданный момент времени, протеомика дает информацию о белках, а метаболомика составляет профайл метаболитов. Соотнесение этих данных дает возможность идентифицировать новые гены и определить функции уже известных.

Можно ли вернуть улетучившийся запах?

Садовые розы (*Rosa × hybrida*) обладают сильным запахом, химический состав которого включает весь спектр растительных ЛВ: терпены, фенилпропаноиды и производные жирных кислот. Интересен тот факт, что большинство роз, предназначенных для срезания, хотя и не увядают долго, не обладают классическим «розовым» ароматом, который имеется у садовых роз. В процессе селекции наиболее устойчивых сортов куда-то исчез запах!

Казалось бы, вернуть запах не так уж сложно. Найти соответствующий ген, трансформировать его в растение и... К сожалению, все не так просто.

Методы трансформации многих «немодельных» растений еще не разработаны, к их числу относятся и розы.

Часто лимитирующим фактором в биосинтезе тех или иных веществ служит количество прекурсора (молекулы-предшественника, из которой в одну или несколько стадий синтезируют конечный продукт). В таком случае избыточная экспрессия (оверэкспрессия) любого гена, участвующего в превращении прекурсора в продукт, не приводит к увеличению количества последнего (Dudareva *et al.*, 2000)

Биосинтез каждого компонента запаха — многоступенчатый процесс, осуществляемый различными ферментами. Поэтому внедрение в геном растения одного работающего гена чаще всего недостаточно для изменения запаха в целом. Иногда, даже имея дело с одноступенчатым биохимическим превращением, не удается достичь желаемого эффекта. Например, монотерпен линалол образуется из изопрена под действием фермента линалол-монотерпенсинтазы и является одним из важных компонентов запаха. Внедрение в геном петунии гена линалол-монотерпенсинтазы не привело к изменению содержания линалола выделяемого растением. Оказалось, что линалол образуется, но претерпевает реакцию модификации (гликозилирования), а гликозилированный линалол не является летучим (Lucke *et al.*, 2001). В запахе гвоздики, трансформированной тем же геном, количество линалола повысилось и составило 10% от общего количества выделяемых ЛВ. Однако, на «обонятельном восприятии» запаха наличие этого нового компонента никак не отразилось (Lavy *et al.*, 2002).

То же произошло и с геном — сесквитерпенсинтазой гермакрена-Д, — клонированным из роз и трансформированным в петунию. В цветках петунии дикого типа присутствует природный гермакрен Д, что подтверждает наличие необходимого субстрата. Однако у трансформированных растений не было обнаружено значимого увеличения концентрации выделяемого гермакрена Д.

Оверэкспрессия в петунии другого гена, клонированного из роз, ацетилтрансферазы (фермента, преобразующего спирт в ацетат), позволила изменить содержание ацетатов в запахе трансформированных растений (Guterman *et al.*, 2006).

Более детальное изучение путей образования компонентов запаха, а также их взаимосвязи

с другими биохимическими процессами (первичного и вторичного метаболизма), происходящими в клетках, позволит в будущем более направленно воздействовать не только на запах, но и на другие свойства растений. К настоящему моменту довольно большие успехи достигнуты, например, в изучении метаболизма терпенов (Aharoni *et al.*, 2005).

Литература

Dudareva N., Murfitt L., Mann C., Gorenstein N., Kolosova N., Kish C., Bonham C., Wood K. 2000. Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers // *Plant Cell*, 12: 949–962.

Lucker J., Bouwmeester J., Schwab W., Blaas J., van der Plas L., Verhoeven H. 2001. Expression of *Clarkia* S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl- β -D-glucopyranoside // *Plant J.*, 27: 315–324.

Lavy M., Zuker A., Larkov O., Ravid U., Lewinsohn E., Vainstein A., Weiss D. 2002. Linalool and linalool oxide production in



Рисунок 1. Роза не как объект исследования, а как подарок.

transgenic carnation flowers expressing the *Clarkia breweri* linalool-synthase gene // *Mol. Breed.*, 9: 103–111.

Guterman I., Masci T., Chen X., Negre F., Pichersky E., Dudareva N., Weiss D., Vainstein A. 2006. Generation of phenylpropanoid pathway-derived volatiles in transgenic plants: rose alcohol acetyltransferase produces phenylethyl acetate and benzyl acetate in petunia flowers // *Plant Mol Biol.*, 60: 555–563.

Aharoni A., Jongsma M., Bouwmeester H. 2005. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants // *TRENDS in Plant Science*, 10: 594–602.

Эволюционная ботаника: так много вопросов на поставленные ответы

Д. Соколов



Дмитрий Соколов
12-й выпуск биокласса
(Школа Лобачевского),
школа № 520 (1990 г.),
д.б.н., профессор кафедры
высших растений биологического факультета МГУ,
sokoloff-V@yandex.ru

Общаясь с коллегами и знакомыми, которые по роду занятий далеки от ботаники, иногда встречаешься с мнением, что в нашей науке все основные факты давно установлены, и, соответственно, с вопросом: чем, собственно, может нас увлечь современная ботаника? Другой вариант представлений о ботанике (думаю, как и о зоологии) состоит в том, что все структурные особенности высших растений уже давно и хорошо известны ученым, но их эволюционная интерпретация на современном уровне возможна только на основе использования арсенала методов молекулярной биологии.

В этой статье я попробую показать, как выглядит современная эволюционная ботаника изнутри, т.е. глазами человека, который работает в этой области. Я буду тенденциозен в том смысле, что отобранные примеры и в особенности — ссылки на литературу не претендуют на полноту охвата проблем современной науки. Они выбраны просто потому, что привлекали меня либо в научной работе, либо при подготовке к лекциям. Очень важны революционные открытия в области молекулярной генетики развития, которые имеют непосредственные эволюционные приложения, однако мы не имеем возможности здесь остановиться на них.

Миф о том, что разнообразие высших растений уже хорошо описано

Чтобы немного рассеять этот широко распространенный у неспециалистов миф, достаточно познакомиться с современной литерату-

рой по тропическим растениям. Для начала можно открыть журнал *Adansonia*, который издает Национальный Музей Естественной истории в Париже. Кстати, посмотреть этот журнал можно и в Интернете (<http://www.mnhn.fr/publication/adanson>). Почти все статьи в этом журнале посвящены описанию новых видов, а нередко и родов растений — преимущественно из трех районов: Новой Каледонии, Мадагаскара и Французской Гвианы. Особое внимание к этим трем районам связано не только с тем, что их флора особенно интересна, но и с тем, что это традиционные районы исследований французских ботаников. Вот одна из многих подобных ей статей в журнале *Adansonia* (Miller, 2002). Она посвящена роду *Ehretia* из семейства бурачниковые (Boraginaceae). В отличие от знакомых нам по Средней России бурачниковых, виды этого рода представляют собой кустарники и деревья, то есть являются крупными и заметными растениями. Они интересны также и тем, что их плоды, в отличие от большинства наших бурачниковых, не отделяют односемянных частей (эремов) и являются сочными. В общем, интересное растение. Однако в последний раз его систему в объеме мировой флоры рассматривали только в XIX веке. J.S. Miller (2002) изучил род *Ehretia* на Мадагаскаре и Коморских островах. На этой территории он выделяет 7 видов рода. Из них 2 встречаются не только на этих островах, но и на материковой Африке. Пять видов встречаются только на Мадагаскаре и Коморских островах. Все они впервые для науки описаны в данной статье.

Общение с ботаниками, работающими в тропиках, вызывает противоречивые чувства... Во время поездки в Ботанический сад Кью (это крупнейший ботанический центр, расположенный в пригороде Лондона) нам довелось познакомиться с профессором Робертом Джеймсом Джонсом и даже жить в его доме. Профессор Джонс всю жизнь изучает флору Новой Гвинеи. Весь его дом до отказа заполнен уникальной коллекцией предметов искусства аборигенов, которой позавидует любой музей. То и дело спотыкаешься о колчан со стрелами или деревянную человеческую фигурку. На стене рисунок одного из видов рода банан. Оказывается, этот

вид профессор открыл в природе, и он оказался новым для науки. Вообще, по оценкам профессора Джонса, флора Новой Гвинеи описана сейчас лишь примерно наполовину. В его рассказы о своих находках новых видов трудно поверить. Так, он открыл чуть ли не сотню новых для науки видов древовидных папоротников из рода *Syathea*. Однажды профессор упомянул о нескольких десятках открытых недавно новых видов рода *Vaccinium*. К этому роду относятся всем известные черника, голубика, клюква, брусника, причем на территории бывшего СССР род представлен не более чем 13 видами. Мы, конечно, спросили профессора Джонса о вкусовых качествах новых видов, но он замялся и сказал, что не пробовал плоды на вкус: было так много всего другого интересного, что об этом он не подумал. Надо сказать, что далеко не все открытые виды описаны по научным правилам и получили латинские названия. Многие из них дожидаются, пока у ученых найдется время их описать. В случае с коллекциями профессора Джонса это время может наступить не скоро, так как по достижении возраста 60 лет ему пришлось выйти на пенсию: таковы английские законы.

Можно ли найти что-то новое в умеренной зоне? Труднее, но тоже можно. Несколько лет назад у нас появилась студентка Света Панкова (сейчас Беэр), которая во время практики на Белом море сказала, что хочет заниматься систематикой солеросов (*Salicornia*). Это растения засоленных местообитаний, которые встречаются как по берегам морей, так и на засоленных внутриконтинентальных местообитаниях. Чтобы студентка познакомилась с этим вторым типом сообществ, где растут солеросы, мы направили ее в Ростовскую область. Чуть ли не на первой экскурсии она совместно с ботаником из Ростовского университета О.Н. Деминной нашла растения, которые нельзя было определить иначе как новый для науки вид, причем признак, которым он отличается от ранее известных растений, никогда раньше в роде солерос не отмечали (Beer, Demina, 2005).

Ботаники открывают не только новые виды, но и роды.

Род *Wollemia* с единственным видом *W. nobilis* (рисунок 1) был открыт в 1994 г. в Австралии, в 150 км от Сиднея. Это хвойное растение из семейства араукариевые. Ранее в этом семействе было известно только два современных рода. В ископаемом состоянии растения, похожие на *Wollemia*, были хорошо известны, но эти растения считали вымершими. Найденная популяция *Wollemia* (точное местонахождение которой держат в строжайшей тайне) включает только 40 взрослых и около 200 молодых растений.



Рисунок 1. *Wollemia nobilis* в ботаническом саду в Аделаиде (Австралия).

Сейчас это растение есть и в Главном ботаническом саду в Москве. Культивирование воллемии разрешается только за решеткой, видимо, из соображений безопасности такого редкого и уязвимого существа. Здесь и далее фото М.В. Ремизовой.

Единственный вид рода *Ticodendron* обнаружен в конце 1980-х гг. в Центральной Америке. Это крупное дерево, местами даже локально лесообразующая порода. Сначала думали, что *Ticodendron* настолько своеобразен, что выделили его в особое семейство, но потом пришли к выводу, что его следует относить к семейству березовые. Это первое известное нам вечнозеленое растение из семейства березовые и первый представитель семейства с сочными плодами.

Как возможны столь впечатляющие находки новых для науки крупных деревьев? Дело в том, что разнообразие деревьев в тропиках очень велико. Изучать же их крайне трудно, так как с земли видны только уходящие вверх стволы. Хорошие результаты дает применение вертолета.

Особый интерес ботаников вызвало открытие рода *Lacandonia*. Единственный вид этого рода был открыт в Мексике (Martinez, Ramos, 1989). Как и в случае с *Ticodendron*, его первоначально отнесли к особому семейству, но позже было показано, что *Lacandonia* лучше включать в семейство триурисовые (Triuridaceae). Триурисовые — экзотическое семейство однодольных растений. Все его представители — бесхлорофилльные травянистые растения, живущие в симбиозе с грибами и за счет этого получающие органические вещества (так же как, например, наши орхидеи гнездовка и ладьян). Необычен цветок лакандонии. Он имеет 6 листочков околоцветника, большое число пестиков и 3 тычинки, расположенные в центре цветка. Все известные ранее у растений обоеполые цветки, как мы знаем из школьной программы, имеют пестики в центре, а тычинки — по периферии цветка. У лакандонии — все наоборот, так что



Рисунок 2. Одна из скульптур из Монастыря 10 000 Будд в Гонконге.

Примерно такого рода «сбои» в реализации программы развития могли быть причиной необычного положения тычинок и пестиков в цветке лакандонии.

цветок как бы вывернут наизнанку. Это открытие всколыхнуло научную общественность. Была выдвинута гипотеза (Rudall, 2003) о том, что так называемый «цветок» лакандонии — на самом деле не цветок, а сильно напоминающее цветок соцветие (наподобие корзинки сложноцветных). Каждая тычинка — это отдельный мужской цветок, а каждый пестик — женский. Более взвешенная точка зрения состоит в том, что в ходе эволюции семейства триурисовые имели место нарушения в характере генетической регуляции процессов развития цветка (подробнее см. Vergara-Silva *et al.*, 2003; Ambrose *et al.*, 2006; Rudall, Bateman, 2006). В результате время и место реализации определенных событий в ходе развития репродуктивных органов оказалось нарушенным (рисунок 2), и возникла структура, которая сочетает в себе особенности цветка и особенности соцветия. Дальнейшие исследования семейства триурисовые позволили найти также отдельные растения (это не новый вид, а форма изменчивости ранее известного вида) с необычными цветками, где тычинки и пестики разделены по секторам, а не один тип органов вокруг другого (Vergara-Silva *et al.*, 2003). Это уже явно результат нарушений в программе развития цветка.

Следует отметить, что даже цветки «нормальных» триурисовых выглядят «белой вороной» по сравнению с прочими однодольными (описывать это здесь в деталях было бы слишком утомительно). Стоит ли вообще принимать во внимание данные по этому небольшому и явно маргинальному семейству, особенно учитывая несомненно вторичный характер их бесхлорофилльного образа жизни? Стоит ли обсуждать его, скажем, в общем курсе лекций по ботанике? Казалось бы — не стоит. Однако оказалось, что одни из самых древних известных науке ископа-

емых цветков (Gandolfo *et al.*, 1998, 2002), несомненно, относящихся к однодольным растениям, очень похожи на цветки некоторых современных триурисовых. Как говорится, лучше бы нам этого не знать, спокойнее бы спали. Ведь вопросов эти данные рожают больше, чем ответов. Ископаемые цветки найдены изолированно. Мы ничего не знаем о том, были ли эти растения, например, бесхлорофилльными, ли нет.

Пожалуй, наиболее значительная из находок последнего времени — детальное описание мохообразного растения с необычным названием *Takakia*¹. Нельзя сказать, что оно было открыто недавно, однако все стадии жизненного цикла (и то только у одного из двух видов рода!) были описаны гораздо позже, и это заставило решительно пересмотреть представления о родственных связях растения. Как известно, мохообразные — это группа высших растений, у представителей которой в жизненном цикле доминирует гаплоидная фаза — гаметофит. На нем развиваются половые органы: антеридии (с мужскими гаметами — сперматозоидами) и архегонии (с яйцеклеткой). После оплодотворения образуется зигота, а из нее прямо на месте развивается диплоидный спорофит, который всю жизнь получает минеральные и органические вещества от гаметофита. Спорофит образует коробочку, где в результате мейоза появляются гаплоидные споры, из которых вновь вырастает гаметофит. *Takakia*, как и многие другие мохообразные, двудомна, т.е. имеет мужской гаметофит (с антеридиями) и женский (с архегониями). Мужские растения *Takakia* были найдены только в 1988 г., а в 1990 г. были обнаружены спорофиты с коробочками. Группа мохообразных включает три отдела: собственно мхи (например, сфагнум, кукушкин лен), печеночники (например, маршанция) и антоцеротовые. Коробочка *Takakia* имеет совершенно уникальное строение. Она вскрывается одной щелью, идущей косо по спирали вдоль стенки коробочки. Несколько похожее строение имеют некоторые печеночники, но ничего подобного не бывает у мхов и антоцеротовых. Зато коробочка *Takakia* имеет в центре тяж клеток, не образующих споры, — так называемую колонку. Это уже признак мхов и антоцеротовых. Анализируя большое число морфологических признаков, приходится признать, что *Takakia*, вероятно, представляет собой особый отдел, равнозначный мхам, антоцеротовым и печеночникам (по крайней мере, так ее трактует В.Р. Филин

¹ Качественные фотографии такакии легко найти в Интернете, например, на <http://www.science.siu.edu/landplants/Bryophyta/bryophyta.html>.

в разделе о мохообразных для неопубликованного еще нового учебника по систематике высших растений). Изучение *Takakia* дает крайне много важной информации для понимания путей эволюции высших растений в целом. Кстати, *Takakia* вполне может быть обнаружена в России, т.к. она известна из сопредельных Японии и Алеутских островов.

Еще одно необычное мохообразное, найденное и описанное в самое последнее время, — *Ambuchanania* (интересно происхождение названия — от имени ботаника А.М. Buchanan). Это мох из класса сфагновых (Sphagnopsida). Раньше считали, что этот класс включает только один род — сфагнум. Новый род настолько своеобразен, что его выделяют в особое семейство и порядок. Растет этот мох в Тасмании. Растение почти полностью погружено во влажный кварцевый песок. Интересный новый папоротник описан недавно из Кореи (Sun *et al.*, 2001). Он оказался представителем неизвестного ранее науке рода из семейства ужовниковые (Orchioglossaceae). К этому семейству, помимо широко известных ужовника и гроздовника, относили ранее еще только один экзотический род. Новый род (он описан под названием *Mankyuua*) будет четвертым в этом исключительно интересном семействе, которое настолько обособлено, что выделяется в особый класс. Все говорит о глубочайшей древности ужовниковых, но их ископаемые представители практически неизвестны. Поэтому находка еще одного современного рода представляет большой интерес. Кстати, несмотря на тщательнейшие поиски, *Mankyuua* известна пока только в виде одной маленькой популяции в небольшом понижении среди леса на одном из принадлежащих Корее островов.

Молекулярная революция в эволюционной ботанике

Перспективность использования данных о последовательностях нуклеотидов в ДНК для выяснения родственных связей между различными живыми организмами стала ясна вскоре после выяснения роли ДНК как хранителя генетической информации. Уже к началу 1970-х гг., во многом советскими учеными (Антонов, 2000), были сформулированы основные принципы геносистематики. Однако исследования в этой области привлекли широкое внимание ботаников классического направления только в самом конце 1980-х — начале 1990-х гг.

Отношение ботаников к молекулярно-филогенетическим построениям было (и во многом остается) неоднозначным. Я очень хорошо пом-



Рисунок 3. Истод меловой (*Polygala cretacea*) в Дивногорье (Воронежская область).

ню мое первое знакомство с результатами в этой области. Это было в 1997 г., когда я писал кандидатскую диссертацию по систематике одной из групп бобовых растений. Статья, которую я прочитал, была посвящена молекулярным данным о родственных связях семейства бобовые (Doyle, 1995). Впечатление от нее было совершенно чудовищное. Казалось, невозможно представить себе ничего более вздорного, чем написанное в этой статье. Ни одна из обсуждавшихся ранее трех основных версий родственных связей бобовых не подтверждалась. Зато в числе прочих обсуждался вопрос о том, не являются ли бобовые ближайшими родственниками истодовых (Polygalaceae) (рисунок 3). Это выглядело как неудачная шутка. Дело в том, что цветки истода по внешнему облику и некоторым особенностям биологии опыления действительно напоминают цветки наиболее знакомых нам представителей бобовых, относящихся к эволюционно продвинутому подсемейству мотыльковые. Но, во-первых, у примитивных бобовых цветки устроены совершенно иначе (например, см. рисунок 4), а, во-вторых, нужно лишь немного присмотреться к истоду, чтобы понять, как сильно его цветков на самом деле отличается от цветка мотыльковых. Все черты сходства представляют собой аналогии, а не гомологии.



Рисунок 4. Цветки кассии (*Cassia*) — одного из относительно примитивных представителей бобовых — внешне совсем не похожи на цветки мотыльковых. (а) *Cassia brewsteri*; (б) *Cassia* sp.

Например, и истод, и мотыльковые имеют в цветке лодочку, но лодочка мотыльковых — это два сросшихся лепестка, а лодочка истода — это один лепесток. Кстати, следует отметить, что более новые молекулярно-филогенетические данные подтверждают родство между бобовыми и истодовыми. Но самое неприятное в той первой статье, с которой мне пришлось познакомиться, было в другом. А именно: совершенно неправдоподобным казалось не только положение истодовых и бобовых. Вообще, практически все семейства занимали на эволюционных деревьях абсолютно непривычное положение. Согласиться с этим было невозможно. После такого знакомства с новым направлением трудно было заставить себя прочитать другие работы по молекулярной систематике. Когда в 1998 г. я защищал диссертацию, я решил не обсуждать в ней молекулярные данные. Теперь я понимаю, что к этому времени уже были опубликованы подтвердившиеся позднее предварительные результаты, которые полностью меняют взгляды на систематическое положение тех растений, которые я описывал в своей диссертации.

Я решил описать свою первую встречу с молекулярной систематикой потому, что, вероятно, нечто похожее испытывали и многие другие ботаники. Будучи студентом и аспирантом МГУ в 1990–1998 гг., я имел лишь смутное представление о том, что в соседнем здании — в Институте физхимбиологии им. А.Н. Белозерского есть лаборатория Андрея Сергеевича Антонова, где занимаются геносистематикой. Я даже понятия не имел о том, что А.Н. Белозерский и А.С. Антонов стояли у истоков этой науки. Не только проблемы с финансированием в 1990-е гг., но и скептическое отношение к новому направлению многих ботаников стало причиной того, что объем молекулярных исследований эволюции растений, выполненных на Западе, многократно превышает объем отечественных исследований.

На основании молекулярно-филогенетических данных уже к 1998 г. была предложена новая система цветковых растений, так называемая система Angiosperm Phylogeny Group (сокращенно APG). Второе издание этой системы вышло в 2003 г. (APG II, 2003). Пять лет для такого молодого направления, как молекулярная систематика, — очень большой срок. За это время получено колоссальное количество новых данных. Вместе с тем, различия между системами 1998 и 2003 гг. относятся к вопросам, которые можно считать второстепенными. Кардинальных изменений не произошло и после 2003 г. Это значит, что молекулярно-филогенетические данные внутренне непротиворечивы. Они уже в значительной сте-

пени выдержали проверку временем. От них никак нельзя отмахиваться, как от назойливой мухи. Система Angiosperm Phylogeny Group сильно отличается от систем, созданных ранее на основании преимущественно сравнительно-морфологических данных².

Революционность этих различий связана не только с тем, что использование молекулярных данных привело к новым взглядам о родственных отношениях между растениями, иными словами к построению новых филогенетических деревьев. Помимо этого изменились и представления о том, каким образом данные о родстве между организмами должны быть отражены в системе. Традиционно считается, что все выделяемые систематические группы (таксоны: например, род, семейство, класс) должны быть монофилетичны. Под монофилией понимается происхождение всех представителей данной группы от одного общего предка. В 1960-е гг. возникло новое направление в эволюционной систематике, которое получило название кладизм. Его основатель — немецкий энтомолог Вилли Хенниг — предложил другое определение понятия монофилия. Он считал таксон монофилетическим только в том случае, если он включает всех потомков одного предка. Ключевым здесь было добавление слова «всех». Например, рептилии — монофилетическая в традиционном понимании группа, так как все ее представители происходят от общего предка. В понимании же кладистов это уже не монофилетическая группа, т.к. от рептилий произошли птицы, и, следовательно, группа рептилий не включает всех потомков ближайшего общего предка. Здесь не место останавливаться на аргументах, которыми обосновывал Хенниг свои построения (подробнее о кладизме см.: Павлинов, 1989, 1990). Важно то, что последователи Хеннига предложили формальные алгоритмы построения филогенетических деревьев на основании морфологических данных. Морфологические данные надо было для этого представить в упрощенной, матричной, форме, закодировав их в виде цифр. Например, признак: тип околоцветника; состояния признака: 0 — простой околоцветник, 1 — двойной околоцветник. Предложен-

² Подробный обзор на эту тему, а также систему, альтернативную системе APG, можно найти в статье А.Б. Шипунова (2003). С системой, очень близкой к системе APG, но более разработанной и представленной в удобной интерактивной форме, можно познакомиться на сайте <http://www.mobot.org/mobot/research/APweb/>. Там же можно найти ссылки на современную литературу по филогении и морфологии всех семейств цветковых растений.

ные кладистами алгоритмы построения филогенетических деревьев были весьма трудоемкими, зато их можно было реализовать в виде компьютерных программ. Весь комплекс идей и методов кладизма был тесно связан с желанием «объективизировать» эволюционную систематику, отойти от экспертной оценки (в какой-то степени предвзятой) опытного специалиста-систематика как основы для построения системы.

Большинство специалистов-систематиков отнеслись в 1970-е и 1980-е гг. к кладизму критически или вовсе игнорировали его существование. В отечественной ботанической литературе тех лет это направление подробно обсуждается, пожалуй, только в книге А.Л. Тахтаджяна (1987), который дал развернутую критику кладизма.

С появлением большого объема данных о последовательностях участков ДНК у разных организмов отношение к кладизму стало меняться. Молекулярные данные невозможно анализировать суммарно, образно, как это делают специалисты-систематики с морфологическими признаками растений. Например, встретив в природе лютик, мы обычно сразу видим, что это именно лютик (см. однако рисунок 5). Видим мы это по морфологическим особенностям, но не анализируем их признак за признаком. Просто мы узнаем лютик в лицо, как старого знакомого. С последовательностями нуклеотидов в ДНК так себя вести нельзя. Поэтому молекулярная систематика быстро восприняла алгоритмизированные методы построения филогенетических деревьев, в том числе те, что были разработаны в рамках кладизма. Одновременно с этим она автоматически восприняла и систему взглядов кладизма, а именно новое определение термина «монофилия». Когда стало ясно, какое колоссальное значение имеет молекулярная систематика, кладистические представления стали общепринятыми, особенно в западных странах.

Это большое отступление нужно для того, чтобы подчеркнуть: даже когда молекулярные данные о том, как выглядит какой-то фрагмент эволюционного древа, полностью совпадают с традиционными, на основании молекулярных данных может быть произведен радикальный пересмотр системы. Хороший пример в этом отношении — всем известное семейство норичниковые (*Scrophulariaceae*). Это семейство традиционно считали узловым звеном в эволюции крупной группы спайнолепестных двудольных. Считалось (на основании морфологических данных!), что от его древних представителей произошло несколько других семейств, в том числе подорожниковые, пузырчатковые, заразивые. В частности, около 100 лет назад была предложена гипотеза о том, что предки подо-



Рисунок 5. В большинстве случаев лютик может распознать каждый. Но для того чтобы узнать лютик в этом растении, сфотографированном в Швейцарии, надо уже обладать некоторым опытом.

рожниковых были ближайшими родственниками рода вероника из норичниковых. Именно это и было показано в результате молекулярно-филогенетических исследований. Какой же был сделан вывод? Семейство норичниковые в его традиционном понимании должно быть ликвидировано, т.к. оно не является монофилетической группой. В современных системах веронику относят к семейству подорожниковые, а в семейство заразивые перенесены относившиеся ранее к норичниковым полупаразитические растения, такие как марьянник, погребок, очанка и т.д. Лишь очень небольшое число растений — ближайших родственников норичника сохранено в семействе норичниковые.

Изменение представлений о понятии «монофилия» — сугубо социальное явление. Интересно, как со сменой поколения исследователей меняются общепринятые взгляды. Уверен, что многие современные выпускники западных университетов могут не представлять себе, что есть какое-то иное, кроме знакомого им, определение монофилии. Они могут не отдавать себе отчет о том, что книги по эволюции растений 1960-х или 1980-х гг. зачастую написаны на другом языке (кстати, это те книги, по которым зачастую продолжают учиться наши студенты). Это не плохие книги! Просто они на другом языке.

Чем же молекулярно-филогенетические деревья отличаются от традиционных эволюционных деревьев и что между ними общего? Прежде всего, по здравому размышлению, между ними очень много общего. Например, цветковые растения, как и предполагали многие авторы, монофилетичны (здесь и далее — монофилия понимается в кладистическом смысле). Однодольные растения образуют монофилетическую группу, которая берет начало от примитивных двудольных. То же самое видим на боль-

шинстве традиционных эволюционных схем. Подавляющее большинство семейств цветковых растений, которые считали монофилетическими группами (с поправкой на определение монофилии!), и в самом деле оказались таковыми. Эти совпадения между традиционными и новыми данными не могут быть случайными. Ясно, что они доказывают высокую информативность молекулярных признаков для выявления родственных связей между растениями. Надо обратить внимание на то, что отмеченные совпадения проявились уже в первых работах, охвативших большие наборы видов растений. Эти исследования были проведены с использованием всего одного участка ДНК. Например, одна из самых известных работ (Chase *et al.*, 1993) посвящена данным только по гену *rbcL*, который кодирует белок большой субъединицы основного фермента фотосинтеза (рибулозобисфосфаткарбоксилазы-оксигеназы). Понятно, что этот белок не имеет ни малейшего отношения к признакам строения цветка, по которым традиционно выделяются семейства растений. Кроме того, он представляет собой ничтожно малую часть генома растения. Не чудо ли, что уже по данным о гене *rbcL* удается показать монофилию большинства традиционно выделяемых семейств?

Как известно, семейства растений группируются в порядки. Это промежуточная единица между классом и семейством. Если в отношении классов (однодольные и двудольные) и семейств молекулярные данные хорошо согласуются с традиционными, то традиционное распределение семейств по порядкам (а порядков — по подклассам) подтверждается молекулярными данными лишь изредка, скорее — как исключение. Справедливости ради надо сказать, что у многих порядков (и подклассов) покрытосеменных никогда и не было традиционного объема, так как разные ученые выделяли порядки очень по-разному. Вероятно, поэтому порядки цветковых и не разбирают в школьном курсе ботаники. В целом, молекулярно-филогенетические данные говорят о том, что сравнительно-морфологических данных часто недостаточно для того, чтобы сделать уверенные суждения о родстве между семействами цветковых растений. Можно сказать, что ботаникам это было ясно и раньше, но многие боялись себе в этом признаться. Приведу некоторые примеры неожиданно (настолько ли уж всегда неожиданно?) выявленных родственных связей. Все они подтверждены сейчас анализом данных по нескольким участкам ДНК и поэтому заслуживают уважительного отношения.

В школе все изучают семейство крестоцветные и должны усвоить, что для его представите-

лей характерны цветки с 4 чашелистиками, 4 лепестками, 6 тычинками, из которых две короткие, а 4 длинные; из единственного пестика образуется плод — стручок, в котором семена прикреплены к рамке, а две створки отделяются при созревании плода. Этот набор признаков в принципе не очень типичен для двудольных, у которых цветки обычно имеют 5 чашелистиков и 5 лепестков. Ботаников давно интересовало происхождение крестоцветных. Были сформулированы две основные теории: 1) происхождение крестоцветных от маковых или их родственников и 2) происхождение от каперсовых (*Capparidaceae*, рисунок 6). Обе теории опирались на то, что в каждой группе-кандидате на предка или родственника есть растения, напоминающие крестоцветные по структуре цветка и плода (например, плод чистотела из маковых похож на стручок, а строение тычинок у дымянки и хохлатки из того же семейства можно сравнить с таковым у крестоцветных). При решении этой дилеммы опирались на данные сравнительной биохимии. Оказалось, что крестоцветные и каперсовые очень близки по тактике химической защиты от животных. Они образуют так называемые горчичные масла (содержащие серу вещества — изотиоцианаты, которые нам знакомы по вкусу горчицы или хрена, но в менее явной для нашего вкуса форме есть и в обычной капусте; есть они и в бутонах каперсов, которые нередко продают в маринованном виде). У маковых горчичных масел нет, зато, подобно родственным им лютиковым, есть весьма ядовитые для человека алкалоиды (в том числе те, на которых основано действие опийного мака). Вопрос был решен, и каперсовые прочно заняли место родственников или предков крестоцветных. Эти



Рисунок 6. Один из видов рода каперсы (*Capparis sypnophallophora*) в оранжерее Королевского ботанического сада в Эдинбурге.

Как и у крестоцветных, здесь чашечка с 4 чашелистиками и венчик с 4 лепестками. Другие каперсовые больше похожи на крестоцветные по числу тычинок, чем это растение.

семейства включали в порядок *Capparales*. Много лет назад известный ботаник Рольф Дальгрэн предложил радикально расширить объем порядка *Capparales* (= *Brassicales*) за счет включения в него целого ряда семейств, представители которых, подобно каперсовым и крестоцветным, имеют горчичные масла. Это предложение не встретило тогда широкой поддержки, потому что оно не согласовывалось с данными по морфологии цветка. Из известных всем растений Дальгрэн перенес сюда настурциевые (*Troaeolaceae*: кстати, бутоны настурции используют так же, как и бутоны каперсов!) и папайю (*Carica*: *Caricaceae*). Не только хорошо всем известные плоды, но и цветки папайи не имеют ничего общего с цветками крестоцветных. У папайи 5 чашелистиков, 5 сросшихся при основании в трубку лепестков, 10 тычинок в 2 кругах и 5 плодолистиков. Молекулярно-филогенетические данные полностью подтвердили идею Дальгрэна (например, *Rodman et al.*, 1996), после чего она получила всеобщее признание.

Экзотические роды *Helwingia* (от Гималаев до Японии) и *Phyllonoma* (от Мексики до Перу) большинство авторов относило не только к разным семействам, но даже и к разным порядкам (*Cornales* и *Grossulariales* — Тахтаджян, 1966; *Apiales* и *Hydrangeales* — Тахтаджян, 1987; *Cornales* и *Rosales* — *Cronquist*, 1988³). В то же время эти роды объединяет очень редкая для цветковых растений особенность: соцветия расположены не в пазухах листьев и не на верхушках побегов, а на верхней стороне листьев. Авторы, относившие *Helwingia* и *Phyllonoma* к разным порядкам, очевидно, считали, что сходство в строении соцветий «не перевешивает» различия между родами в строении цветков и плодов. *Helwingia* (рисунок 7) — двудомное растение, чашечка в цветке не выражена, развит только венчик (или околоцветник вообще простой?), гинецей из 3–4 плодолистиков, каждый — с 1 семяпочкой, плод — костянквидный. *Phyllonoma* (рисунок 8) имеет обоеполые цветки с ясно выраженным двойным околоцветником и с двумя плодолистиками с многочисленными семяпочками и плод — ягоду. Молекулярные данные говорят о близком родстве между *Helwingia* и *Phyllonoma* (*Chase et al.*, 1993; *Savolainen et al.*, 2000, *Soltis et al.*, 2000). По мнению *V. Savolainen et al.* (2000), *Helwingia* и *Phyllonoma* могли бы составить одно семейство. Вероятно, строению соцветий следует в данном случае

³ Кронквист относил *Helwingia* непосредственно к семейству *Cornaceae* (кизилковые), а *Phyllonoma* — к крыжовниковым (*Grossulariaceae*).



Рисунок 7. *Helwingia japonica* с соцветиями, расположенными на листьях (Институт систематической ботаники, университет Цюриха).

придавать больший «вес», чем предполагали ранее. Однако самое пикантное в описываемом примере то, что молекулярные данные говорят о близком, но, возможно, не ближайшем родстве между *Helwingia* и *Phyllonoma*. Оба эти семейства оказались близки к падубу (*Ilex*), который составляет особое семейство *Aquifoliaceae*, причем *Helwingia* ближе к *Ilex*, чем к *Phyllonoma*. Если этот последний вывод верен, то придется, скорее всего, предположить, что столь необычное строение соцветий возникло в данной группе родства дважды: один раз у предка *Helwingia* и другой раз — у предка *Phyllonoma*. Но ведь не может же быть появление этого признака именно у близких родственников простым совпадением?! Были ли у общего предка всех трех родов (*Helwingia*, *Phyllonoma*, *Ilex*) предпосылки к перемещению соцветий на листья, предпосылки, реализовавшиеся только у двух из трех родов? Если и были, то у нас пока нет никаких идей об их природе.

Похожий пример — сближение семейств *Balsaminaceae* и *Marcgraviaceae*. Первое семейство всем хорошо знакомо по роду недотрога



Рисунок 8. *Phyllonoma laticuspis* с соцветиями, расположенными на листьях (по «Жизни растений», т. 5 (2), 1981).



Рисунок 9. Цветок *Impatiens capensis* (фотография сделана в Англии, где это экзотическое растение одичало и растет в массе).

Хорошо виден шпорец на чашелистике. Чашелистики недотроги по окраске напоминают лепестки.

(*Impatiens* – рисунки 9 и 10). Наиболее яркая особенность цветка недотроги — хорошо заметный полный вырост (шпорец) на одном из чашелистиков. Такие шпорцы нередко развиваются в цветках различных растений и служат для того, чтобы скрыть выделяемый нектар, сделав его доступным только для некоторых опылителей. У представителей тропического семейства *Marcgraviaceae* также есть шпорцы (рисунок 11). Они похожи на шпорцы недотрог по облику и функции, но развиваются не на чашелистиках, а на прицветниках (листьях, в пазухах которых находятся цветки). Судя по тому, что шпорцы развиваются на разных органах (чашелистиках или прицветниках), они возникли в двух семействах независимо. Именно поэтому никому раньше не пришло в голову сблизить недотрогу с маркгравиевыми, и эти два семейства были расположены очень далеко друг от друга во всех системах. Молекулярные данные однозначно говорят об их близком родстве. В очень большом порядке верескоцветные, куда относят теперь эти два семейства, таких шпорцев больше ни у одного представителя нет. Нет их и у небольшого тропического семейства *Tetrameristaceae*, которое, вероятно, является самым близким родственником маркгравиевых (далее по степени родства идут бальзаминовые). Учитывая отсутствие шпорцев у тетрамеристовых и их разное положение у маркгравиевых и бальзаминовых, прихо-



Рисунок 10. Диаграмма цветка *Impatiens glandulifera*. Зеленым цветом обозначен кроющийся лист цветка, синим – чашечка, красным – венчик. Верхний чашелистик несет шпорец.

дится принять, что шпорцы возникли у двух ближайших родственников независимо. Что послужило предпосылкой этого параллелизма? Вероятно, ответ на вопрос даст изучение регуляторных генов, контролирующих развитие цветка (Geuten *et al.*, 2006). Интересно, что у всех верескоцветных, кроме трех упомянутых семейств, нектар выделяется специальным образованием при основании пестика, так называемым нектарным диском. У недотроги и маркгравиевых диска нет, и нектар выделяется в шпорце. У тетрамеристовых диска также нет, а нектар может выделяться тычинками или чашелистиками. Возможно, эволюционная утрата нектарного диска была предпосылкой развития нектарников других типов, среди которых самым удачным решением было «создание» нектарника-шпорца.

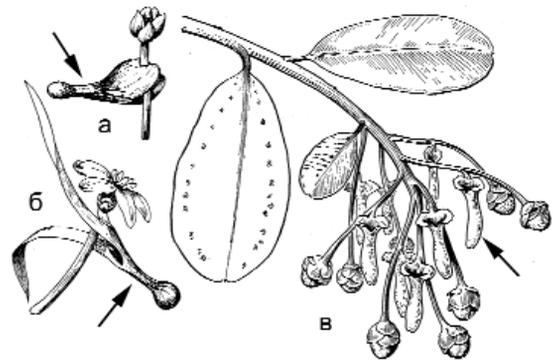


Рисунок 11. Соцветие и цветки представителей семейства *Marcgraviaceae*.

(a) — *Souroubea guianensis*, (б) — *Souroubea exauriculata*, (в) — *Norantea peduncularis* (no Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien, 1964; и «Жизни растений», т. 5 (2), 1981). Стрелками показаны содержащие нектар шпорцы. Они развиваются на прицветниках, т.е. листьях, в пазухах которых расположены цветки. На рисунке в видно, что эти прицветники расположены в необычном положении, «переместившись» на цветоножку. Подобное «перемещение» прицветников известно и у некоторых других растений.

Есть и такие молекулярные данные, от которых остается только руками развести. Может быть, в будущем мы сможем сказать о них что-то более связанное. Примером может служить совершенно неожиданное сближение двудольных растений из родов *Gunnera* и *Myrothamnus*. Трудно найти более непохожие по общему облику, экологическим предпочтениям и важным деталям морфологии вегетативных и репродуктивных органов растения. Миротамнусы — приуроченные к очень сухим условиям мелколистные кустарники Африки и Мадагаскара. Они способны практически нацело высыхать в безводный период, не сбрасывая листья, а затем снова «оживать» в на-

чале сезона дождей (такое поведение обычно, например, для многих мохообразных, но исключительно редко у цветковых). Известны случаи оживания гербарных образцов миротамнуса годичной давности! Гуннеры — широкораспространенные в тропиках и отчасти умеренной зоне Южного полушария корневищные травы с прикорневыми длинночерешковыми листьями (пластинка до 3 м в поперечнике). Многие представители рода имеют гигантские листья; пишут, что иногда один лист может укрыть от дождя трех всадников. Гуннеры растут в очень влажных местообитаниях; их толстые растущие горизонтально стебли имеют большое число ориентированных в разных направлениях стел (каждая — со своей эндодермой), анастомозирующих друг с другом. В стеблях и придаточных корнях поселяются симбиотические колонии цианобактерий из рода *Nostoc*. На основании одних только сравнительно-морфологических данных ботаники не могли выдвинуть убедительных гипотез о родственных связях такого своеобразного растения с весьма просто устроенными цветками, как гуннера. Для обоих родов характерны очень просто устроенные цветки, не имеющие ярко выраженных черт сходства с цветками каких-либо других растений.

Ошибки молекулярной систематики

Расцвет молекулярной систематики растений в 1990-е гг. был связан, в частности, с изобретением достаточно простых и надежных методик извлечения и анализа ДНК из небольших фрагментов высушенных листьев. Это позволило использовать для выделения ДНК даже фрагменты образцов, хранящихся в гербарии. В идеале это должны быть недавно собранные растения, но иногда удается успешно изучать и образцы XIX века. Одним словом, возможность использования гербарных коллекций сразу открыла двери для вовлечения в исследования самых экзотических растений со всех уголков планеты. В «простоте» методик есть и своя опасность, т.к. при одновременном анализе большого числа образцов есть опасность их случайного смешивания или каких-то иных технических ошибок. Какими бы ни были причины этого, но значительная часть получаемых и публикуемых последовательностей ДНК не имеет ничего общего с реальными. Иногда удается «раскопать» природу подобных недоразумений. Например, в упомянутой выше работе по гену *rbcL* (Chase *et al.*, 1993) было показано, что экзотический род *Sargentodoxa* как будто должен быть отнесен к семейству бобовые. Во всяком случае на филогенетических дере-

вьях он группировался с бобовыми. Это было очень странным, т.к. род *Sargentodoxa* традиционно относили (как отдельное семейство) к порядку лютикоцветные, который не имеет ничего общего с бобовыми. Лютикоцветные — один из порядков, который почти «не пострадал» от появления молекулярно-филогенетических данных. Его объем подвергся лишь незначительным изменениям. Молекулярные данные ясно показали правомерность отнесения к лютикоцветным семейства лардизабаловые, к которому морфологически близка сарждентодокса. Однако, с другой стороны, по жизненной форме (лиана) и очертаниям листочков тройчатого листа сарждентодокса очень напоминает некоторых родственников фасоли из семейства бобовые. При ближайшем рассмотрении оказалось, что гербарный образец, из которого была выделена ДНК «сарждентодоксы», на самом деле принадлежит бобовому растению (Doyle *et al.*, 1997). Этот экземпляр не имел цветков и поэтому был ошибочно определен как сарждентодокса. Анализ ДНК настоящей сарждентодоксы подтвердил ее отнесение к лютикоцветным и родство с лардизабаловыми.

Примеры подобного рода еще более обычны в систематике таксонов более низкого ранга. Приведу пример из своего опыта. Как я уже писал, мне пришлось изучать систематику одной небольшой группы бобовых растений (трибы *Loteae*). Эта триба включает примерно 18 родов и порядка 250 видов, распространенных в основном в Средиземноморье и в Калифорнии. Климатические условия в этих двух районах очень близки, но история развития флор Средиземноморья и Калифорнии различна. Американские авторы традиционно относили все калифорнийские виды к роду лядвенец (*Lotus*), который также имеет большое число видов в Средиземноморье. Мы пришли к выводу — на основании исключительно морфологических данных — что ни один американский вид включать в род *Lotus* нельзя. Их следует рассматривать как 4 самостоятельных рода (*Ottleya*, *Acmispon*, *Syrmatium*, *Hosackia*). Эти четыре группы американские ботаники выделяли и раньше, но они не сравнивали их детально с видами из Средиземноморья и с другими родственными родами и поэтому включали все 4 группы в род *Lotus*. Через год после публикации нашего варианта системы данной группы вышла первая детальная работа по ее молекулярной филогении (Allan, Porter, 2000). Оказалось, что из 4 принятых нами американских родов монофилетичен только один. Кроме того, с американскими видами на молекулярно-филогенетическом древе оказались перемешаны два вида распро-

страненного в Европе, Азии и Африке рода вязель (*Coronilla*). Один из изученных видов *Coronilla* был очень близок к одному из видов *Hosackia*, а другой — к одному из видов *Ottleya*... Прочитав эту и еще одну подобного рода работу, я составил список видов, с положением которых на молекулярно-филогенетических деревьях я решительно не могу согласиться как морфолог. Таких видов оказалось около десятка. Я добыл материал по этим видам и попросил коллег из лаборатории А.С. Антонова (Г.В. Дегтяреву, К.М. Вальехо-Роман, Т.Х. Самигуллина) повторить изучение того же участка ДНК (внутреннего транскрибируемого спейсера рибосомальной ядерной ДНК — nrITS), который изучали авторы опубликованных работ. Во всех случаях новые результаты не имели ничего общего с ранее опубликованными. Построенные с учетом новых данных филогенетические деревья (Degtjareva *et al.*, 2003, 2006; Sokoloff *et al.*, в печати) вполне удовлетворяли меня. Североамериканские виды больше не оказывались необъяснимым образом перемешанными с видами из Евразии и Африки. Я до сих пор не знаю, почему и как первые исследователи участка nrITS у *Loteae* допустили ошибки. Они прислали мне фотографии части гербарных образцов, из которых были получены «проблемные» данные. Эти образцы, в отличие от случая с *Sargentodoxa*, были определены верно. Очень часто в случаях, когда вскрываются подобные казусы, их или просто замалчивают в публикациях (особенно когда находят собственные, а не чужие, как в нашем случае, ошибки), или «списывают» на внутривидовую вариабельность последовательностей ДНК. Действительно, теоретически такая вариабельность может иметь место, и ее наличие доказано для некоторых участков ДНК у ряда таксонов. Так может быть, например, если какой-либо участок ДНК удвоился в ходе эволюции, и одна из копий сохранила свое функциональное значение, а другая — потеряла, став так называемым псевдогеном. Псевдоген эволюционирует гораздо быстрее настоящего гена. Если для части растений одной группы изучен ген, а для другой части — псевдоген, и затем все эти данные анализируются совместно, результат может быть самым чудовищным. Однако мне кажется, что в описанном случае о нашей группе бобовых речь идет именно о технической ошибке. Для некоторых «проблемных» видов мы несколько раз проводили выделение ДНК и результат был всегда одинаков. Кроме того, вероятно, чтобы другие исследователи у «проблемных» видов всегда выделяли псевдоген, а в нашей лаборатории — всегда верную последовательность. Наконец, моя роль в работе заключалась

только в поиске материала, а коллеги, занимавшиеся его изучением, не знали, как должны выглядеть родственные связи между видами по моим представлениям. Поэтому получение «нужного» дерева в результате предвзятого отношения к данным (например, отбрасывания «неудачных» результатов) в данном случае исключено.

В Интернете размещена специальная база данных, в которой собраны все опубликованные исследователями разных стран последовательности нуклеотидов ДНК различных организмов (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). При публикации научных статей отправка последовательностей в эту базу данных (генбанк) обязательна. Когда ученые получают новые последовательности, они сравнивают их с последовательностями, уже размещенными в базе данных. Большинство публикуемых молекулярно-филогенетических деревьев отчасти основано и на последовательностях, «добытых» из генбанка. К сожалению, генбанк содержит как верные, так и многочисленные ошибочные данные, и необдуманное их использование может привести к печальным результатам.

Морфология и молекулярные данные: реалии и перспективы сосуществования

Колоссальные успехи молекулярной систематики могут создать впечатление того, что вся эволюционная ботаника должна быть основана на молекулярных и только молекулярных данных. Многие университеты сейчас сокращают обучение в традиционных областях ботаники (и зоологии). Нередко приходится видеть, как специалисты в области молекулярных методов очень слабо представляют себе, что за растения они изучают, где и как они растут и как устроены. Это можно понять, учитывая то, насколько широка стала наука. Чтобы работать с молекулярными данными, надо знать так много, что на все остальное может просто не оставаться сил и времени. Однако удивляет нередкое (конечно, далеко не повсеместное!) нежелание прислушаться к мнению специалистов по морфологии. Вот один пример. Я завязал переписку с одним из авторов раскритикованной выше статьи про бобовые (Allan, Porter, 2000) еще до того, как эта работа была опубликована. Он прислал мне предварительный вариант статьи. Я сразу обратил его внимание на неправдоподобность результатов, но это не заставило его задуматься о повторном выделении ДНК.

На самом деле молекулярная систематика просто не может существовать без морфологии.

Начать с того, что технически невозможно построить молекулярно-филогенетическое дерево (пусть даже по одному гену) для, скажем, всех цветковых растений (их примерно 250 тысяч видов) или хоть сколько-нибудь значительной их части. Дело даже не в сложности получения самих молекулярных данных в таком большом количестве, а в технической невозможности их проанализировать все вместе (ни один компьютер не справится с такой задачей). Приходится работать с какой-то выборкой видов. Репрезентативность этой выборки (особенно на первых этапах, когда другие молекулярные исследования отсутствуют) целиком основана на знаниях из области морфологии. Например, когда анализируют филогению цветковых растений в целом, стараются охватить все традиционно выделяемые семейства, а в пределах семейств — взять более примитивные формы. Далее, в самых первых работах о положении целых семейств нередко судили по данным об одном участке ДНК у одного-единственного вида. Какова же прогностическая ценность системы, построенной на основании морфологических знаний, если такого рода суждения затем обычно подтверждались на более обширном материале!

Но это технический аспект работы. Важнее вопрос о том, зачем нам нужны точные знания об эволюционном древе растений. Пожалуй, самое интересное, что с ними можно сделать, — это использовать для анализа эволюции морфологических признаков. Молекулярные данные об эволюции представляют собой ту независимую «точку опоры», отталкиваясь от которой, можно сделать ряд очень интересных морфологических выводов, протестировать гипотезы о направлениях эволюционных преобразований признаков, их таксономической значимости (и обратно, морфологические данные можно и нужно использовать для тестирования данных молекулярных). Ранее об эволюционных связях между группами судили в основном по их морфологическим признакам, а об эволюции признаков — во многом по положению обладающих ими организмов в эволюционной системе. Это было подобие замкнутого круга в рассуждениях. Привлечение независимых от морфологии молекулярных данных о родственных связях позволяет разорвать этот круг. Оно, конечно, не решает всех проблем, но вносит новую, свежую, струю в старые дискуссии, выхода из которых, казалось, не видно. Итак, молекулярные данные интересны только постольку, поскольку они анализируются в контексте морфологии. Это очень сложная, но к какой-то степени вспомогательная «кухня», из которой должен вытекать именно морфологический анализ.

Когда мы доходим до этого места, выясняется, что наши знания о морфологии крайне фрагментарны. О многих особенностях целых семейств судят, экстраполируя данные по отдельным хорошо изученным видам. Когда молекулярные данные заставляют пересмотреть объем групп и выделить новые, зачастую оказывается, что для многих важных групп известны лишь самые общие морфологические сведения. Детали ждут своих открывателей. При этом многие морфологические признаки выясняются лишь при кропотливой исследовательской работе. Сейчас уже совершенно ясно, что эта работа — более сложная, чем получение данных о последовательностях нуклеотидов в ДНК. Например, если найдено совершенно непонятное растение (скажем, из тропиков и без цветков), его проще всего определить до семейства или до рода путем выделения какого-нибудь хорошо исследованного участка ДНК (того же *rnlTS*) с последующим компьютерным сравнением с последовательностями из генбанка. Это требует меньше времени и меньшей квалификации исследователя (а значит — дешевле), чем пользоваться морфологическими признаками. Молекулярные данные накапливаются лавинообразно, и изучение морфологии не поспевает за ними. Но это, конечно, болезнь роста, и ученые уже осознали ошибочность невнимания к морфологии.

Пожалуй, самый щекотливый вопрос: насколько все-таки можно доверять данным молекулярной систематики (см. об этом подробнее: Антонов, 2000)? Тут есть несколько аспектов. Предположим, мы пытаемся построить филогенетическое дерево какого-то семейства (рода, класса) по данным о последовательностях двух (тех, пяти, семи) генов. Путем сложной компьютерной обработки данных получаем это самое дерево (на самом деле — обычно получаем множество деревьев, из которых затем конструируем так называемое дерево согласия). Каждая ветвь этого дерева — эволюционная гипотеза, т.е. гипотеза о том, что все растения, входящие в состав этой ветви, возникли от общего предка. Очень важно то, что разные ветви одного и того же дерева — это в разной степени правдоподобные гипотезы. Одним из них надо доверять в большей степени, чем другим, в том числе и при обсуждении эволюции морфологических признаков. Предложено большое число способов определения степени правдоподобности гипотез. Они позволяют получить определенные цифры (в пределах от 0 до 1 или от 0 до 100%), которые можно обозначить как индексы поддержки ветвей в дереве. Чем больше поддержка, тем больше наша уверенность в том, что

данная ветвь действительно отражает то, что имело место в ходе эволюции⁴. Замечательное свойство индексов поддержки в том, что их использование позволяет отличать «зерна от плевел». В частности, сравнивая два дерева, построенных для одного и того же набора видов по данным о последовательностях разных участков ДНК, мы очень часто видим, что ветви с высокой поддержкой на двух деревьях одни и те же, а ветви с низкой поддержкой на одном дереве не присутствуют на другом. Ветви с низкой поддержкой — это на самом деле те вопросы, ответов на которые исследование не дало. Очень важно, что есть такие вопросы, и их немало. Что делать для решения этих вопросов? Первое, что приходит на ум, — это увеличение объема данных. Может быть, ветви получаются с низкой поддержкой оттого, что просто не хватает данных.

В большинстве работ до сих пор исследователи оперируют небольшим числом генов (или других участков ДНК), т.е. ничтожно малой частью генома растения. Есть исследователи, которые считают, что по этой причине доверять современным молекулярно-филогенетическим данным вообще всерьез не стоит. Лучше попытаться приблизиться к сравнению полных геномов. Определить полный геном для какого-либо организма — очень трудоемкая задача. Лишь относительно недавно усилиями очень многих исследователей из разных стран выполнен проект «Геном человека». Применительно к растениям более простая задача — определения полных хлоропластных геномов. Они уже известны для десятков растений. Одна из первых работ в этой области была посвящена вопросу об эволюции цветковых растений. Были проанализированы полные хлоропластные геномы 10 цветковых растений в сопоставлении с полными геномами одного мохообразного растения, одного папоротника и одного голосеменного (Goremykin *et al.*, 2003). Вместо использовавшихся ранее обычно 1–3–5 генов, это исследование оперировало данными о 61 гене! Результат не совпал с тем, что получалось ранее при анализе трех генов (Soltis *et al.*, 2000). По трем генам (как и по морфологии!) выходило, что однодольные растения произошли от примитивных двудольных, т.е. двудольные не монофилетичны в кладистическом смысле. По 61 гену получилось, что однодольные и

двудольные — сестринские группы, каждая из которых монофилетична. В.В. Горемыкин с соавторами указал, что старые представления неверны и что лишь анализ больших объемов данных (в идеале — полных геномов) даст возможность построить правдоподобное филогенетическое древо. После выхода упомянутой статьи его оппоненты проделали такой опыт (Degtjareva *et al.*, 2004; Soltis, Soltis, 2004). Взяли те же самые три гена, что брал ранее Д. Солтис с соавторами (Soltis *et al.*, 2000), и те же самые 13 видов, что брал ранее В.В. Горемыкин с соавторами. По 3 генам получилось то же самое древо, что и по 61 гену. Почему же раньше по 3 генам получался другой результат? Потому что было проанализировано не 13, а около 500 видов. Этот пример показывает, что для получения разумного филогенетического древа важно не только добыть большое количество признаков (т.е. определить нуклеотидные последовательности многих генов), но и изучить репрезентативную выборку видов. Выборка в работе В.В. Горемыкина с соавторами была не только маленькой, но и нерепрезентативной. Однодольные растения были представлены в ней только тремя злаками (кукуруза, пшеница, рис). Эти виды были изучены раньше других потому, что они важнее для человека. Злаки — одни из самых эволюционно продвинутых и специализированных представителей однодольных растений. С морфологической точки зрения, по злакам невозможно составить представление об однодольных вообще. Если бы в распоряжении морфологов были из однодольных только злаки, они бы тоже, вероятно, пришли к выводу, что однодольные не могли произойти от примитивных двудольных. По мере того как были изучены полные хлоропластные геномы других однодольных, стало ясно, что данные по полным хлоропластным геномам на самом деле не опровергают теорию о происхождении однодольных от примитивных двудольных (например, Chang *et al.*, 2006).

Этот и много других не приведенных здесь примеров показывают, что никакое увеличение числа анализируемых участков ДНК (вплоть до полного генома!) не компенсирует проблем, возникающих при нерепрезентативности выборки исследуемых видов. Но как быть, когда выборка не является репрезентативной потому, что часть ключевых групп исчезла с лица Земли? Их ДНК изучить не удастся. К примеру, в группу семенных растений включают голосеменные и покрытосеменные (цветковые). Голосеменные возникли в девоне, а достоверные остатки покрытосеменных известны в ископаемом состоянии только начиная с мелового периода. Они, судя по всему, возникли от каких-то голо-

⁴ Ни один из этих индексов на самом деле не является настоящей статистической оценкой справедливости наших гипотез (хотя при использовании метода максимального правдоподобия в основе лежит статистическая «кухня»). Будет большой ошибкой думать, что поддержка в 100% есть указание на то, что гипотеза «несомненно верна».

семенных. Современные голосеменные — лишь небольшая часть бывшего разнообразия этой группы. Например, С.В. Мейен (Мейен, 1992) выделял 17 порядков голосеменных, из которых лишь 6 представлены в современной флоре. Большинство современных исследователей на основании молекулярных данных делает вывод о том, что современные голосеменные — это монофилетическая группа, сестринская по отношению к покрытосеменным. Однако едва ли следует брать этот вывод на вооружение (например, Bateman *et al.*, 2006; Соколов, Тимонин, в печати). Он вполне может быть обусловлен неустраняемыми эффектами типа тех, которые возникали в работе В.В. Горемыкина с соавторами.

Как же отличить «настоящие», «правильные», молекулярно-филогенетические деревья от «неправильных»? Непонятно. Можно только сказать, что использование индексов поддержки не решает проблему. Так, в работе с полными хлоропластными геномами 13-и видов большинство ветвей имели очень высокую поддержку. Ясно, что ключ к разгадкам многих тайн лежит в области палеоботаники, хотя и не всегда ясно, как этим ключом пользоваться.

Революционные находки палеоботаников

Приведу только два примера того, каких впечатляющих успехов добиваются палеоботаники.

1. Древнейшие цветковые растения. Цветковые растения — самая многочисленная группа высших растений, но и самая молодая. Широкое распространение покрытосеменных в середине мелового периода привело к коренной перестройке практически всех наземных сообществ и придало суше современный облик. Лет 50 назад о тех цветковых растениях, которые существовали до широкой экспансии этой группы, было известно очень мало. Представление о древнейших, нижнемеловых, цветковых приходилось составлять в основном по не связанным с другими остатками (дисперсным) пыльцевым зернам. Ситуация начала меняться в 1970-е и особенно 1980-е гг. (Красилов, 1989), а в 1990-е и 2000-е гг. материал начал накапливаться очень быстро. Теперь описано много цветков нижнемеловых покрытосеменных, причем найдены они в сильно удаленных друг от друга регионах (на востоке Северной Америки, в Португалии, Бразилии, Забайкалье, на северо-востоке Китая, в Австралии). Покрытосеменные этих ископаемых флор достаточно разнообразны. Только во флорах Португалии обнаружено 140–150 разных видов, многие из которых уже выявлены, но еще

не описаны учеными (Friis *et al.*, 2000). Что нового это дало науке? Неожиданным оказалось то, что большинство открытых древнейших цветков имели очень мелкие размеры, измеряемые миллиметрами. Этот так не похож на широко разрекламированный в качестве прототипа цветка вообще цветок магнолии. Еще более впечатляет вывод о том, что среди древнейших цветковых преобладали травы. По крайней мере ни одного бесспорно древесного представителя покрытосеменных найти не удалось. Среди них были как водные, так и наземные растения. Для одних цветков можно предположить опыление насекомыми, для других — ветром. Подавляющее большинство известных нам древнейших цветковых можно отнести к примитивным двудольным.

Лишь небольшую часть остатков удается связать с семействами, представленными в современной флоре. Больше всего данных о древнейших ископаемых представителях семейства *Chloranthaceae*. В частности, в Португалии найдены цветки, очень похожие на цветки

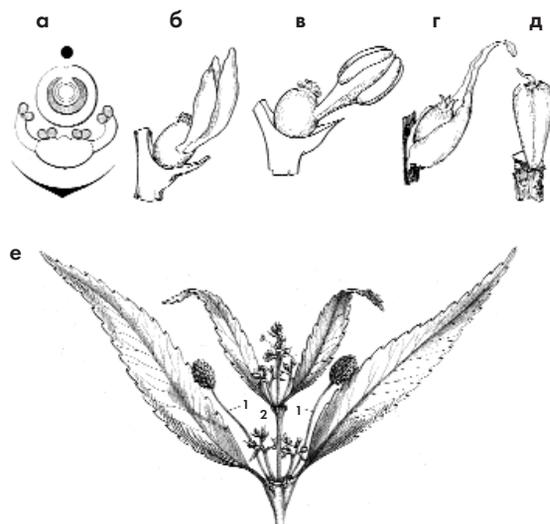


Рисунок 12. Современные представители семейства *Chloranthaceae* (по Engler's *Syllabus der Pflanzenfamilien*, 1964 и Engler u. Prantl, *Die Natuerlichen Pflanzenfamilien*, Teil 3, 1894).

(а) — диаграмма цветка *Chloranthus inconspicuus* с одним пестиком и трехлопастной тычинкой; (б) — внешний вид расположенного в пазухе прицветника цветка *Chloranthus henryi*, имеющего один пестик с отходящей от средней части завязи трехлопастной тычинкой; (в) — внешний вид расположенного в пазухе прицветника цветка *Sarcandra glabra*, имеющего один пестик с отходящей от средней части завязи цельной тычинкой; (г) — внешний вид расположенного в пазухе прицветника женского цветка *Hedyosmum orientale*, имеющего один пестик с тремя расположенными на верхушке завязи чешуйками околоцветника (рыльце не показано); (д) — мужской цветок *Hedyosmum orientale*, не имеющий ни околоцветника, ни прицветника; (е) — общий вид верхней части растения *Hedyosmum nutans* (1 — мужские соцветия, 2 — женские).



Рисунок 13. *Chloranthus serratus* в Японии.

современных видов *Hedyosmum*, и изолированные тычинки с пыльцевыми зернами, очень похожими на таковые современного рода *Ascarina*. В более молодых отложениях Швеции и США найдены цветки и тычинки, похожие на таковые *Chloranthus*. Цветки современных видов *Chloranthus* и *Hedyosmum* сильно различаются (у *Hedyosmum* — однополые, женские — с околоцветником, мужские — из 1 нормальной тычинки; у *Chloranthus* — обоеполые, без околоцветника, тычинка трехлопастная, рисунки 12 и 13). Ископаемых переходных форм между этими родами не найдено. Данные палеоботаники пока не позволяют установить исходный для семейства *Chloranthaceae* тип строения цветка.

В нижнемеловых отложениях Португалии найдены и остатки цветка растения, близкого к современному кувшинковому (Friis *et al.*, 2001). Цветок реконструирован как мелкий (менее 1 см длиной), с 6 листочками простого околоцветника, с 24 тычинками с узкими нитями в двух кругах и 12 плодolistиками, противоположными внутренним тычинкам. Гинецей синкарпный, завязь полунижняя, в каждом гнезде — несколько семян. Как и у современных кувшинок, на верхушке гинецея есть вырост, образованный осью цветка. Не доказано, что растение, имевшее такие цветки, было водным.

Примером вымершего семейства покрытосеменных служит *Archaeofractaceae*, включающее род *Archaeofructus* (Sun *et al.*, 2002). Эти растения были описаны недавно в Китае и вызвали сенсацию во многом потому, что отложения, в которых их обнаружили, считали относящимися к юрскому периоду (напомню, что цветковые достоверно известны только из следующего, мелового, периода). Позже было показано, что возраст архефрукта примерно такой же, как у описанных выше ископаемых из Португалии. Виды *Archaeofructus* были однолетними водными травами с очередными, многократно перисторассеченными на узкие сегменты листьями с открытым жилкованием. По общему облику

листья похожи на листья некоторых папоротников. Листья не имели устьиц и были, вероятно, погружены в воду. Репродуктивные органы завершали главный и боковые побеги. Они были представлены удлиненными осями (несколько сантиметров длиной), на которых в нижней части по спирали располагались группы из 2 или нескольких тычинок, а в верхней — пестики, прикрепленные обычно парами. Тычинки с довольно тонкими нитями и ясно отграниченными пыльниками, после цветения опадающие. Пестики на коротких ножках, удлиненные, довольно крупные, с несколькими семяпочками. Каких-либо кроющих чешуй или листочков околоцветника не обнаружено. Предполагали, что фруктификации *Archaeofructus* имеют «предцветковое» строение, а находка этого растения позволяет судить об исходной для покрытосеменной структуре репродуктивных органов. Не исключено, однако, что *Archaeofructus*, как и многие современные водные растения, имел вторично упрощенные цветки (Friis *et al.*, 2003). Его репродуктивные структуры можно описывать как лишенные кроющих листьев колосья с мужскими и женскими цветками без околоцветника. В любом случае, находка этих растений (как и многих других, обнаруженных в последнее время в разных уголках Земли) позволяет по-новому посмотреть на старую проблему происхождения цветковых растений.

К сожалению, и сейчас приходится признать, что самые ранние находки покрытосеменных — это дисперсные пыльцевые зерна. Новые находки позволили радикально приблизиться к познанию образа предков покрытосеменных, но самые древние представители этой группы все еще скрыты в неизвестности.

2. Древнейшие высшие растения. Как известно, самые древние несомненные находки ископаемых высших растений относятся к силурийскому периоду, а уже к концу следующего за ним периода — девона — разнообразие высших растений было очень велико. Происхождение высших растений вызывает большой интерес у ученых, т.к. считается, что эта группа формировалась в связи с освоением новой — наземной — среды обитания. Вопрос о происхождении наземных растений тесно связан с вопросом о становлении наземных экосистем, т.к. существование сухопутных или почвенных животных и грибов кажется проблематичным при отсутствии организмов-продуцентов, растений. Сейчас уже достаточно ясно, что наземные экосистемы существовали и до появления высших растений, но биоценологическую роль становления высших растений трудно переоценить (см.

об этом, например, Еськов, 2000⁵). Лучше всего древнейшие высшие растения изучены на материалах, собранных в окрестностях деревушки Райни (Rhynie) в Шотландии. Именно там почти 100 лет назад были найдены ископаемые остатки риний (правильнее было бы их называть райниями) и других древних высших растений, описания которых в классических работах Кидстона и Лэнга положили начало новой эре в изучении эволюции высших растений. Сохранность растительного материала в Райни исключительная. Ринии и подобные им растения обитали вблизи систем термальных источников, вода в которых была богата растворимыми соединениями кремния. По мере охлаждения воды из нее выпадали аморфные соединения кремния, окружавшие и пропитывавшие растительные остатки. Это и определило удивительную сохранность материала (удается наблюдать даже жгутики сперматозоидов, а также всю последовательность клеточных делений в процессе прорастания споры⁶). Казалось бы, что нового еще можно открыть в Райни, особенно после исчерпывающих работ Кидстона и Лэнга, иллюстрации которых и реконструкции ринии попали во все учебники? Оказывается, достаточно полные представления о риниях удалось получить только в последнее время.

Как известно, высшие растения делят на сосудистые и мохообразные. У первых в жизненном цикле преобладает спорофит (диплоидное поколение, несущее спорангии), у вторых — гаметофит (гаплоидное поколение, несущее гаметангии — антеридии и архегонии). У сосудистых растений есть настоящие проводящие элементы ксилемы — трахеиды или, у более продвинутых форм, сосуды. У некоторых мохообразных (например, у мха кукушкин лен) также есть специализированных водопроводящие элементы, гидроиды, также состоящие из мертвых клеток. Трахеиды и сосуды отличаются от гидроидов (1) наличием в клеточной стенке особого вещества — лигнина, вызывающего ее одревеснение, и (2) неравномерностью отложения вторичной клеточной стенки, которая откладывается у более примитивных форм в виде колец или спиралей. Все хорошо изученные древнейшие высшие растения относятся к числу сосудистых растений. Они имеют вильчато разветвленные,

более-менее радиально-симметричные оси (теломы), на которых находятся спорангии. Гаметофиты оставались практически не описанными вплоть до 1980-х гг. Вместе с тем вопрос о том, как выглядело чередование поколений у предков высших растений, имеет первостепенное значение. Были высказаны две основные гипотезы.

Согласно первой гипотезе, древнейшие высшие растения относились к числу мохообразных. Они имели хорошо развитый гаметофит и расположенный на нем неразветвленный спорофит с единственным спорангием. Эта точка зрения согласуется с тем, что наиболее близкие к высшим растениям современные водоросли (харовые и колеохетовые) также имеют хорошо развитый гаметофит. После оплодотворения и формирования диплоидной зиготы обычно сразу (или после немногих митозов) происходит мейоз и возникают споры. Логично предположить, что хорошо развитый спорофит — это приобретение высших растений, и в ходе их эволюции он приобретал все большее развитие, став при переходе к сосудистым растениям ветвистым и получив возможность самостоятельного существования. Молекулярно-филогенетические данные говорят о происхождении сосудистых растений от мохообразных (Samigullin *et al.*, 2002; Shaw, Renzaglia, 2004). Наличие ксилемы с трахеидами было шагом вперед по сравнению с тем, что наблюдается у мохообразных. Очень важно, что у всех современных мохообразных спорофит не только занимает подчиненное положение в жизненном цикле, но и устроен иначе, чем гаметофит. Гаметофит современных мохообразных никогда не имеет теломной структуры: он либо представлен олиственным побегом, либо пластинчатым, обычно распростертым по субстрату слоевищем. Достоверные находки мохообразных не известны из таких древних отложений, как древнейшие находки сосудистых растений (риниофитов), но мохообразные вообще очень плохо сохраняются в ископаемом состоянии, а некоторые из дисперсных силурийских спор очень похожи на споры мохообразных.

Вторая гипотеза о происхождении высших растений предполагает, что предки высших растений имели изоморфный жизненный цикл и спорофит был похож на гаметофит. Кажется, эта гипотеза не выдерживает конкуренции с предыдущей. Однако оказалось, что гаметофиты риний и их родственников были в целом похожи на спорофиты соответствующих видов (Taylor *et al.*, 2005). Гаметофиты были более мелкие, чем спорофиты, как и положено гаметофитам сосудистых растений, но по своей структуре вполне напоминавшие последние. В случае находок изо-

⁵ Необходимо только отметить, что К.Ю. Еськов неверно сообщает, что девонские риниофиты не имели устьиц.

⁶ В Интернете есть много иллюстрированных фотографий сайты, посвященные ископаемому из Райни, например <http://www.abdn.ac.uk/rhynie/intro.htm> и <http://www.uni-muenster.de/GeoPalaeontologie/Palaeo/Palbot/erhynie.html>

лированных веточек гаметофиты и спорофиты трудно различить. Гаметофиты риниевых имели теломное строение. Их веточки были более-менее радиально-симметричными, имели такие же нормальные устьица, как и спорофиты, и тот же тип проводящей системы.

Кидстон и Лэнг описали два вида рода риния. Детальное их изучение показало, что эти растения относятся к разным родам, причем только для одного из них характерны трахеиды с кольчатыми или спиральными утолщениями, а для второго — водопроводящие элементы, похожие на гидроиды мхов.

Пожалуй, самые захватывающие наблюдения сделаны в области биологии растений, живших около 400 млн лет на месте современной деревушки Райни. Детально описаны разнообразные грибы, их взаимодействие друг с другом и с высшими растениями. Показано, что какие-то (пока не установленные!) организмы прогрызали отверстия в спорангиях риниевых и, по-видимому, поедали споры. Сенсационной можно считать новейшую реконструкцию давно известного нижнедевонского ископаемого *Prototaxites* (Hueber, 2001). Название *Prototaxites* можно перевести как «прото-тисс». Открыл эти остатки еще в XIX веке тот же исследователь (J.W. Dawson), который описал псилофит. Он сравнил *Prototaxites* со стволом тисса. Как и на стволах деревьев, на этих остатках есть кольца, которые были интерпретированы как годичные. Более детальные исследования показали, что анатомическая структура *Prototaxites* не имеет ничего общего со строением ствола дерева. *Prototaxites* состоит из многочисленных трубочек различного диаметра. Ясно, что он не был высшим растением. Была высказана точка зрения, что это была водоросль наподобие бурой, однако есть все основания считать, что организм был сухопутным. Так вот, согласно новейшим представлениям, *Prototaxites* следует рассматривать как лишайник или, скорее, плодое тело гигантского гриба. Это были колонновидные образования до 8 м высотой при толщине у основания до 1 м... Для сравнения, обитавшие в тех же местообитаниях в то же время риниофиты не превышали обычно 30 см в высоту при диаметре осей, измеряемом миллиметрами (впечатляющую цветную реконструкцию ландшафта с риниофитами и *Prototaxites* можно найти на <http://www.xs4all.nl/~steurh/engprot/eprototx.html>). Если эти построения верны, то как мало мы знаем о биологии тех экосистем, где обитали первые высшие растения! Если же эти построения ошибочны, то что же такое тогда *Prototaxites*? Надо сказать, что помимо *Prototaxites* известно еще немало загадочных силурийских и девонских ископаемых, явно не относящихся непосред-

ственно к высшим растениям. Некоторые из них имеют сложное строение. Их изучение несомненно прольет свет на вопрос о происхождении высших растений.

Мне не кажется уместным подводить какие-либо итоги или делать какие-то общие выводы из приведенных разрозненных примеров. Ясно одно: замечательные новые открытия рождают очень много новых вопросов, и ответить на них — наша увлекательная задача.

Литература

- Антонов А.С.** 2000. Основы геносистематики высших растений. — М.: Наука/Интерпериодика. 136 с.
- Еськов К.Ю.** 2000. История Земли и жизни на ней. М., 352 с.
- Красилов В.А.** 1989. Происхождение и ранняя эволюция цветковых растений. — М.: Наука, 263 с.
- Мейен С.В.** 1992. Эволюция и систематика высших растений по данным палеоботаники. — М.: Наука, 174 с.
- Павлинов И.Я.** 1989. Методы кладистики. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 118 с.
- Павлинов И.Я.** 1990. Кладистический анализ (методологические проблемы). — М.: Изд-во Моск. ун-та., 158 с.
- Соколов Д.Д., Тимонин А.К.** Морфологические и молекулярно-генетические данные о происхождении цветка: на пути к синтезу // Журн. общ. биол. (в печати).
- Тахтаджян А.Л.** 1966. Система и филогения цветковых растений. М.-Л.: Наука, 611 с.
- Тахтаджян А.Л.** 1987. Система магнолиофитов. Л.: Наука, 439 с.
- Шипунов А.Б.** 2003. Система цветковых растений: синтез традиционных и молекулярно-генетических подходов // Журн. общ. биол., 64 (6): 499–507.
- Allan G.J., Porter J.M.** 2000. Tribal delimitation and phylogenetic relationships of Loteae and Coronilleae (Fabaceae: Fabaceae) with special reference to Lotus: evidence from nuclear ribosomal ITS sequences // Amer. Journ. Bot., 87 (12): 1871–1881.
- Ambrose B.A., Espinosa-Matias S., Vazquez-Santana S., Vergara-Silva F., Martinez E., Marquez-Guzman J., Alvarez-Buylla E.R.** 2006. Comparative developmental series of the Mexican triurids support a euanthial interpretation for the unusual reproductive axes of *Lacandonia schismatica* (Triuridaceae) // Amer. J. Bot., 93: 15–35.
- APG II.** 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants // Bot. J. Linn. Soc., 141: 399–436.
- Bateman R.M., Hilton J., Rudall P.J.** 2006. Morphological and molecular phylogenetic context of the angiosperms: contrasting the «top-down» and «bottom-up» approaches used to infer the likely characteristics of the first flowers // J. Exp. Bot., 57: 3471–3503.
- Beer S.S., Demina O.N.** 2005. A new species of *Salicornia* (Chenopodiaceae) from European Russia // Willdenowia, 35: 253–257.

- Chang C.-C., Lin H.-C., Lin I.-P., Chow T.-Y., Chen H.-H., Chen W.-H., *et al.* 2006. The chloroplast genome of *Phalaenopsis aphrodite* (Orchidaceae): comparative analysis of evolutionary rate with that of grasses and its phylogenetic implications // *Mol. Biol. Evol.*, 23 (2): 279–291.
- Chase M.W., Soltis D.E. *et al.* 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequence from the plastid gene *rbcl* // *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 80 (3): 528–580.
- Cronquist A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. Ed. 2. New York, 555 p.
- Degtjareva G.V., Valiejo-Roman C.M., Kramina T.E., Mironov E.M., Samigullin T.H., Sokoloff D.D. 2003. Taxonomic and phylogenetic relationships between Old World and New World members of the tribe Loteae (Leguminosae): new insights from molecular and morphological data, with special emphasis on *Ornithopus* // *Wulfenia*, 10: 15–50.
- Degtjareva G., Valiejo-Roman C., Samigullin T., Sokoloff D. 2006. On generic rank and phylogenetic relationships of *Dorycnopsis* Boiss. (Leguminosae, Loteae) // *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 63 (1): 41–50.
- Degtjareva G.V., Samigullin T.H., Sokoloff D.D., Valiejo-Roman C.M. 2004. Gene sampling versus taxon sampling: is *Amborella* (Amborellaceae) a sister group to all other extant Angiosperms? // *Ботан. журн.*, 89 (6): 896–907.
- Doyle J.J. 1995. DNA data and legume phylogeny: a progress report // M. Crisp and J. Doyle (eds.). *Advances in Legume Systematics*. P. 7. Pylogeny. Kew: Royal Botanic Gardens: 11–30.
- Doyle J.J., Doyle J.L., Ballenger J.A., Dickson E.E., Kajita T., Ohashi H. 1997. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcl* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation // *Amer. Journ. Bot.*, 84 (4): 541–554.
- Friis E.M., Doyle J.A., Endress P.K., Leng Q. 2003. *Archaeofructus*: angiosperm precursor or specialized early angiosperm? // *Trends in Plant Sci.*, 8: 369–373.
- Friis E.M., Pedersen K.R., Crane P.R. 2000. Reproductive structure and organization of basal angiosperms from the Early Cretaceous (Barremian or Aptian) of western Portugal // *Int. J. Plant Sci.* 161 (suppl): S69–S182.
- Friis E.M., Pedersen K.R., Crane P.R. 2001. Fossil evidence of water lilies (Nymphaeales) in the Early Cretaceous // *Nature*, 410: 357–360.
- Gandolfo M.A., Nixon K.C., Crepet W.L., Stevenson D.W., Friis E.M. 1998. Oldest known fossil flowers of monocotyledons // *Nature*, 394: 532–533.
- Gandolfo M.A., Nixon K.C., Crepet W.L. 2002. Triuridaceae fossil flowers from the Upper Cretaceous of New Jersey // *Amer. J. Bot.*, 89: 1940–1957.
- Geuten K., Becker A., Kaufmann K., Caris P., Janssens S., Viaene T., *et al.*, 2006. Petaloidy and petal identity MADS-box genes in the balsaminoid genera *Impatiens* and *Marcgravia*. // *The Plant Journal*, 47 (4): 501–518.
- Goremykin V.V., Hirsch-Ernst K.I., Wolff S., Helliwig F.H. 2003. Analysis of the *Amborella trichopoda* chloroplast genome sequence suggests that *Amborella* is not a basal Angiosperm // *Mol. Biol. Evol.*, 20 (9): 1499–1505.
- Hueber F.M. 2001. Rotted wood-alga-fungus: the history and life of *Prototaxites* Dawson 1859 // *Rev. Palaeobot. Palynol.*, 116: 123–158.
- Martinez E., Ramos C.H. 1989. Lacandoniaceae (Triuridales): una nueva familia de Mexico // *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 76 (1): 128–135.
- Miller J.S. 2002. A revision of *Ehretia* (Boraginaceae) for Madagascar and the Comoro Islands *Adansonia*, ser. 3, 24 (2): 137–157.
- Rodman J.E., Karol K.G., Price R.A., Sytsma K.J. 1996. Molecules, morphology, and Dahlgren's expanded order Capparales // *Syst. Bot.*, 21 (3): 289–307.
- Rudall P.J. 2003. Monocot pseudanthia revisited: floral structure of the mycoheterotrophic family Triuridaceae // *Int. J. Plant Sci.*, 164: S307–S320.
- Rudall P.J., Bateman R.M. 2006. Morphological phylogenetic analysis of Pandanales: testing contrasting hypotheses of floral evolution // *Syst. Bot.*, 31: 223–238.
- Samigullin T.H., Yacentyuk S.P., Degtjareva G.V., Valiejo-Roman C.M., Bobrova V.K., Capesius I., *et al.*, 2002. Paraphyly of bryophytes and close relationship of hornworts and vascular plants inferred from analysis of chloroplast rDNA ITS (cpITS) spacer sequences // *Arctoa*, 11: 31–43.
- Savolainen V., Fay M.F., Albach D.C., Backlund A., van der Bank M., Cameron K.M., *et al.*, 2000. Phylogeny of the eudicots: a nearly complete familial analysis based on *rbcl* gene sequences // *Kew Bull.*, 55: 257–309.
- Shaw J., Renzaglia K. 2004. Phylogeny and diversification of bryophytes // *Amer. J. Bot.*, 91 (10): 1557–1581.
- Sokoloff D.D., Degtjareva G.V., Endress P.K., Remizowa M.V., Samigullin T.H., Valiejo-Roman C.M. Inflorescence and early flower development in Loteae (Leguminosae) in a phylogenetic and taxonomic context // *Int. J. Plant Sci.* (submitted).
- Soltis D.E., Soltis P.S. 2004. *Amborella* not a «Basal Angiosperm»? Not so fast // *Amer. J. Bot.*, 91: 997–1001.
- Soltis D.E., Soltis P.S., Chase M.W., Mort M.E., Albach D.C., Zanis M., *et al.* 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18s rDNA, *rbcl*, and *atpB* sequences // *Bot. Journ. Linn. Soc. (London)*, 133: 381–461.
- Sun G., Ji Q., Dilcher D.L., Zheng S., Nixon K.C., Wang X. 2002. Archaeofractaceae, a new basal angiosperm family // *Science*, 296: 899–904.
- Sun B.-Y., Moon H.K., Kim C.H., Park C.W. 2001. *Mankyua* (Ophioglossaceae): a new fern genus from Cheju Island, Korea // *Taxon*, 50 (4): 1019–1024.
- Taylor T.N. Kerp H., Hass H. 2005. Life history biology of early land plants: deciphering the gametophyte phase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 102 (16): 5892–5897.
- Vergara-Silva F., Espinosa-Matias S., Ambrose B.A., Vazquez-Santana S., Martinez-Mena A., Marquez-Guzman J., *et al.*, 2003. Inside-out flowers characteristic of *Lacandonia schismatica* evolved at least before its divergence from a closely related taxon, *Triuris brevistylis* // *Int. J. Plant Sci.*, 164: 345–357.

Из жизни ракообразных

Р. Борисов



Ростислав Борисов
13-й выпуск биокласса
(Кроссастеры), школа
№ 520 (1991 г.), закончил
кафедру зоологии беспоз-
воночных Биофака МГУ
(1996 г.), к.б.н., старший
научный сотрудник ВНИИ
рыбного хозяйства и океано-
графии, borisovrr@mail.ru

О странных совпадениях в жизни

Как-то, кажется, когда я учился еще в восьмом классе, решил я поучаствовать в биологической олимпиаде для школьников, которую проводят на Биологическом факультете МГУ. И все было хорошо, а местами даже отлично, пока не посетил я кабинет зоологии беспозвоночных. И вот тут произошел облом. Широко известный в узких кругах преподаватель... не только поставил мне низший бал (что это было: два или единица — не помню), но и достаточно популярно и доходчиво объяснил, что я ничего не знаю. Выйдя из аудитории и почесав избыточно волосатый затылок, я подумал, что именно — не помню, время стерло точное содержание мыслей, но они точно были далеки от любви к тем мерзавчикам и тараканам, с которыми мне пришлось только что чуть ближе познакомиться. Больше я ни в каких олимпиадах не участвовал.

Прошло время, и как-то так получилось, что я закончил биокласс, каким-то чудом поступил на Биофак МГУ (спасибо всем одноклассникам и не только, помогавшим мне в этом), а на биофаке оказался на кафедре зоологии беспозвоночных (вот такие бывают совпадения в жизни), и последние годы занимаюсь различными видами десятиногих ракообразных, которых или уже выращивают в аквакультуре или собираются это делать с бедняжками.

На самом деле объектов, которые кардинально различаются между собой, было три: несколько видов речных раков, камчатский краб и гигантская пресноводная креветка. Было предложено написать обзор, обзора у меня не вышло, а получились несколько научно-популярных «сказочек».

Приключения одного замечательного веера

Жил был речной рак, и было у него на заднем конце тела два последних членика. У предпоследнего членика были конечности — уropоды, а у последнего членика конечностей не было, зато был он последним и назывался тельсон. И приспособил их речной рак для выполнения самых разных функций и оснастил необходимыми для того приспособлениями. А люди увидели, что получилось, и назвали поэтично «хвостовым веером» (рисунок 1а). О нем и рассказ наш.

Для начала немного из народного фольклора. Речной рак — один из самых хорошо изученных живых организмов на Земле, и, в то же время, именно с этим видом связано множество народных, а иногда и научных, заблуждений и ошибок, кочующих из поколения в поколение, из книги в книгу. Кому не знакомо выражение «пятиться как рак», а ведь если посмотреть правде в глаза, пятится назад он не чаще, чем другие животные. Да и то правда, кто же захочет подставить врагу спину, особенно когда у тебя есть пара мощных, острых клешней. А когда раку никто не угрожает, то и движется он, как и положено созданию, имеющему передний и задний конец, — уверенно вперед. Но рак хоть и крупное беспозвоночное, но и у него есть много врагов, которых не испугаешь клешнями, и для таких случаев у него есть способ экстренной эвакуации, который, скорее всего, и стал причиной утверждений, что рак движется назад. Только в этом случае не идет он, а плывет. Уropоды разворачиваются и вместе с тельсоном образуют гребную лопасть (рисунок 1а), мощные мышцы брюшка резко сокращаются, гребная лопасть совершает гребок, и речной рак быстро плывет назад. Осуществление такого внезапного отступления и есть основная функция хвостового веера, в основе которой — способность хвостового веера разворачиваться в момент гребного удара, увеличивая свою площадь, и складываться, уменьшая ее во время возвратного движения. Эта способность и послужила основанием для возникновения названия «хвостовой веер». По такому принципу работает большинство конечностей и щетинок членистоногих, используемых в качестве гребных лопастей. При движении в направлении удара происходит максимальное

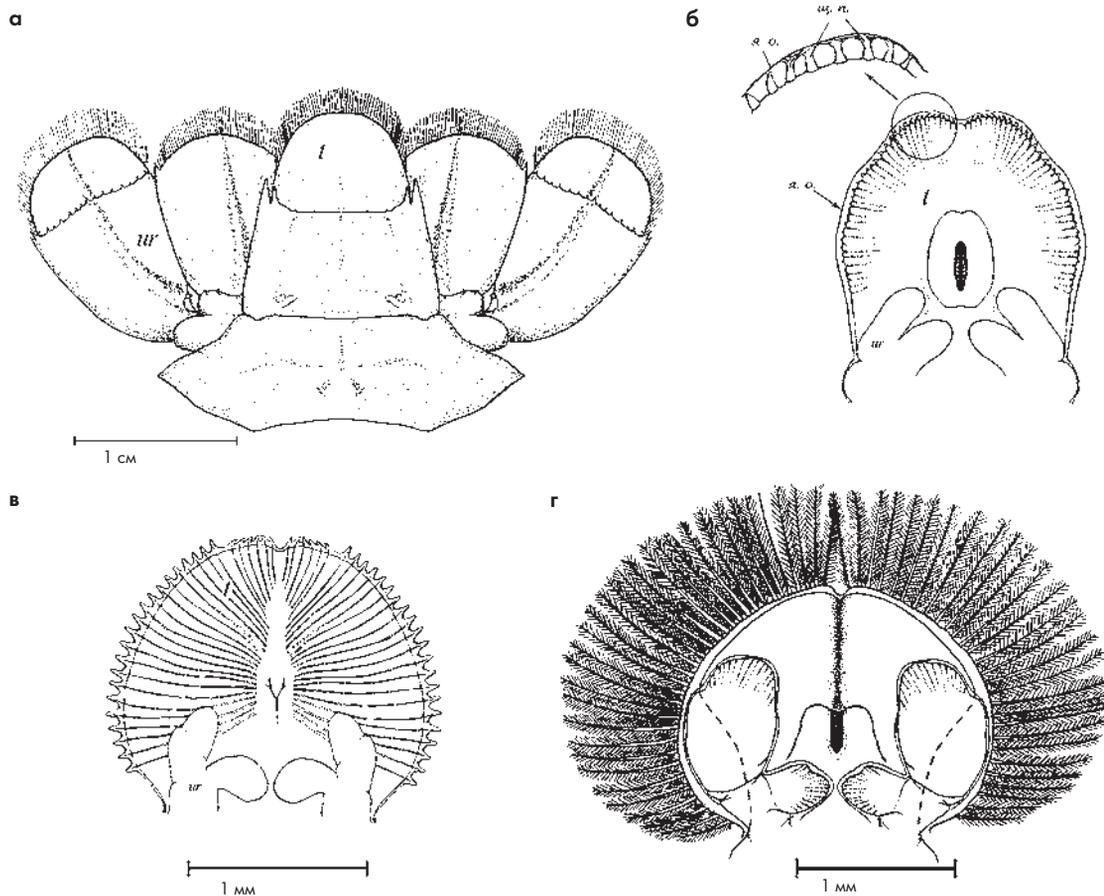


Рисунок 1. Хвостовой веер рака *Pontastacus leptodactylus*.

(а) — хвостовая лопасть *P. leptodactylus* (вид снизу); (б) — незадолго до вылупления; (в) — у личинки 1-й стадии; (г) у личинки 2-й стадии: щ. п. — щетиночные предшественики; я. о. — яйцевая оболочка; т — тельсон; у. р. — зачатки уropод.

раскрытие, разворачивание конечностей, щетинок и вторичного вооружения щетинок, при этом их строение обеспечивает в таком положении максимальную жесткость. Гребные конечности ракообразных, как правило, несут по краю многочисленные, часто специализированные, щетинки, которые увеличивают площадь гребной поверхности и, благодаря своей упругости, обеспечивают плавность гребного движения. По краю уropод и тельсона речного рака также расположен ряд специализированных гребных щетинок. Следом за фазой удара наступает фаза возврата, когда конечность возвращается на исходную позицию, при этом конечность просто движется в обратном направлении, а все ее элементы складываются, сводя сопротивление воде к минимуму. Таким образом, конечности просто движутся вперед-назад. Так работают, например, плеоподы (брюшные ножки) и экзоподиты ногочелюстей рака. Правда, такой способ, видимо, больше подходит для обитателей водной среды, а покорители воздуха, например птицы и насекомые, уменьшение сопротивления при возвратном движении крыльев реализуют в

основном за счет изменения траектории движения крыла. Впрочем, многие животные разумно совмещают оба способа. Кстати, мы, когда плывем, так же как птицы меняем траекторию движения рук, а когда собираемся полететь, машем ими в точности, как рак плеоподами. Может, поэтому люди не летают?

Хвостовой веер у речных раков выполняет не одну, а несколько функций. Впрочем, раки в этом далеко не оригинальны, мультифункциональность свойственна большинству конечностей, да и настоящие хвосты многих животных чаще всего успешно выполняют не одну, а сразу несколько функций. Вспомнить хотя бы млекопитающих, у многих видов которых хвост не только банальный балансир, но и теплый платок, и помощь в борьбе с мухами, и т.д.

Так какие еще функции выполняет хвостовой веер у речных раков?

Ну, во-первых, естественно, он работает как балансир и руль во время движения. Кстати, у некоторых представителей отряда Мизид (*Mysidacea*) органы равновесия располагаются именно в хвостовом веере.

Во-вторых, у самки, подгибаясь вниз, он защищает икру и личинок, находящихся под ее брюшком. При этом, он не претерпевает никаких изменений в сравнении с хвостовым веером самцов.

В-третьих, с его помощью регулируются токи воды в норе, что важно для дыхания.

В-четвертых, велика его роль как места расположения рецепторов. Хвостовой веер максимально удален от основных рецепторных органов, расположенных на голове животного. И нет ничего удивительного, что на нем развились различные рецепторные системы, например измеряющие малейшие токи воды (механо-чувствительные щетинки), и даже каудальный фоторецептор, способный отличить свет от темноты.

Еще одну важную функцию он выполняет еще до того момента, как станет «веером», и связана она с заботой о потомстве. Но для того, чтобы узнать, что объединяет хвост и заботу о потомстве, нужно посмотреть на рачка еще до того момента, как он вылупится из икринки.

Заглянем в висящую на плеоподах самки икринку за несколько дней до вылупления. В икринке почти сформировавшийся рачок. Он сильно отличается от взрослого рака. Его ротовые конечности и желудок не готовы обрабатывать пищу, да и зачем это нужно, когда еще остался такой большой запас желтка в головогрудь. Конечности и тело рачка практически лишены щетинок, а на их месте располагаются шиповидные выросты кутикулы, так называемые щетиночные предшественники. Все тело рачка, как чехлом, одето тонкой эмбриональной оболочкой. Но мы, вроде, рассматриваем историю хвостового веера, поэтому посмотрим, что у животного на заднем конце. А там у него — округлая лопасть (рисунок 16). Собственно почти все это — тельсон. Уроподы тоже есть, они в виде небольших двулопастных зачатков видны в основании тельсона, причем они вместе с тельсоном находятся внутри единой хвостовой лопасти. По краю хвостовой лопасти располагаются щетиночные предшественники.

Расположенные на вершине щетиночные предшественники (12–16 шт.) не оканчиваются заостренной вершиной, как другие, а прирастают к эмбриональной оболочке (рисунок 16), плотно облегающей тело зародыша. Зачем это нужно, становится ясно, когда происходит вылупление. Яйцевая оболочка лопается, и между двумя ее похожими на часовые стеклышки половинками показывается тело рачка. Оно повисает на «гиалиновой нити», которая тянется от его хвостовой лопасти до стебелька яйца. Эта «гиалиновая нить» и есть та самая эмбрио-

нальная оболочка, которую мы наблюдали, заглядывая в икринку незадолго до вылупления. Эта связь с самкой сразу после рождения жизненно необходима только что вылупившемуся рачку, потому что первые несколько часов после вылупления он еще не в силах уцепиться за плеоподы самки, и не будь этой связующей их нити, он просто оказался бы на дне, лишенный материнской заботы. Проходит несколько часов после вылупления, и рачок прочно хватается клешнями (которые специально модифицированы для этой функции) за щетинки плеопод самки и остатки яйцевых оболочек. До конца стадии он висит под брюшком самки практически неподвижно, развиваясь за счет желтка оставшегося в головогрудь. Уже ненужная нить вскоре обрывается. Хвостовая лопасть на первой стадии округлая, лишенная щетинок (см. рисунок 1в). Спустя неделю-полторы рачок линяет на следующую стадию, у него появляются многочисленные щетинки, он начинает питаться, активно двигаться и уже очень похож на взрослого рака.

А что же хвостовой веер? А хвостового веера по-прежнему нет. Ставшие уже достаточно крупными плеоподы все еще находятся внутри единой хвостовой лопасти вместе с тельсоном (рисунок 1г). По краю хвостовой лопасти появился ряд гребных щетинок, и рачок уже может плыть назад. В течение этой стадии происходит значительное увеличение плеопод, а тельсон, напротив, уменьшается в размерах, и после следующей линьки плеоподы, наконец, обретают свободу, и хвостовой веер раскрывается во всей своей красе.

P.S. А еще в стародавние времена почитали речного рака за священное животное, отмеченное Богом. Потому что если посмотреть сверху на тельсон, то можно увидеть очертания креста.

Как краб четыре раза ходить учился, или четыре формы движения в онтогенезе камчатского краба

Нелегко живется большинству беспозвоночных. Не жизнь, а сплошное превращение. То одна личинка, то другая, то плывешь, то ползешь, то сидишь. Да и на себя часто совсем не похож бываешь. Вот и камчатский краб. Большой краб, вкусный. Живет до 25 лет, весить может до 12–15 кг, размах ног более 1,5 м, а из яйца выходит маленькой планктонной личинкой длиной всего-то пара миллиметров, и на взрослого краба она совсем не похожа, ну ничем не похожа — особенно с первого взгляда. И пока

она превратится в маленького-маленького (все те же несколько миллиметров) краба, она трижды меняет органы движения и двигаться будет то хвостом вперед, то головой, то вообще буквой «зю». А гребти сначала хвостом, потом одними ногами, потом совсем другими, и так — пока не разучится плавать и не научится ходить на шести ногах (странно, почему шести ногам, когда отряд называется десятиногие?). Если интересно, читаем дальше и вникаем в подробности функциональной морфологии двигательного аппарата краба и изменений, которые он претерпевает в процессе онтогенеза.

Итак, из яйца выходит личинка, и зовут ее прозоэа (рисунок 2а). Странная стадия, очень короткая, всего около часа. Тонкая кутикула плотно одевает тело уже сформировавшейся личинки следующей стадии — зоэа I. Только щетинки, рострум и другие шипы тела еще не развернулись, они ввернуты внутрь тела личинки. Развернутся щетинки, распрямятся рострум, порвется тонкая оболочка — и превратится прозоэа в зоэа I. А что же прозоэа? Ведь и час надо как-то жить, а жизнь, как известно, — это движение. И прозоэа движется. Щетинок у прозоэа нет, зато есть большие полые перистые кутикулярные выросты на антеннах, антеннулах и тельсоне (рисунок 2б). Они мягкие, как и вся прочая кутикулярная оболочка прозоэа. Стенки кутикулярных выростов тонкие, как и другие части оболочки, а вторичные выросты на них полые. Для чего они нужны личинке? Они нужны для движения. Как? А вот как. На тельсоне в эти полые образования больше чем на половину длины заходят

щетинки тельсона будущей зоэа I (рисунок 2б), и это делает их достаточно упругими, чтобы ими можно было гребти. Прозоэа и гребет, вернее, совершает ритмичные хлопки тельсоном за счет сокращения мышц брюшка, это похоже на то, как движутся куколки кровососущих комаров, только куколки располагаются в воде головой вверх, а личинка краба — головой вниз. Личинка тяжелее воды, и, когда она не гребет, она опускается на дно, но выросты на антеннах и антеннулах помогают замедлить скорость погружения. Но такая странная жизнь длится недолго, проходит несколько минут или часов, оболочка прозоэа лопается, выросты и щетинки выворачиваются наружу, и мы видим перед собой зоэа I. И тут оказывается, что тельсон зоэа несет хоть и жесткие, но достаточно короткие щетинки, которые имеют совершенно не приспособленное для плавания вторичное вооружение (короткие шиповидные сетулы) — этим гребти нельзя. Как же она плывет и чем гребет?

Личинка поменяла органы движения, теперь у нее есть экзоподиты максиллипед (ногочелюстей) I и II, несущие мощные гребные щетинки. Личинка использует их для движения, и движется она вперед хвостом, который, по-видимому, служит рулем. Зоэа I линяет и превращается в зоэа II (см. рисунок 2в), которая, по большому счету, мало чем отличается от первой стадии. Хотя нет, то ли из-за увеличения размеров, а может быть, и по какой-то другой причине, зоэа II приобретает еще одну пару движителей — экзоподиты максиллипед III.

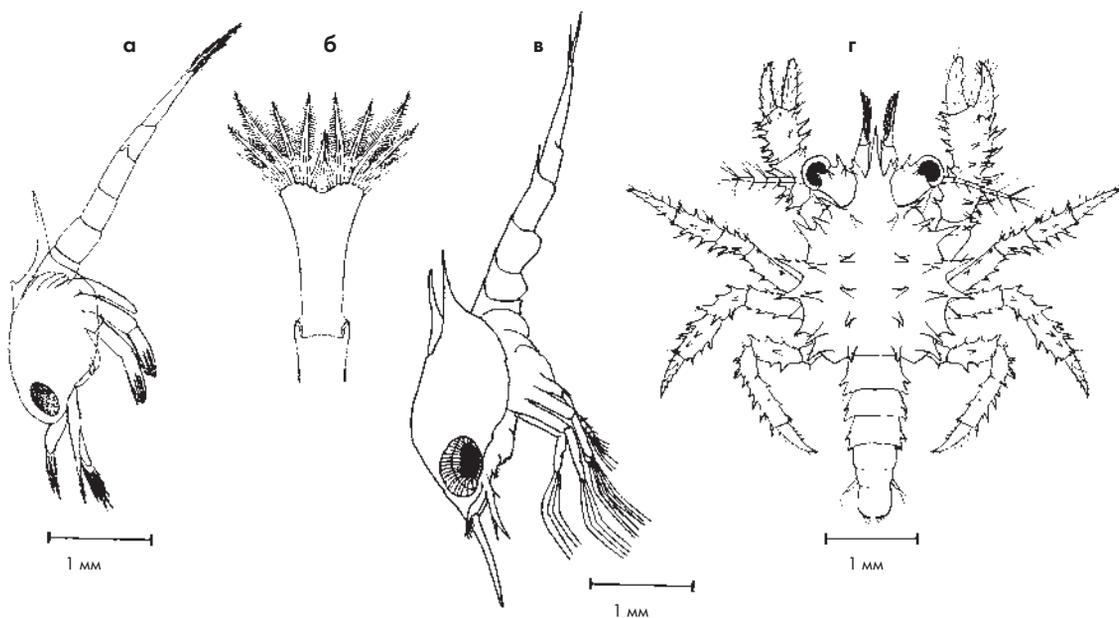


Рисунок 2. Стадии онтогенеза камчатского краба.

(а) — прозоэа; (б) — тельсон прозоэа; (в) — зоэа II; (г) — глаукотэа.

Описанный способ движения и двигательный аппарат остаются неизменными и у зоэ третьей и четвертой стадии.

Но вернемся к началу. Что это за сосисковидные выросты видны под карапаксом еще на стадии прозоэ, и их размер увеличивается с каждой следующей стадией? На четвертой стадии уже совершенно отчетливо становится видно, что это постепенно формируются переоподы — грудные конечности, на которых, собственно, и перемещается взрослый краб. Зоэ IV линяет на следующую стадию, называемую послеличинкой, или глаукотэ (рисунок 2г). У глаукотэ уже есть развитые переоподы, но ходит она на них с трудом, они больше приспособлены для того, чтобы цепляться за субстрат. Зато глаукотэ умеет плавать, используя для этого четыре пары брюшных конечностей — плеопод, которые на этой стадии снабжены мощными плавательными щетинками. За предыдущие стадии крабу, видимо, надоедает висеть вниз головой, и глаукотэ движется головой вверх. Переоподы глаукотэ, когда плывет, держит растопыренными, отчего напоминает брошку. Экзоподиты максиллипед на стадии глаукотэ не исчезают, но становятся относительно мельче и утрачивают свое значение в качестве движителей. Они по-прежнему используются для создания токов воды, но эти токи уже не связаны с движением. Вододвигательная функция сохраняется за экзоподитами максиллипед и у взрослых крабов. Вообще, глаукотэ — замечательная стадия, существует она около месяца и все это время не питается. Главная задача глаукотэ — это не поесть, а найти подходящий субстрат для оседания. А поесть глаукотэ не смогла бы, даже если бы захотела, поскольку ротовые конечности лишены щетинок и в значительной степени атрофированы, не способен переваривать пищу и желудок глаукотэ.

И вот подходящий субстрат найден. Глаукотэ прикрепляется к нему и даже практически утрачивает способность плавать. Проходит некоторое время — и глаукотэ линяет на первую ювенильную стадию (рисунок 3). Ювениль уже крепко стоит на шести лапах. Шести — потому что первая пара брюшных ног превращена в клешни и используется для захвата и обработки

пищи. А пятая пара находится под карапаксом в жаберной камере. Она больше всего напоминает ершик для мытья посуды и используется для очистки жабр от загрязнений. Плеоподы, служившие глаукотэ для плавания, у ювенильных особей исчезают и появляются вновь позже и только у самок, которые на них вынашивают икру, но это уже совсем другая история.

Хозяин гарема, или как любовь побеждает каннибализм

Так уж случилось, что самцы гигантской пресноводной креветки (*Macrobrachium rosenbergii*) являются хозяевами гаремов. Хорошо ли гарем или плохо, споры об этом среди людей продолжаются много столетий, и общество так и не пришло к единому мнению. Одни утверждают, что гарем — это есть очень хорошо. Особенно так любят говорить мужчины, которые больше мечтают о гареме как о чем-то абстрактном, и меньше думают о том, как его содержать. Вторые, напротив, утверждают, что у каждой женщины муж должен быть пусть плохенький, но свой. Третьи, совсем уж феминистически настроенные, вовсе считают, что семья как ячейка общества уже изжила себя. В то время, как мы дискутируем о нашем семейном укладе, для многих видов животных он уже давно и прочно сложился в том или ином виде. Так вот, у креветок хороший самец является хозяином гарема из нескольких самок. Хороший самец — это значит, что он большой, а вторая пара клешней раза в полтора длиннее тела и окрашена в темносиний цвет. Клешни самцу нужны, чтобы охранять свой гарем от других самцов, а также чтобы поддерживать порядок в своем гареме, охраняя самку во время спаривания от нападения, в том числе и других самок.

Для многих, но не для всех, декапод характерно, что оплодотворение происходит сразу после линьки самки. Гигантская пресноводная креветка — не исключение.

Тут следует сделать небольшое отступление и поговорить о таком аморальном явлении, как каннибализм. Особенно эта тема неприятна для производителей ракообразных, поскольку это явление является одной из главных причин, тормозящих интенсификацию их промышленного выращивания, а иногда и просто делает его невозможным. Дело в том, что, являясь полифагами или даже хищниками-полифагами, при содержании в условиях высоких плотностей многие представители десятиногих ракообразных начинают активно поедать своих собратьев. Особенно часто это происходит во время линьки,



Рисунок 3. Ювенильная особь камчатского краба.

когда покровы жертвы мягкие и уязвимые. В естественной среде линька также не сулит ничего хорошего, многие хищники готовы с удовольствием скушать практически беззащитное животное. Теперь вы представляете, в каком уязвимом состоянии находится самка после линьки.

Но вернемся к поведению самца, самки и других обитателей гарема. Незадолго перед репродуктивной линькой самец начинает проявлять интерес к самке, преследует ее, постоянно находится рядом, отгоняет других креветок. После линьки самец остается рядом с практически беспомощной самкой и активно ухаживает за ней, что выражается в подъеме карапакса и тела, колебании антенн, подъеме и вытягивании второй пары переопод. Часто самец как будто обнимает самку, охватывая ее своими длинными клешневыми конечностями (рисунок 4), то и дело как будто успокаивающе поглаживает антеннами, чистит верхнюю часть головогруди переоподами. Все эти действия не характерны для обычного поведения, не связанного с размножением. Единственное, на что категорически не согласен самец — это отпустить от себя самку. Обращает на себя внимание также отсутствие агрессии самца к самке, часто проявляемой в обычном поведении. Ухаживая за самкой, самец не забывает бдительно охранять ее от посягательств других самцов, но самое главное — от других самок гарема, готовых растерзать соперницу. Благодаря такой защите, так



Рисунок 4. Самец гигантской пресноводной креветки ухаживает за самкой.

необходимой после линьки, самка избегает агрессии со стороны других особей группы. Затем происходит оплодотворение. Самка находится в положении брюшной стороной вверх, самец давит сверху вниз. Гонопоры самца входят в контакт с брюшной стороной карапакса самки. Вместе с внезапными сильными колебаниями плеопод и дрожанием тела семенная жидкость в виде желатиновой массы выбрасывается в середину брюшной части головогруди самки и прикрепляется в виде сперматофоров. Через 5–10 ч после спаривания самка откладывает яйца.

Рентгеноструктурный анализ белков

Е. Горячева



Екатерина Горячева
13-й выпуск биокласса
(Кроссастеры), школа
№ 520 (1991 г.), закончила
кафедру биофизики Биофа-
ка МГУ (1996 г.), к.б.н.,
сотрудник Института биоор-
ганической химии РАН (лаб.
рентгеноструктурного ана-
лиза), goryacheva@ibch.ru

В природе встречается примерно 10^{12} различных белков, выполняющих самые разнообразные функции. Это и белки-ферменты, катализирующие большинство биохимических процессов в живой клетке; и белки-переносчики, позволяющие другим молекулам проходить через ядерные или клеточные мембраны или перемещаться между клетками всего организма (перенос кислорода гемоглобином); и иммуноглобулярные белки, отличающиеся высокой специфичностью взаимодействия с антигенами, что приводит к активации сигнальных путей, обеспечивающих иммунный ответ клеток. Это лишь несколько примеров уникальных свойств белковых молекул. По образному выражению Фрэнсиса Крика, белки важны прежде всего потому, что они могут выполнять самые разнообразные функции, причем с необыкновенной легкостью и изяществом.

При всем своем структурном и функциональном многообразии все природные белки построены из 20 аминокислот, соединенных в соответствии с кодом белкового синтеза. В зависимости от последовательности аминокислотных остатков в полипептидной цепи формируется определенная стабильная трехмерная структура белка, определяющая его структурные и функциональные свойства. Например, для каждого фермента характерна уникальная пространственная конформация его активного центра, обеспечивающего взаимодействие со строго определенными молекулами субстратов и осуществляющего каталитический акт. Причем, для эффективного образования фермент-субстратного комплекса большое значение имеет не только геометрическая комплементарность молекул фермента и субстрата, но и образование

водородных связей, электростатические и гидрофобные взаимодействия между атомами активного центра фермента и молекулы субстрата. Таким образом, любая белковая молекула характеризуется уникальностью структуры, которая определяет уникальность ее функции.

Выяснение пространственной организации белков является одним из основных направлений современной биохимии. Оно имеет важное научно-практическое значение для понимания огромного разнообразия функций белков, выполняемых ими в живых организмах. Во многих случаях знание структуры белка и его комплекса с ингибиторами является решающим фактором при создании лекарственных препаратов.

На сегодняшний день единственным экспериментальным способом с атомарной точностью узнать, что представляет собой трехмерная структура белка, является рентгеноструктурный, или кристаллографический, анализ, позволяющий определить пространственные координаты всех атомов исследуемого объекта. При наличии данных о положении отдельных атомов можно вычислить межатомные расстояния, валентные углы, углы вращения вокруг связей, распределение поверхностного заряда и другие детали молекулярной геометрии. Все эти данные особенно интересны химикам, биохимикам и биологам, изучающим зависимости между структурными характеристиками и функциональными свойствами, а также специалистам, занимающимся электронной структурой и взаимодействиями между молекулами.

Определение структур макромолекул имеет не только фундаментальное значение, но и большое прикладное применение. Рентгеновская кристаллография широко используется для дизайна и направленной модификации молекул с целью дальнейшего их использования в медицине и промышленности. Например, знание структуры белка и его комплекса с ингибиторами является решающим фактором при создании лекарственных препаратов.

Рентгеноструктурный анализ занимает особое место среди экспериментальных методов, и постоянный интерес к нему отражен в том факте, что с момента открытия рентгеновских лучей в 1901 г. по настоящее время работы в этой области 12 раз отмечались Нобелевскими премиями.

Применение рентгеноструктурного анализа для исследования сложноорганизованных биологических объектов началось после 1953 г., когда сотрудник Кавендишской лаборатории Кембриджского университета Макс Перуц нашел способ определения структуры крупных молекул, таких как миоглобин и гемоглобин. С тех пор рентгеноструктурный анализ молекул белка помогает нам понять химию биологических реакций.

На сегодняшний день известны структуры около 15 тыс. белков и их комплексов с биологически важными молекулами.

Рентгеновский эксперимент

Подобно радиоволнам и видимому свету, рентгеновские лучи являются электромагнитными волнами, которые занимают диапазон длин волн примерно 0.001–10 нм. С коротковолновой стороны они соседствуют с γ -лучами (длины волн примерно 0.01–0.0001 нм), с длинноволновой — с ультрафиолетовыми (длины волн примерно 10–380 нм).

Одним из необходимых условий проведения рентгеновского эксперимента является монохроматическое рентгеновское излучение (т.е. строго определенной длины волны). Для этой цели используются различные фильтры и монохроматоры.

Рассмотрим, каким образом происходит исследование структуры объекта в рентгеновском эксперименте. Обычно, когда нормальный человек слышит о рентгеновском исследовании, у него возникает образ рентгеновского кабинета в поликлинике. На самом деле рентгеноструктурный анализ не имеет ничего общего с такими исследованиями. Основой медицинской рентгеноскопии является различие в степени поглощения рентгеновских лучей различными тканями. В медицине рентгеновский снимок содержит **прямое** изображение исследуемого объекта, в то время как рентгеновская кристаллография основана на рассеянии рентгеновских лучей электронами атомов, и фотографические снимки, получаемые в нем, **не содержат никакого изображения чего бы то ни было**. Как же ставится рентгеновский эксперимент? Принципиальная схема проста (рисунок 1). Исследуемый объект помещают в пучок рентгеновских лучей, и измеряют интенсивность **рассеянного** в различных направлениях излучения. Самый простой способ — поместить на пути фотопленку и по степени потемнения пятна после проявления судить об интенсивности рассеяния в этом направлении. (Конечно,

на сегодняшний день существуют и более совершенные методы, но сейчас это неважно.) В данном случае важно то, что мы смотрим не на интенсивность лучей, прошедших сквозь объект, а на интенсивность лучей, возникших там, где их вроде бы и не должно было быть.

Итак, на входе мы имеем неизвестный объект, на выходе — набор интенсивностей, рассеянных в различных направлениях лучей. Дальнейшая наша задача — связать полученную в эксперименте информацию с атомной структурой исследуемого объекта. Перечислим основные положения, на которых строится простейшая *математическая модель рассеяния рентгеновских лучей*:

- 1) пучок рентгеновских лучей является плоской монохроматической электромагнитной волной;
- 2) под воздействием этой электромагнитной волны каждый электрон приходит в движение; при этом это движение может быть описано уравнениями для свободных зарядов;
- 3) движущийся электрон является, в свою очередь, источником новой рассеянной сферической электромагнитной волны, распространяющейся во всех направлениях;
- 4) эти новые волны суммируются и определяют интенсивность излучения в интересующем нас направлении.

Такая модель называется кинематической теорией рассеяния. Ее основной недочет заключается в том, что на электрон действует не только первичный пучок, но и рассеянные волны, и их влияние может изменять характер его движения. Попытка учесть эти поправки делается в более изощренной динамической теории рассеяния, однако для практических приложений более простая кинематическая теория рассеяния оказывается, как правило, вполне хороша.

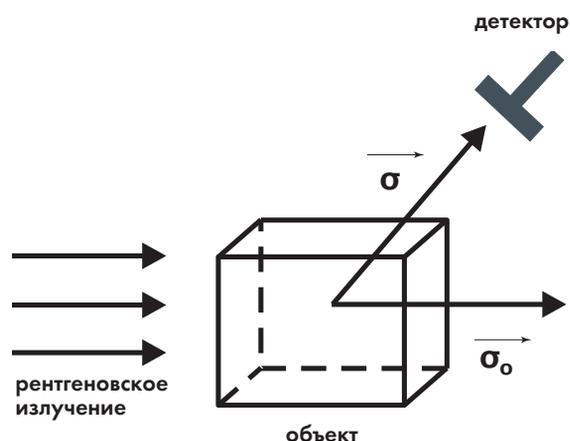


Рисунок 1. Схема рентгеновского эксперимента.

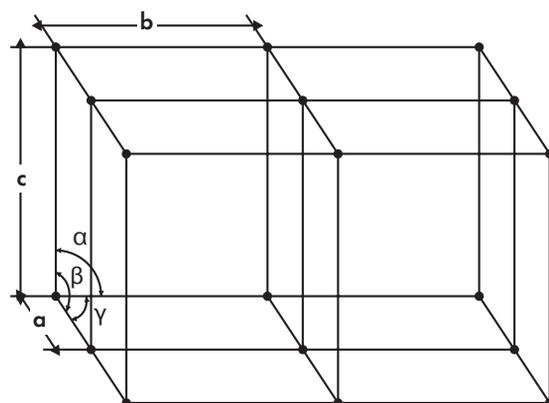


Рисунок 2. Модель кристаллической решетки.

Необходимость кристаллизации исследуемых объектов

Метод рентгеноструктурного анализа основан на дифракции рентгеновских лучей на кристаллической решетке и поэтому применим только к веществам в кристаллическом состоянии. Это связано с тем, что для регистрации дифракционной картины рассеяния необходимо иметь достаточное количество рассеивающих электронов. Но если образец состоит из большого числа идентичных молекул, расположенных в произвольной ориентации (раствор), то картина рассеяния будет определяться какими-то усредненными по всевозможным ориентациям характеристиками и вряд ли позволит получить детальную информацию об атомной структуре. Другое дело, если большое количество одинаковых экземпляров одной и той же молекулы помещены в одной и той же ориентации. Такую возможность дают нам кристаллические образцы. Говоря простыми словами (и не вдаваясь в сложные математические формулировки), кристалл — это такой образец исследуемого вещества, в котором много ($\sim 10^{12}$) идентичных молекул находятся в одинаковой ориентации, и их центры образуют правильную трехмерную решетку.

Основная особенность структуры каждого кристалла состоит в том, что он построен из регулярно расположенных в пространстве отдельных атомов или групп атомов. Если каждую повторяющуюся структурную единицу заменить точкой, или узлом, то получится трехмерная кристаллическая решетка (рисунок 2). Решетку можно представить себе как систему одинаковых параллелепипедов. Каждый такой параллелепипед носит название «элементарная ячейка кристалла», которая описывается шестью параметрами: длинами ребер (a , b , c) и углами между ними (α , β , γ).

Одной из основных претензий к методу рентгеноструктурного анализа с самого начала исследования структур белков являлась та, что в жизни белки находятся в растворе, а при исследовании мы их кристаллизуем. Задавался логичный вопрос: не деформируется ли структура белковой глобулы при кристаллизации настолько, что структура белка в кристалле перестает иметь что бы то ни было общее со структурой белка в функционально активном состоянии? В современных исследованиях принято считать, что сильных искажений все-таки не происходит. Некоторые доводы в пользу такой позиции следующие. Во-первых, ряд белков сохраняет ферментативную активность и в закристаллизованном состоянии, т.е. структура портится не настолько, чтобы белок стал «неработоспособен». Другое соображение — в кристаллах биомакромолекул значительный объем (от 30 до 80%) занимает растворитель, т.е. упаковка молекул белка в кристалле неплотная и вряд ли вызывает существенные искажения. Некоторые искажения в свободных петлях, наверное, возможны, но структура активного центра сохраняется. Еще одно подтверждение — альтернативное определение структур некоторых белков методом двумерного ядерного магнитного резонанса не дало существенных расхождений со структурами, расшифрованными рентгеновскими методами.

Результат эксперимента и его связь с исследуемой структурой

Монохроматическое рентгеновское излучение, проходя через кристалл, рассеивается, в основном, на электронных оболочках периодически повторяющихся атомов и образует дифракционную картину, или рентгенограмму (рисунок 3). Поэтому экспериментальные рентгеновские данные позволяют судить об особенностях расположения электронов в элемен-

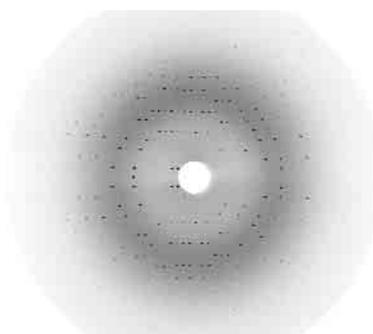


Рисунок 3. В дифракционной картине заключена вся информация о структуре белка.

тарных кристаллических ячейках. Электрон обладает волновыми свойствами, и его положение в пространстве характеризуется не точными координатами, а функцией распределения электронной плотности $\rho(r)$, которая дает среднее по времени число электронов, приходящееся на 1 \AA^3 (кубический Ангстрем). На основании этой функции можно судить о расположении атомов в элементарных ячейках, т.к. каждому атому соответствует сгусток электронной плотности определенной величины. Таким образом, при обработке данных рентгеновского эксперимента нужно решить две задачи:

1. Из данных рентгенограммы получить карту распределения электронной плотности $\rho(r)$ в кристалле исследуемого объекта. На этом этапе возникает принципиальная трудность (о которой речь пойдет ниже), связанная с невозможностью получить из эксперимента всю информацию, необходимую для восстановления исследуемой структуры. Для получения недостающей части информации используют различные обходные пути. Но универсального пути нет, и в каждом случае исследователь выбирает наиболее подходящий, основываясь на своем опыте и интуиции.
2. На основании карты распределения электронной плотности $\rho(r)$ определить положения атомов в исследуемом объекте. Для решения этой задачи структура многократно подвергается программной обработке и ручной доводке для достижения наилучшего совпадения с электронной плотностью.

Основные этапы определения структуры белка

Выделение, очистка

С этого этапа начинаются практически все экспериментальные исследования белковых структур. Для получения нужного белка используют различные биохимические методы. Последовательность операций по выделению белков обычно сводится к измельчению биологического материала (гомогенизация), извлечению белков, а точнее — переводу белков в растворенное состояние (экстракция), и выделению исследуемого белка из смеси других белков, т.е. очистке и получению индивидуального белка. На этом этапе наибольшая сложность заключается в наработке достаточного для эксперимента количества чистого белка.

Кристаллизация

Получение кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа, — зачастую (особенно для сложных соединений, таких как белки и

нуклеиновые кислоты) процесс трудоемкий и далеко не тривиальный. Наличие пересыщенного раствора — необходимое условие кристаллизации. Для получения такого раствора используют различные способы. Один из них заключается в постепенном удалении растворителя обычным испарением, что приводит к росту концентрации вещества в растворе, который в какой-то момент становится пересыщенным. Другой способ связан с использованием температурной зависимости растворимости. Например, если растворимость с увеличением температуры повышается, можно приготовить насыщенный раствор при более высокой температуре, а затем медленно охладить его. Благодаря понижению растворимости в процессе охлаждения получается пересыщенный раствор. Третий способ связан с введением в раствор какого-либо вещества, вызывающего понижение растворимости. В качестве таких веществ используют либо соли, либо органические растворители. Кроме того, растворимость белков и нуклеиновых кислот сильно зависит от рН раствора, это тоже можно использовать для получения пересыщенных растворов.

Это — в теории. На практике все намного сложнее. До сих пор не существует универсальных способов подбора оптимальных условий кристаллизации. Для каждого конкретного белка исследователь ищет эти условия, меняя тип буфера, значения рН, температуры, концентрации самого белка, осаждающей соли и т.д. В этой работе важно найти такие условия, при которых получится именно кристалл, а не выпадет соль. Поэтому выращивание биологических кристаллов — не только научное направление, но и большое искусство. Иногда, чтобы заставить белок кристаллизоваться, его помещают в экзотические условия: например центрифугируют или отправляют в невесомость.

Выбор кристаллов для рентгеновского эксперимента производят с помощью микроскопа. Для этой цели особенно полезен поляризационный микроскоп, позволяющий с помощью поляризационного света установить наличие дефектов в кристалле. Оптимальными считаются монокристаллы с размером каждой из сторон 0,2–0,6 мм. Кристаллы должны быть без дефектов и, по возможности, с хорошей огранкой. Наличие дефектов приводит к ошибкам при экспериментальном измерении дифракционной картины и, как следствие, к неточности (а часто и к невозможности) расшифровки кристаллической структуры. При повышении сложности исследуемого объекта требования к качеству кристаллов повышаются. Как выглядят кристаллы белков, показано на рисунке 4.

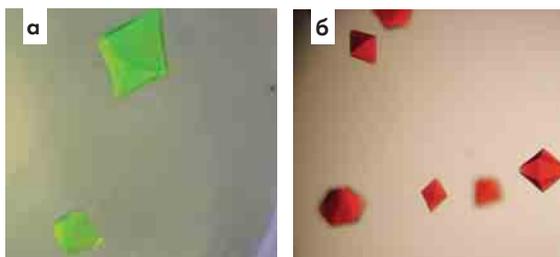


Рисунок 4. Кристаллы белков.

(а) — кристаллы зеленого флуоресцентного белка zGFP506; (б) — кристаллы мутанта белка zGFP506 с аминокислотной заменой N66D.

К сожалению, далеко не из всех белков удается вырастить кристалл, поэтому этот этап является главным ограничением метода рентгеноструктурного анализа макромолекул.

Рентгеновский эксперимент, обработка результатов

Это, пожалуй, самый дорогостоящий эксперимент в молекулярной биологии. В качестве источника рентгеновских лучей в настоящее время стараются использовать синхротронный ускоритель. Это довольно дорогое сооружение. Лабораторные рентгеновские установки тоже используются, но синхротрон имеет ряд преимуществ:

— мощность пучка. Здесь два плюса. Первый понятен — сокращается время эксперимента. Второй — биологические кристаллы имеют тенденцию разрушаться под действием рентгеновского излучения. Процесс разрушения занимает определенное время. Если пучок мощный — можно успеть зарегистрировать нужную картину, пока кристалл не разрушился;

— возможность получить желаемую длину волны. Рентгеновские трубки дают мощный пучок только фиксированной длины волны (обычно около 1.57Å), в то время как при проведении эксперимента зачастую необходимо иметь возможность выбора длины волны. Это позволяет сделать синхротрон.

Обработка результатов рентгеновского эксперимента базируется на мощном математическом аппарате, который я не буду приводить в данном обзоре. Остановлюсь лишь на основных моментах. Функция электронной плотности в кристалле является периодической, она может быть представлена в виде комплексного ряда Фурье:

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} \mathbf{F}_{\mathbf{h}} e^{2\pi i(\mathbf{h}, \mathbf{r})},$$

где \mathbf{r} — вектор координат, V — объем элементарной кристаллической ячейки, а трехмерный век-

тор $\mathbf{h} = (h, k, l)$ принимает все целочисленные значения. Комплексный коэффициент $\mathbf{F}_{\mathbf{h}}$ называется структурным фактором. Поскольку $\mathbf{F}_{\mathbf{h}}$ — вектор, его можно представить в виде:

$$\mathbf{F}_{\mathbf{h}} = |\mathbf{F}_{\mathbf{h}}| \cdot e^{i\phi_{\mathbf{h}}},$$

где $\mathbf{F}_{\mathbf{h}}$ — модуль структурного фактора, а $\phi_{\mathbf{h}}$ — фаза.

Когда монохроматический рентгеновский луч падает на кристалл, определенным образом ориентированный относительно падающего луча, то рассеяние происходит в дискретных направлениях, определяемых кристаллической решеткой. Дифракционная картина, возникающая на пленке детектора (рисунок 3), представляет собой набор пятен, или рефлексов, пронумерованных с помощью векторов \mathbf{h} . Согласно кинематической теории рассеяния, интенсивность каждого отдельного рефлекса пропорциональна квадрату модуля структурного фактора. Измерив интенсивность рефлексов, можно получить значения модулей структурных факторов, и чтобы определить искомую функцию распределения электронной плотности $\rho(\mathbf{r})$, недостает только значений фаз. Если для какого-либо кристалла фазы определены, то расчет положений атомов этого кристалла не составляет принципиальных трудностей. Таким образом, центральная проблема метода рентгеноструктурного анализа, называемая «фазовой проблемой», заключается в невозможности получения всех необходимых для расчета данных непосредственно из эксперимента. На сегодняшний день существуют различные подходы к решению «фазовой проблемы», а также активно ведутся работы по развитию новых методов, позволяющих оценить значения фаз структурных факторов.

Решение «фазовой проблемы»

Общего решения «фазовой проблемы» на сегодня не существует. Каждый случай требует специального подхода. Здесь важно понимать, что новая информация не берется ниоткуда. Для того, чтобы получить новую информацию — значения фаз, — мы должны либо сделать какие-то новые предположения о структуре и особенностях объекта, либо провести новые эксперименты. И вот этот момент — откуда мы пытаемся извлечь новую информацию — нужно всегда четко осознавать. Ниже приведены основные подходы к решению «фазовой проблемы», применяемые в белковой кристаллографии.

Изоморфное замещение

Можно попытаться внедрить в молекулы кристалла некую тяжелую метку, которая представляет собой один или несколько тяжелых

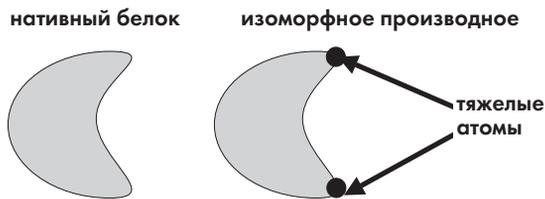


Рисунок 5. Изоморфное замещение белков.

атомов (например, ионы тяжелых металлов), которые могут быть либо добавлены к нативной структуре, либо могут замещать часть ее атомов (рисунок 5). Изоморфные производные должны быть закристаллизованы в той же самой пространственной группе, что и исходная макромолекула. Под изоморфным внедрением тяжелых атомов подразумевается, что они присоединяются к каждому экземпляру молекулы, в одном и том же месте, и структура молекулы белка при этом не изменяется. Затем, проведя дополнительно рентгеновский эксперимент с таким модифицированным соединением и играя на разностях интенсивностей рассеяния нативным белком и изоморфным производным, можно получить дополнительную информацию о значениях фаз. Трудность этого метода заключается в том, что не всегда удастся получить хорошее изоморфное производное, а также в необходимости проведения дополнительного рентгеновского эксперимента.

Метод изоморфного замещения является основным методом решения фазовой проблемы при определении структуры биологических макромолекул. Сам этот метод возник достаточно давно, но именно при работе с белками он приобрел исключительно важную роль. Причин две:

- 1) долгое время он являлся единственным методом, позволяющим решать фазовую проблему для белков;
- 2) именно для белков удается «достаточно просто» получать изоморфные производные. Это связано с тем, что кристаллы белка довольно рыхлые — в них от 30 до 70% объема занято растворителем, т.е. в кристаллах есть «пустоты», куда могут поместиться дополнительные атомы.

Использование эффекта аномального рассеяния

При использовании этого метода длина волны падающего на кристалл луча варьируется вокруг значений, при которых происходит эффект резонанса, или аномальное рассеяние, для нескольких «специальных» атомов, содержащихся в структуре макромолекулы. Если аномально рассеивающих атомов в белке нет, иногда можно попытаться присоединить их химическим путем.

Дифракционные картины измеряют для нескольких значений длины волны падающего луча и на основании анализа разностей интенсивностей рефлексов этих картин оценивают значения фаз. Успех метода аномального рассеяния, как и изоморфного замещения, во многом зависит от возможности экспериментального получения производных с требуемыми свойствами.

Упомянутые два способа отвечают попытке решить фазовую проблему за счет дополнительной информации, получаемой из дополнительных экспериментов. Следующий способ применяют в ситуации, когда нам известна структура близкого (гомологичного) белка.

Метод молекулярного замещения

В биологии распространенной является ситуация, когда существуют ряды объектов, похожих друг на друга, или, как говорят, имеющих структурную гомологию. Такой гомологией могут обладать, например, белки одного типа (например, гемоглобины), выделенные из разных организмов. В этом случае можно надеяться, что фазы структурных факторов, рассчитанные по известной атомной модели гомологичного белка, будут достаточно хорошим начальным приближением к значениям неизвестных фаз, отвечающих исследуемому объекту. Комбинируя их далее с измеренными в эксперименте модулями структурных факторов для исследуемого объекта, мы можем получить хорошее приближение к искомому распределению электронной плотности. Однако, для того, чтобы надеяться на успех на этом пути, надо, как минимум, для начала «разместить» известный гомологичный объект на том же месте и в той же ориентации, что и глобула исследуемого белка. Вот эта процедура создания такого «компьютерного гибрида», в котором внутри элементарной ячейки кристалла одного белка размещается молекула другого, и получила название «метод молекулярного замещения». Судить о том, насколько полученное размещение близко к действительности, можно сравнивая рассчитанные по модели модули структурных факторов с величинами, полученными в эксперименте. Разумеется, такое замещение — всего лишь умозрительная процедура, и никакого химического замещения, конечно, не происходит.

«Прямые» методы

В отличие от предыдущих подходов, эти методы опираются не на дополнительный эксперимент или информацию о структуре гомологичного объекта, а на почти философскую идею об атомности изучаемого объекта. Под «прямыми» методами в кристаллографии понимаются стратегии определения структур, использующие

в качестве стартовой информации только набор интенсивностей рефлексов, полученный в рентгеновском эксперименте. Для определения фаз структурных факторов в них используют вероятностный подход. «Прямые» методы более объективны в том смысле, что они зависят только от применения математических соотношений. Один из двух ученых, получивших в 1985 г. Нобелевскую премию за развитие таких методов, — американский математик Герберт Хауптман. На основе «прямых» методов определяют структуры большинства низкомолекулярных соединений. Эти методы подкупают тем, что они не требуют ни дополнительных экспериментов и, что еще более ограничительно, тонкой биохимической работы по получению изоморфных производных, ни наличия известных гомологичных структур. К сожалению, в имеющемся варианте «прямые» методы неприменимы к структурам белков из-за принципиальных ограничений на число атомов исследуемой структуры. В настоящее время предпринимаются интенсивные попытки разработать аналогичные методы для белков. При этом работа идет как в направлении развития существующих подходов (например, в группе Г. Хауптмана, университет Баффало, штат Нью-Йорк, США), так и в поисках альтернативных подходов (сектор кристаллографии макромолекул в Институте математических проблем биологии, Пущино).

Расчет синтеза Фурье электронной плотности

Если нам известны и модуль, и фаза преобразования Фурье искомой функции $\rho(r)$, то мы можем восстановить $\rho(r)$, рассчитав обратное преобразование Фурье. Это несложная с современной точки зрения вычислительная задача, и этот шаг выделяется потому, что он подводит итог важного периода работ. Мы, наконец, получаем возможность «взглянуть» на интересующий нас объект. И по тому, насколько «четким» получилось изображение, — судить об успешности всех предыдущих этапов работы. А в случае неудачи — повторить всё сначала.

Интерпретация карт распределения электронной плотности

Этот этап заключается в построении приближенной атомной модели по рассчитанным картам распределения электронной плотности. Эта работа требует максимального использования интеллекта человека и осуществляется квалифицированными специалистами. С помощью специальных компьютерных программ, исследователь вручную вписывает атомы белковой структуры в полученную на предыдущем этапе карту электронной плотности (рисунок 6). При

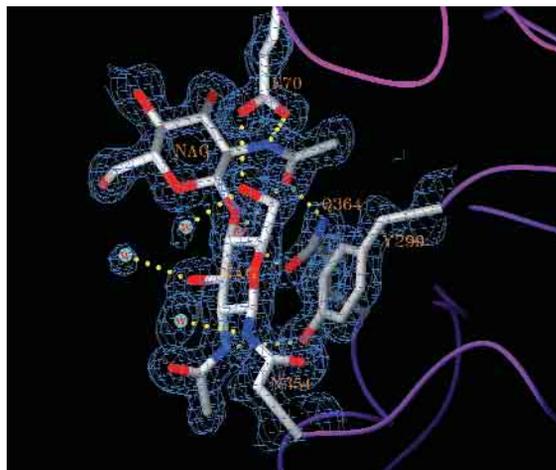


Рисунок 6. Модель, вписанная в карту электронной плотности.

этом необходимо учитывать характеристики связей в исследуемой молекуле (длина, углы) и факторы, влияющие на взаимное расположение аминокислотных радикалов (электростатическое притяжение или отталкивание, гидрофобные взаимодействия, водородные связи и др.). Эта работа выполняется на современных мощных графических системах, поддерживающих стереоизображение. Сложность работы заключается в том, что надо разместить в пространстве тысячи, а то и десятки тысяч атомов, сообразуясь с максимумами на картах функции распределения электронной плотности $\rho(r)$. Работа осложняется тем, что, как правило, карты не имеют атомного разрешения, зато облегчается знанием аминокислотной последовательности исследуемого белка, что позволяет строить модель блоками из известных аминокислот. Это очень ответственный этап, так как ошибки, заложенные на нем, потом бывает очень трудно исправить.

Уточнение структуры

Процедура уточнения — последний этап построения атомной модели исследуемой структуры. Цель этой процедуры — улучшить предварительную атомную модель (созданную на предыдущем этапе) и в результате получить такие координаты атомной модели, для которых рассчитанные модули структурных факторов были бы наиболее близки значениям, полученным в эксперименте. Математически уточнение представляет собой процедуру минимизации некоторой функции, являющейся мерой близости наборов рассчитанных и наблюдаемых модулей структурных факторов. При этом минимизируется функция большого числа переменных (координат атомов). Для решения этой задачи непосредственного участия исследователя не

требуется, все расчеты выполняются с помощью компьютерных программ. Необходимо поместить в программу координаты атомов, полученные на предыдущем этапе в результате ручной подгонки, и набор экспериментальных значений структурных факторов. Затем запускается расчет, который длится от нескольких минут до нескольких часов (в зависимости от сложности структуры и мощности компьютера).

В качестве одного из главных показателей, насколько модель соответствует экспериментальным данным и насколько успешно идет процедура уточнения, широко используют кристаллографический R -фактор:

$$R = \frac{\sum_{\mathbf{h}} |F^{obs}(\mathbf{h}) - F^{calc}(\mathbf{h})|}{\sum_{\mathbf{h}} F^{obs}(\mathbf{h})}$$

где $F^{obs}(\mathbf{h})$ — модули структурных факторов, измеренные в эксперименте, $F^{calc}(\mathbf{h})$ — модули структурных факторов, рассчитанные по координатам модели. Чем меньше R -фактор, тем лучше полученные координаты атомов соответствуют пространственной структуре исследуемой молекулы. Однако, уменьшить R -фактор до нуля не удастся, т.к. измеренные модули структурных факторов $F^{obs}(\mathbf{h})$ содержат экспериментальные ошибки. Обычно у расшифрованных структур R -фактор составляет 0,1–0,15.

Еще одним показателем качества модели является так называемый свободный R -фактор. Его отличие от обычного R -фактора заключается в следующем. До начала процедуры уточнения часть экспериментальных данных (например, 10%) должна быть объявлена контрольным набором, который не используется в процессе уточнения структуры. Если после проведенного уточнения окажется, что и для этих контрольных данных модули структурных факторов, рассчитанные по модели, близки к экспериментальным, то это позволяет с большим доверием относиться к полученной модели, нежели основываясь на степени совпадения с экспериментом тех величин, которые мы стремились к нему подогнать. Поэтому значение свободного R -фактора представляет собой более значимую характеристику, нежели обычный R -фактор.

На практике выполнение двух последних этапов рентгеноструктурного анализа (ручное вписывание координат атомов в карту электронной плотности и уточнение полученной модели) циклически повторяется. При этом в каждом цикле необходимо сравнивать R -факторы, полученные после уточнения модели с R -факторами, полученными для модели в предыдущем цикле. И если значения R -факторов (или одного из них)

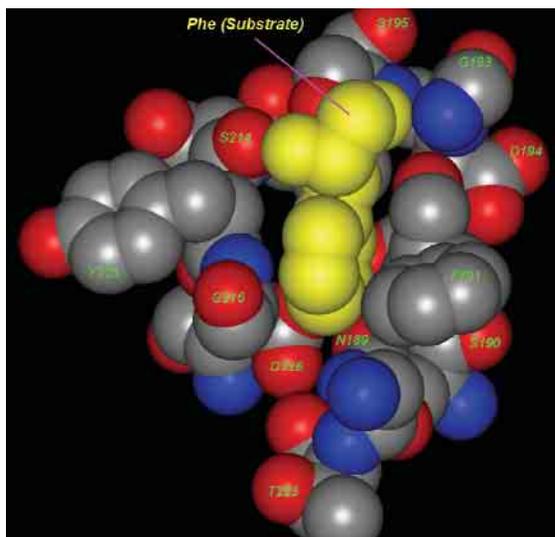


Рисунок 7. Структура фермента дуоденазы с молекулой субстрата.

сильно возросли, это значит, что, скорее всего, в модель были внесены неудачные изменения координат атомов и, следовательно, от этих изменений нужно отказаться и вернуться к модели предыдущего цикла.

Такие циклические повторения ручной правки и уточнения структуры осуществляются до тех пор, пока вносимые изменения улучшают структуру (т.е. улучшается ее соответствие карте электронной плотности, становятся более энергетически выгодным взаимное расположение атомных групп) и уменьшается R -фактор. Обычно на это уходит от нескольких месяцев до года. Если в результате этой работы так и не удастся получить значение R -фактора меньше 0,2, то приходится признать, что получены неудачные экспериментальные данные или допущены ошибки при их обработке. В этом случае остается только попробовать исправить эти ошибки или провести эксперимент заново. Однако такие неудачи случаются достаточно редко, и обычно после всех изложенных выше этапов работы мы получаем атомную структуру объекта, которая до этого была неизвестна. На рисунках 7 и 8 приведены иллюстрации структур, расшифрованных с помощью метода рентгеноструктурного анализа. Таким образом, атомная структура определена, и завершающий этап связан с оформлением полученных результатов в соответствии с определенными стандартами.

Помещение координат в банк белковых структур

Существует специальная база данных, в которой хранятся все расшифрованные на данный момент белковые структуры. Каждой струк-

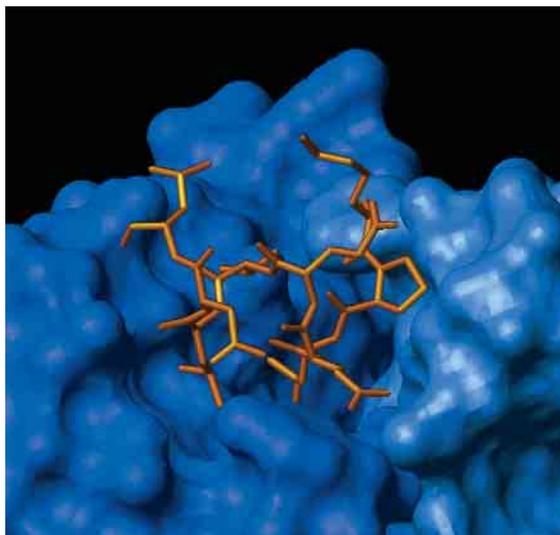


Рисунок 8. Комплекс Fab-фрагмента моноклонального антитела с синтетическим нонапептидом в активном центре.

туре присваивают уникальный идентификационный номер, по которому ее можно быстро найти. Эта база данных носит название Protein Data Bank (банк белковых структур). Она доступна через Internet по адресу <http://www.rcsb.org>. Разумеется, Protein Data Bank постоянно попол-

няется. Чтобы поместить в Protein Data Bank новую расшифрованную структуру, нужно отправить туда не только полученные для нее координаты атомов, но и множество дополнительной информации: параметры кристаллической ячейки; разрешение, при котором проводился эксперимент; полученные для конечной модели значения R-факторов; сведения об авторах, занимавшихся расшифровкой; статьях, в которых опубликованы результаты; и многое другое. Вся эту информация отправляют в Protein Data Bank, там ее анализируют, и если возникают какие-то вопросы, их уточняют по электронной почте. В конечном итоге, структура оказывается в базе данных и становится доступной любому исследователю.

Литература

- Бландел Т., Джонсон Л. 1979. Кристаллография белка. — М.: Мир.
- Кантор Ч., Шиммель П. 1984. Биофизическая химия, Том 2. — М.: Мир.
- Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. 1969. Краткий курс теоретической физики. Книга 1. Механика, Электродинамика. — М.: Наука.

Молекулярные механизмы регуляции экспрессии гена альфа-фетопротеина (АФП)

И. Кустова



Инна Кустова (Поддубная) 13-й выпуск (Кроссастеры), школа № 520 (1991 г.), закончила кафедру вирусологии Биофака МГУ, к.б.н., научный сотрудник в НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина *, inna_kustova@yahoo.com

Альфа-фетопротеин (АФП) — основной белок эмбриональной сыворотки крови млекопитающих. Сразу после рождения его синтез почти полностью прекращается и АФП замещается родственным ему белком и функциональным аналогом — сывороточным альбумином (СА). АФП вновь появляется в сыворотке при возникновении опухолей печени и тератобластом, а также при механических или химических повреждениях печени, вызывающих регенерацию.

Последние несколько десятилетий АФП используют в клинической онкологии для дифференциальной диагностики гепатоклеточной карциномы (ГКК), гепатобластом (ГБ) и тератоканцином (ТК). Эти виды рака, особенно ГКК, широко распространены в человеческой популяции. Кроме этого, повышенный уровень АФП в амниотической жидкости и сыворотке крови беременных женщин является признаком врожденной невропатии или дефектов развития мозга. Практикуется также систематическое обследование на АФП пациентов, относящихся к группе риска по ГКК, — больных циррозом печени и хронических носителей вирусов гепатита В и С.

В свете изложенных выше фактов изучение молекулярных и клеточных механизмов, опреде-

ляющих регуляцию синтеза онко-эмбрионального маркера АФП, представляется важной проблемой современной биологии.

Структура и функции АФП

Впервые этот белок был обнаружен в 1957 г. в человеческой сыворотке новорожденных (Bergstrand, Czar, 1957). В нормальной сыворотке взрослых людей этого белка не оказалось.

В 1960 г. Г.И. Абелевым и сотрудниками в мышинной гепатоме был обнаружен α -глобулин, отсутствующий в печени, крови и других тканях взрослых нормальных мышей. Оказалось, что этот белок является одним из основных компонентов мышинной эмбриональной сыворотки и, кроме того, выявляется во взрослой печени во время регенерации (Абелев и др., 1963). Позже эмбрио-специфический α -глобулин был обнаружен в сыворотке больных с ГКК (Татаринов, 1965) и ТК (Abelev *et al.*, 1967). В последующие годы стало ясно, что этот белок, получивший название АФП, является важным маркером для диагностики опухолей.

АФП представляет собой полипептидную цепь из 600 аминокислот с молекулярным весом около 69 кДа. АФП характерен для всех млекопитающих, его аналоги были описаны также у птиц, рептилий, амфибий и акул. По физико-химическим свойствам и структуре АФП очень близок СА.

Основное свойство АФП — высокое сродство к ненасыщенным жирным кислотам. АФП способен связывать полиненасыщенные жирные кислоты на 5 порядков эффективнее, чем СА. Поскольку синтез ненасыщенных жирных кислот в эмбрионе не происходит, видимо, основная функция АФП в эмбриональный период заключается в транспорте этих веществ через плаценту. Во многих эмбриональных тканях были обнаружены рецепторы к АФП, которые, возможно, участвуют в транспорте ненасыщенных жирных кислот внутрь клетки. Есть данные, что АФП способен также связывать и транспортировать такие вещества, как биллиру-

*В настоящее время Инна с семьей находится в загранкомандировке и работает учителем химии и биологии в школе при Посольстве РФ.

бин, стероиды, флавоноиды, диоксин, тяжелые металлы и различные лекарства.

В отличие от СА, АФП крыс и мышей способен связывать эстрогены. Возможно, циркулирующий или локализованный на поверхности клеток АФП может нейтрализовать эстрогены матери в развивающемся плоде.

Структура гена АФП

В геноме млекопитающих содержится единственная копия гена АФП. Ген АФП входит в семейство альбуминовых генов наряду с генами СА, витамин D-связывающим белком (ДСБ) и геном α -альбумина (α -АЛБ), который в геноме человека называют афамином. Эти белки и их гены обладают значительной степенью сходства первичной структуры (Belanger *et al.*, 1994).

Все гены этого семейства расположены на одной хромосоме. Для генома человека это длинное плечо 4-й хромосомы, у мышей эти гены локализованы на 5-й хромосоме, в геноме крыс — на 14-й хромосоме (рисунок 1).

Ген АФП крысы имеет размер 19 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов).

Данные о близком расположении и эволюции генов семейства альбумина, динамика их синтеза в онтогенезе и канцерогенезе, а также структура их регуляторных районов, которая будет рассмотрена ниже, позволяют предположить, что экспрессия этих генов взаимосвязана и имеет общие принципы регуляции.

Синтез АФП в норме и при патологии

АФП составляет около 50% общего количества белка в эмбриональной сыворотке млекопитающих. Структуры, продуцирующие АФП в эмбриогенезе, висцеральная энтодерма желточного мешка и печень, непосредственно участвуют в процессах органогенеза и эмбрионального кроветворения.

Висцеральная энтодерма желточного мешка

Висцеральная энтодерма желточного мешка — одна из первых структур, появляющихся при дифференцировке тканей. На ранних стадиях эмбриогенеза, когда эмбриональная печень еще не сформировалась, состав сывороточных белков определяется активностью именно этой ткани. Впервые АФП выявляется здесь на 6–7-е сутки развития мышинового эмбриона. В процессе развития состав сыворотки изменяется, и к моменту рождения уровень СА начинает преобладать над уровнем АФП.

Уже на ранней стадии развития синтез АФП зависит от межклеточных взаимодействий и взаимодействий клеток с внеклеточным матриксом. Так, при контакте висцеральной энтодермы *in vivo* и *in vitro* с внезародышевой эктодермой синтез АФП обратимо блокируется.

Висцеральная энтодерма желточного мешка дает начало клеткам первичной кишки, в которых уровень синтеза АФП и экспрессия его мРНК снижается примерно в 100 раз.

Эмбриональная печень

Формирование зачатка печени происходит путем вытягивания головного участка первичной кишки. Эмбриональная печень представляет собой плотное скопление эпителиальных и кроветворных клеток. В это время во всех гепатоцитарных клетках органа, гепатобластах, происходит синтез АФП наряду с СА и другими белками. В клетках эмбриональной печени уровень синтеза АФП по сравнению с висцеральной энтодермой значительно повышен.

Дифференцировка печени — процесс сложный и многостадийный. На ранних стадиях клетки-предшественники могут дифференцироваться как в гепатоциты, так и в холангиоциты (клетки желчных протоков). Далее линии дифференцировки расходятся и закладываются печеночные балки и желчные протоки. Гепатобласты продолжают синтезировать АФП и другие белки сыворотки, специфичные для печени, тогда как клетки желчных протоков теряют эту

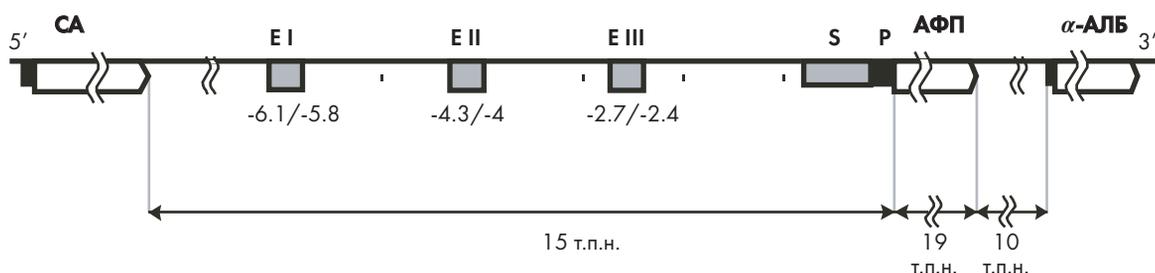


Рисунок 1. Структура регуляторного района гена АФП. Тандемное расположение генов семейства альбумина.

АФП — альфа-фетопроtein, СА — сывороточный альбумин, α -АЛБ — альфа-альбумин (афамин); P — промотор; S — репрессор (сайленсер); EI — EIII — энхансеры гена АФП.

способность. С 14,5 недели развития уровень синтеза АФП в клетках эмбриональной печени человека начинает снижаться.

Постэмбриональная печень

Незадолго до рождения и сразу после него у крыс и мышей одновременно с морфологической перестройкой печени происходит быстрое падение уровня АФП в крови и сокращение числа АФП-продуцирующих клеток. Вскоре после рождения концентрация АФП в крови снижается на пять порядков.

АФП-продуцирующие клетки исчезают в первую очередь вокруг портальных трактов и в последнюю — около центральных вен. Таким образом, пространственная динамика исчезновения АФП-продуцирующих клеток совпадает с направлением формирования балок — от аорты к центральной вене. Наряду с этим, в крови повышается уровень СА — т.е. происходит замещение эмбрионального сывороточного белка на взрослый (Belanger *et al.*, 1983).

Экспрессия генов α -АЛБ и ДСБ начинается сразу после рождения (Belanger *et al.*, 1994). Возможно, экспрессия генов, расположенных в одном локусе, координируется общими регуляторными элементами, расположенными в межгенном пространстве.

Взрослая печень

Во взрослой печени ген АФП обратимо подавлен (супрессирован). Синтез АФП может возобновляться при регенерации печени. Моделями для изучения процесса регенерации являются частичная гепатэктомия — хирургическое удаление 2/3 органа, или отравление CCl_4 , вызывающее некроз гепатоцитов, расположенных вокруг центральных вен. Одновременно с увеличением синтеза АФП происходит падение синтеза СА. Наиболее сильно этот эффект выражен у мышей. Клетки, синтезирующие АФП при отравлении парами CCl_4 , локализованы в зоне вокруг некроза; в случае частичной гепатэктомии клетки располагаются хаотично.

Таким образом, наблюдается зависимость между появлением АФП и нарушением структуры взрослой печени. Определяющим фактором, регулирующим активность синтеза АФП на клеточном уровне, является положение гепатоцита в печеночной балке или вне ее (Abelev, 1978).

Синтез АФП в опухолях

Повышение уровня АФП в крови наблюдается при первичных опухолях печени — ГКК, ТК, реже — при опухолях кишечника, а также в случае циррозов и при вирусных гепатитах. В эмбриональных карциномах, ТК, ГКК, опухолях

желточного мешка и ГБ человека повышение уровня АФП наблюдается в 80–90% случаев и является важным диагностическим признаком.

Опухолевые клетки различаются по степени трансформации. Известно, что в опухолях с высоким уровнем синтеза АФП клетки имеют морфологию, характерную для раннего постэмбрионального периода. Клетки опухолей с низким уровнем синтеза АФП высокодифференцированы, и распределение белков-маркеров в них характерно для взрослой ткани.

Синтез АФП *in vitro*

В клеточной и молекулярной биологии широко используются первичные культуры клеток. Такие клетки выделяют непосредственно из организма донора и пересаживают в питательную среду. В культуре клетки, как правило, теряют дифференцировку и делятся чаще, чем *in vivo*. Когда такая культура достигает до монослоя, требуется ее субкультивирование на другую культуральную чашку с питательной средой. Первичные культуры не способны длительное время существовать *in vitro* и после нескольких пассажей (пересевов) гибнут. Кроме этого, с каждым новым пересевом клетки теряют свою специфичность, т.е. становятся все менее похожи на исходную ткань. Другой тип клеточных культур может стабильно существовать *in vitro* неограниченное время. Это перевиваемые культуры. Такими являются, например, культуры опухолевых клеток.

В первичных культурах гепатоцитов одновременно с утратой полярности, нарушением межклеточных взаимодействий и взаимодействий типа клетка-матрикс, наблюдается дедифференцировка клеток, они перестают синтезироваться печень-специфические белки. В первичных культурах и большинстве гепатом возобновляется синтез эмбрионального белка АФП. В первичной культуре гепатоцитов взрослых мышей АФП появляется на 3–4-й день. Одновременно с накоплением АФП происходит падение синтеза СА.

Синтез АФП в перевиваемых культурах гепатоцитов зависит от плотности клеток в монослое. АФП-положительные клетки образуют четкое кольцо вокруг АФП-отрицательных клеток, расположенных в центре. Существует зависимость между формированием межклеточных контактов в монослойных культурах и подавлением синтеза АФП. Первичные гепатоциты, растущие в трехмерном геле, сохраняют поляризацию и балочную структуру. В таких культурах синтез АФП не возобновляется.

Морфологические изменения, обнаруженные *in vitro* при возобновлении синтеза АФП,

сходны с наблюдаемыми *in vivo* при некрозах печени: перераспределение актина, исчезновение белков, характерных для балочной структуры печени, потеря белков межклеточных контактов — коннексинов.

Таким образом, на основании изучения регуляции синтеза АФП на клеточном уровне можно сделать следующие выводы:

— подавление синтеза АФП во взрослых гепатоцитах обратимо;

— взаимодействия типа клетка-клетка и клетка-внеклеточный матрикс являются важным фактором и могут участвовать в подавлении синтеза АФП во взрослых гепатоцитах как *in vivo*, так и *in vitro* (Abelev, 1993).

Механизмы регуляции экспрессии гена АФП

Регуляция экспрессии любого гена может осуществляться на нескольких уровнях. Выше были описаны некоторые аспекты влияния клеточного микроокружения на экспрессию гена АФП. Наибольший интерес вызывают молекулярные механизмы регуляции экспрессии.

Основные события регуляции экспрессии гена АФП происходят на транскрипционном уровне. Однако есть данные о том, что регуляция экспрессии АФП мышей может осуществляться и на посттранскрипционном уровне.

Одним из возможных механизмов регуляции экспрессии генов является метилирование ДНК (присоединение метильных групп к азотистым основаниям). Метилироваться может сам ген, тогда транскрипция блокируется. Большое значение имеет метилирование промоторных районов генов, влияющее на связывание с транскрипционными факторами и, следовательно, на транскрипцию. Для гена АФП было установлено, что метилирование не является механизмом регуляции экспрессии АФП, но отражает состояние активности гена и может стабилизировать его неактивное состояние.

Структура регуляторного района гена АФП.

Цис-элементы

Большинство генов эукариот имеют регуляторные последовательности на 5'-конце. Они могут усиливать или ослаблять экспрессию гена. Такие последовательности называют *цис*-элементами, к ним относятся промоторы, репрессорные элементы и энхансеры. Для гена АФП такие элементы идентифицированы в районе от -7.6 т.п.н. до точки начала транскрипции (Widen, Papaconstantinou, 1986). Регуляторными районами гена АФП мыши, крысы

и человека очень сходны между собой. Регуляторный район гена АФП включает в себя промотор, репрессор и три энхансера.

Промотор

Промотор гена АФП расположен в районе $-200/+1$ н.п. относительно точки начала транскрипции. Промотор содержит последовательности (сайты), узнаваемые транскрипционными факторами, которые будут описаны ниже.

Энхансерные элементы

У мышей и крыс локализовано три независимых тканеспецифических энхансера, способных активировать промотор АФП — EI, EII и EIII (рисунок 1). Активность каждого энхансера определяют небольшие последовательности размером 200–300 п.н., которые содержат множественные перекрывающиеся сайты связывания транскрипционных факторов.

Сравнение энхансеров гена АФП показали, что все три энхансера активны, но в разной степени в тканях, обычно экспрессирующих АФП, а также во взрослой печени и кишке, где экспрессии АФП не наблюдается.

В регуляторной области гена АФП человека было обнаружено два энхансерных элемента.

Известно, что энхансеры АФП способны активировать промотор гена СА. Возможно, регуляция промоторов родственных генов СА и АФП общими межгенными энхансерами осуществляется на определенных стадиях развития и в гепатомах, если неактивен собственный энхансер СА. При этом между промоторами родственных генов не происходит конкуренции, т.е. каждый из промоторов двух генов не ограничивает экспрессии другого гена.

Однако ни промотор, ни энхансеры не достаточны для подавления экспрессии гена АФП в постэмбриональный период.

Репрессор

У всех изучаемых видов в регуляторном районе гена АФП обнаружены элементы, подавляющие транскрипцию гена, — репрессоры. Роль этих элементов в регуляции экспрессии гена АФП, по всей видимости, очень важна, поскольку активность энхансеров в постэмбриональный период сохраняется, а уровень экспрессии гена падает. В регуляторном районе гена АФП человека были описаны две репрессорные последовательности, локализованные между энхансером и промотором гена АФП. Они подавляют инициацию транскрипции гена АФП, ослабляя действие энхансеров. В регуляторных районах АФП крыс и мышей репрессоры расположены также рядом с промотором. Вероятно, существуют белки, способные связываться с этими регуляторными элементами. Однако, к настоящему времени такие белки не обнаружены.

Таким образом, структура регуляторного района гена АФП у изучаемых видов сходна. Он содержит промотор, три энхансера и репрессор, которые узнаются транскрипционными факторами, специфическими для печени или общими для многих тканей. Так что же является определяющим для характера экспрессии гена АФП на транскрипционном уровне? Общий эффект действия промотора и энхансеров регуляторного района на экспрессию гена зависит от комбинации транскрипционных факторов, представленных в ядре клетки на определенной стадии развития организма. Рассмотрим далее транскрипционные факторы, распространенные в печени и оказывающие наиболее сильное влияние на экспрессию белков, специфических для этого органа.

Транскрипционные факторы, определяющие экспрессию печень-специфических генов

Специфические свойства отдельных тканей живого организма формируются в результате экспрессии определенного спектра генов в клетках этих тканей. Каждый тип клеток синтезирует специфические для данной ткани белки, имеет определенную скорость роста, реагирует на внеклеточные сигналы. На экспрессию генов оказывает влияние множество факторов транскрипции, часть из которых являются общими для всех типов клеток, а часть — тканеспецифичными, специализированными для конкретного типа ткани. Транскрипционные факторы (*транс*-факторы) связываются с *цис*-элементами на ДНК, образуя энхансесому — регуляторный модуль, от которого зависит экспрессия гена. Механизмы действия такого модуля полностью не выяснены, однако понятно, что его активность определяется двумя параметрами. Во-первых, это наличие на ДНК сайтов (участков) связывания с *транс*-факторами. С одним и тем же сайтом на молекуле ДНК могут связываться белки разных семейств, которые оказывают на транскрипцию генов различные эффекты. Связываясь с *цис*-элементом, каждый белок вносит свой вклад в изменение программы экспрессии гена. Такая динамичная регуляция *транс*-факторами модулирует фенотип клетки в соответствии с сигналами клеточного роста, гомеостаза, суточных ритмов, тканевыми повреждениями. Второй параметр регуляции отражает стадию развития. Транскрипционные факторы появляются в онтогенезе последовательно, что ведет к такой же постепенной и последовательной активации генов и, в итоге, к формированию взрослого фенотипа (Locker, 2001).

Поскольку именно в печени происходит синтез многих важных функциональных белков,

регуляция экспрессии которых изучалась давно и активно, печень-специфические *транс*-факторы и регуляторные модули, которые они образуют, были описаны наиболее подробно. Наиболее важными регуляторами экспрессии печень-специфических белков оказались гепатоцитарные ядерные факторы — ГЯФ (HNF), к которым относят 5 семейств — HNF1, HNF3, HNF4, HNF6 и C/EBP. Белки этих семейств начинают синтезироваться на ранних стадиях эмбрионального развития и продолжают экспрессироваться во взрослом организме. Эти факторы обнаруживаются не только в клетках печени, но именно в этом органе синтезируются их наибольшие количества. Сайты связывания ГЯФ находятся в регуляторных районах большинства известных гепатоспецифических генов.

При исследовании роли *транс*-факторов, участвующих в дифференцировке, успешно используют метод создания трансгенных мышей с нокаутными генами. У таких мышей в геноме отсутствует изучаемый ген. Эффект, к которому приводит такой нокаут, позволяет сделать выводы о значении исследуемого белка в онтогенезе. Были получены трансгенные мыши с нокаутами практически всех ГЯФ. Благодаря этой методике в последнее время достигнут значительный прогресс в понимании механизмов, определяющих и поддерживающих дифференцировку печени.

Все результаты нокаутов ГЯФ можно условно разбить на две группы: 1) последствия критичны для формирования эмбриона, животные гибнут на различных стадиях эмбрионального развития; 2) последствия мало критичны для внутриутробного развития, трансгенные животные чаще всего рождаются, в постнатальном периоде страдают от нарушения функций внутренних органов, но все-таки некоторое время жизнеспособны. Такие разные результаты могут касаться одного и того же гена, инактивированного (выключенного) на разных стадиях развития организма. По всей видимости, переломный момент — это формирование собственно зародышевой части эмбриона. Было показано, что экспрессия факторов HNF1 β , HNF3 β и HNF4 α совершенно необходима для раннего эмбрионального развития, а экспрессия остальных ГЯФ важна для правильного функционирования печени.

Взаимная регуляция ГЯФ

Если до момента формирования зародыша (примерно 7-й день развития) из ГЯФ экспрессируются только HNF1 β , HNF3 β и HNF4 α , то позже к ним добавляются HNF1 α , HNF3 α и γ , HNF6 и факторы семейства C/EBP. Таким обра-

зом, простейшая регуляторная схема дополняется следующими степенями сложности и надежности. На рисунке 2 приведена обобщенная схема возможной иерархии печень-специфических транскрипционных факторов.

На этой схеме можно увидеть, что действие гепатоцитарных ядерных факторов образует сложную регуляторную сеть. Сигналы, активирующие экспрессию специфических белков и образующие таким образом гепатоцитарный фенотип, передаются многими путями. При отсутствии одного компонента его действие может компенсироваться другими. Необходимо отметить роль белка HNF4 α . Если рассматривать действие ГЯФ как информацию, то можно сказать, что очень многие информационные потоки проходят через HNF4 α .

Итак, ГЯФ влияют на экспрессию множества генов, определяя тем самым многие метаболические процессы. Не только удаление целого гена, кодирующего один из этих белков, но и точечные мутации в этих генах приводят к значительным нарушениям. Мутации генов HNF4 и HNF1 являются причиной развития различных форм неинсулинозависимого диабета молодых людей — MODY1, MODY3, MODY5 соответственно. Это заболевание связано с нарушением функции β -клеток поджелудочной железы, в которых основными тканеспецифическими факторами являются также ГЯФ. Система взаимодействия ГЯФ в поджелудочной железе несколько отличается от взаимодействия транс-

крипционных факторов, известного для печени. Вероятно, эти различия являются одной из причин, определяющих тканевые особенности этих органов.

Интересные результаты можно получить, изменяя набор транскрипционных факторов в клетках. Так, обработка культуры клеток поджелудочной железы дексаметазоном (аналогом глюкокортикоидных гормонов; глюкокортикоидные гормоны также участвуют в регуляции экспрессии генов) приводит к транс-дифференцировке этой линии в гепатоциты (Shen et al, 2000). После трех дней обработки дексаметазоном в клетках выявляется экспрессия ГЯФ — C/EBP β одновременно с падением синтеза амилазы. На 5-й день в таких клетках не выявляется амилаза — основной белок-маркер клеток поджелудочной железы и начинается экспрессия сначала ранних печень-специфических генов, потом генов-маркеров дифференцированных гепатоцитов. Через 3 недели во всех клетках наблюдается синтез СА. Аналогичный эффект транс-дифференцировки достигается в этих клетках и без обработки дексаметазоном, при трансфекции их плазмидным вектором, несущим ген C/EBP β (Shen et al., 2000). Таким образом, можно предположить, что фактор C/EBP β — один из ключевых факторов, определяющих тканевую специфичность гепатоцитов.

Известно, что на экспрессию гена АФП помимо гепатоцитарных ядерных факторов (ГЯФ) оказывают влияние и некоторые другие *транс-*

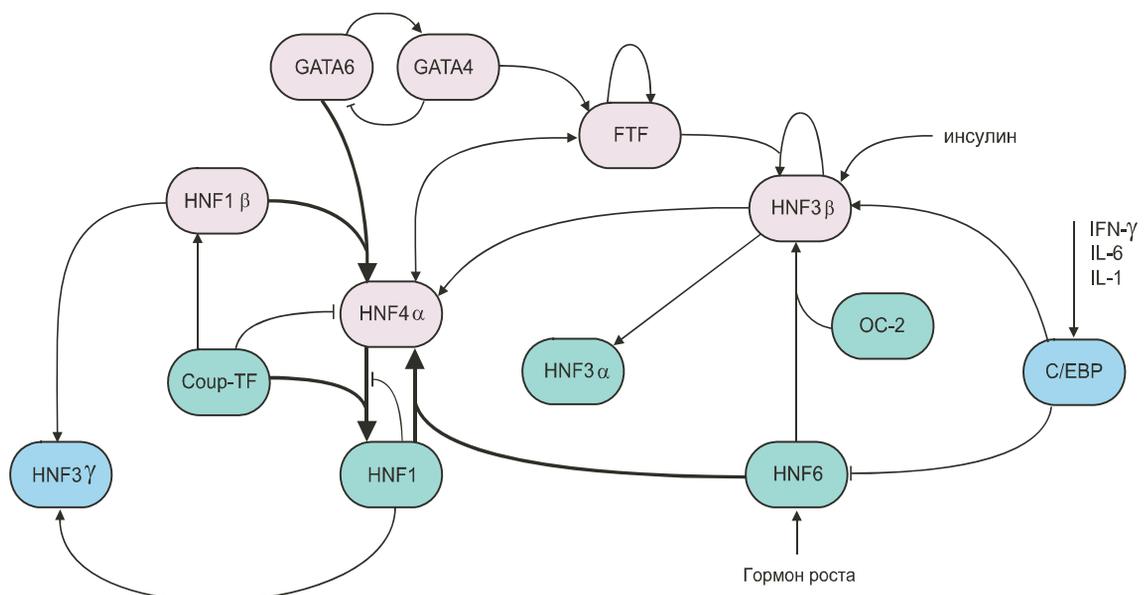


Рисунок 2. Возможная схема взаимной регуляции гепатоспецифических ядерных факторов.

Розовым цветом отмечены факторы, экспрессия которых начинается в раннем онтогенезе (4, 5–7-й дни развития); зеленым — ГЯФ, появляющиеся на 7–10-й день развития; синим — ГЯФ, экспрессия которых выявляется после 10-го дня развития мышиного эмбриона.

факторы, также участвующие в дифференцировке тканей и регулирующие основные жизненные функции клеток: рост, деление, апоптоз.

Например, к таким факторам относятся белок pкx-2.8 — специфический активатор гена АФП. Этот белок обнаруживается только в клетках, экспрессирующих АФП.

Промотор гена АФП также несет сайты, узнаваемые ядерными рецепторами. Ядерные рецепторы — это большое семейство нетканеспецифических *транс*-факторов, которые участвуют в регуляции экспрессии генов, связываясь с небольшими молекулами — лигандами. Лигандами ядерных рецепторов часто являются гормоны. К этим факторам относятся рецепторы стероидных гормонов (глюкокортикоидов (ГКГ) и эстрогенов), рецепторы к тиреоидным гормонам и ретиноевой кислоте (РК) и многие другие. Эффект воздействия ядерных рецепторов на регуляцию экспрессии генов-мишеней может быть различным. Ядерные рецепторы в комплексе с лигандом в виде гомо- или гетеродимеров узнают сайт связывания на молекуле ДНК и активируют экспрессию генов. Некоторые гетеродимеры, связываясь с ДНК в отсутствие лиганда, способны подавлять экспрессию. Ядерные рецепторы могут усиливать или ослаблять экспрессию генов путем образования белок-белковых взаимодействий с другими *транс*-факторами (Glass, Rosenfeld, 2000).

Ретиноевая кислота (РК) является мощным регулятором процессов клеточного деления и дифференцировки. Ткани энтодермального происхождения, такие как печень и почки, имеют рецепторы к РК. РК вызывает дифференцировку клеток мышинной тератокарциномы (эмбриональная опухоль) в висцеральную энтодерму, при этом наблюдается активация экспрессии АФП. В клетках гепатом крысы РК также активирует экспрессию гена АФП. В клетках гепатом человека, напротив, наблюдается подавление экспрессии генов АФП и СА под воздействием РК.

Последовательность нуклеотидов в промоторе гена АФП, узнаваемая ядерными рецепторами, частично перекрывается с сайтом, связывающим онкобелки Jun и Fos, которые тоже могут оказывать влияние на экспрессию АФП.

На различных клеточных линиях было показано, что онкобелки Jun и Fos активируют промотор АФП. С другой стороны, комплекс глюкокортикоидного гормона и рецептора (ГРК) активирует промотор гена АФП, в отсутствие белков Jun и Fos. Однако совместная экспрессия этих факторов приводит к подавлению активности промотора АФП.

Таким образом, в области сайтов, связывающих ядерные рецепторы и онкобелки, между

онкобелками Jun/Fos и ГРК происходит белок-белковое взаимодействие. В результате этого, ядерный рецептор не может связаться с ДНК и не происходит активации промотора.

Регуляторный район гена АФП в области репрессора содержит сайт связывания с белком р53. р53 — полифункциональный белок, активация которого происходит в ответ на различные стрессовые ситуации. Основную функцию р53 выполняет как фактор транскрипции. Белок р53 способен оказывать комплексное воздействие на транскрипцию генов, активируя экспрессию одних и подавляя другие. Транскрипционными мишенями р53 являются гены, активация которых ведет к остановке клеточного цикла, гены, участвующие в р53-зависимом апоптозе, а также множество генов с невыясненными функциями. Другими функциями р53 являются репрессия транскрипции, подавление трансляции некоторых мРНК, и участие в репарационных процессах (Чумаков, 2000).

Вероятно, р53 подавляет активацию промотора, конкурируя за связывание с сайтом ДНК с другими *транс*-факторами. Активность промотора восстанавливается в присутствии белка НВх вируса гепатита В. Вирусный белок взаимодействует с р53, в результате чего ген АФП может быть активирован. АФП часто экспрессируется в клетках инфицированных вирусом гепатита В. Возможно, этот механизм активации экспрессии АФП является первым шагом в трансформации (перерождение нормальных клеток в опухолевые) нормальных гепатоцитов в ГКК.

По-видимому, репрессия гена АФП белком р53 имеет место на некоторых этапах развития, однако этот механизм не является универсальным, поскольку в первичной культуре мышинных гепатоцитов возобновление экспрессии АФП не связано с изменением активности р53. Нокаут гена р53 не приводит к существенным изменениям в экспрессии АФП.

Возможная модель регуляции экспрессии гена АФП

Современные представления о механизмах регуляции экспрессии генов основываются на некоторых общих положениях, утверждающих:

— каждый тип клеток на определенной стадии развития содержит определенный набор факторов транскрипции, экспрессия которых строго регулируется;

— факторы могут конкурировать друг с другом за сайты связывания с ДНК;

— за счет белок-белковых взаимодействий транскрипционные факторы могут образовывать комплексы. Это изменяет их транс-активационные свойства.

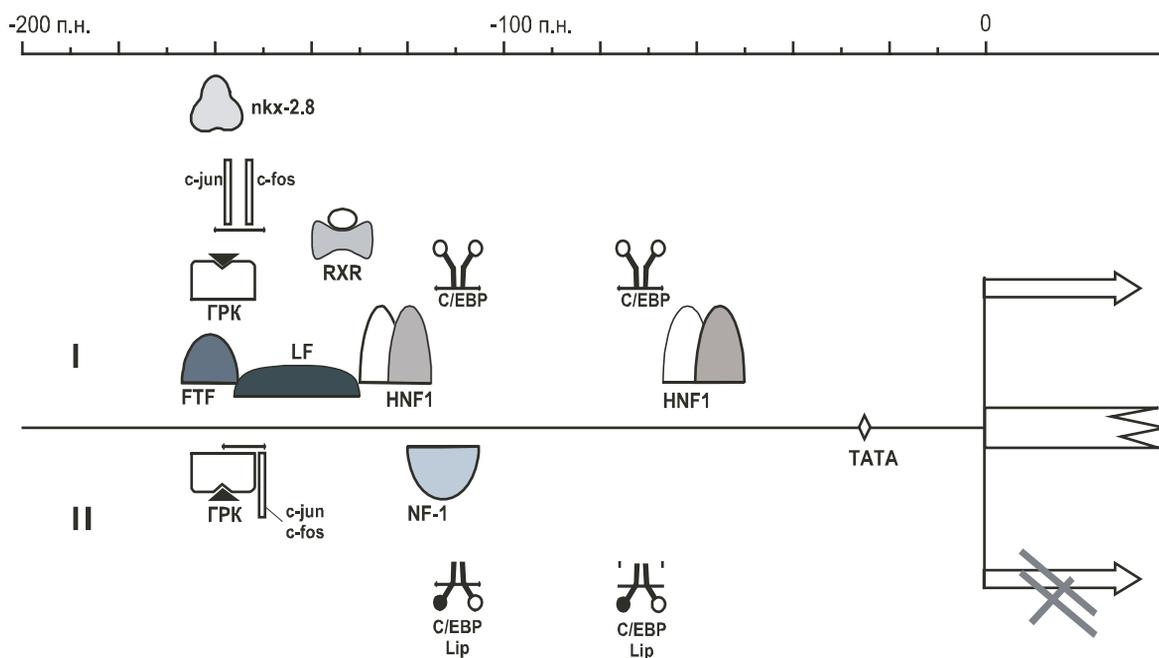


Рисунок 3. Модель регуляции активности промотора гена АФП (Bernier *et al.*, 1993): I — активация промотора; II — супрессия промотора.

Таким образом, регуляторный эффект, который фактор оказывает на транскрипцию, зависит от общего набора *транс*-факторов в клетке в данный момент развития и их влияния друг на друга.

Как можно заметить, наиболее изученными являются *транс*-факторы, активирующие промотор гена АФП. Существование и влияние репрессорных факторов экспериментально определить сложнее, в связи с чем о них практически ничего не известно.

В 1993 г. Bernier и соавторами была предложена модель регуляции экспрессии гена АФП, которая на данный момент является общепринятой. В этой гипотезе основная роль в активации промотора АФП отводится комплексу транскрипционных факторов HNF1/FTF, сайты связывания которых расположены в промоторе АФП (рисунок 3; Bernier *et al.*, 1993).

Комплекс HNF1/FTF может конкурировать за перекрывающиеся сайты связывания с факторами, репрессирующими промотор, — ГПК или NF-1.

NF-1 — тканеспецифичный транскрипционный фактор. В низких концентрациях NF-1 слабо стимулирует промотор АФП, а в высоких — подавляет его активность. Согласно гипотезе Bernier, активность промотора зависит от количественного соотношения факторов HNF1 и NF-1.

Другие *транс*-факторы влияют на экспрессию АФП в зависимости от присутствия других

транс-факторов в клетке. Между этими белками происходит конкуренция за связывание с ДНК или белок-белковые взаимодействия, что может приводить к подавлению активности промотора (рисунок 3).

Наряду с HNF1 главным претендентом на роль основного активатора гена АФП является белок nkx-2.8, который обнаруживается только в тканях, синтезирующих АФП.

По-видимому, данная модель регуляции не объясняет высокую специфичность репрессии гена АФП после рождения. Единственным известным фактором, однозначно подавляющим активность промотора АФП, является NF-1. Однако, он не специфичен для печени, и маловероятно, что это — единственный репрессор, осуществляющий переключение активности промотора гена АФП. Это касается и белка p53. Вероятно, репрессия АФП белком p53 является частью общего механизма, подавляющего экспрессию тканеспецифических генов в опухолевых клетках.

Недостаточно полно изучена и роль репрессора гена АФП. По литературным данным известен район гена АФП, связывание которого с репрессором определяет полное подавление АФП экспрессии после рождения. Мы полагаем, что подавление активности промотора АФП осуществляется негативным печень-специфическим транскрипционным фактором, экспрессия которого наблюдается в клетках, не синтезирующих АФП.

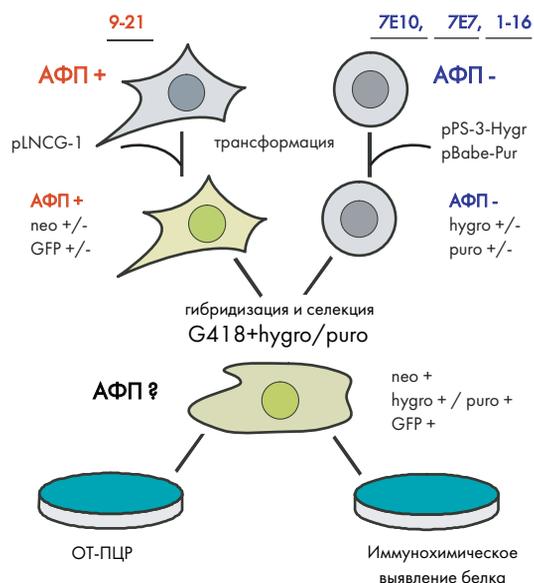


Рисунок 4. Схема соматической гибридизации.

Изучение механизмов негативной регуляции экспрессии гена АФП путем создания соматических гибридов

Одним из методов, позволяющих подойти к проблеме изучения механизмов подавления экспрессии генов, является создание соматических гибридов, которых получают слиянием эукариотических клеток с различными фенотипами. Этот метод был разработан в 1960-х гг. и в то время был одним из немногих, позволявших изучать закономерности экспрессии тканеспецифических генов (Sorieu, Ephrussi, 1961; Gershon, Sachs, 1963). При слиянии клеток, различающихся по какому-либо фенотипическому признаку, происходит объединение ядер и соответственно геномов этих клеток. В то же время объединяются и наборы транскрипционных факторов, которые присутствуют в исходных клеточных линиях. Изучая фенотип, наследуемый гибридами, можно предполагать, какой механизм регуляции экспрессии преобладает в данной системе.

В случае, когда в гибридных клетках продолжается экспрессия изучаемого гена, вероятнее позитивная регуляция экспрессии. При исчезновении в соматических гибридах признака, по которому различаются исходные линии клеток, можно считать, что в системе преобладает негативная регуляция, т.е. в исходных клетках, не продуцирующих исследуемый белок, существует механизм, подавляющий его экспрессию. В дальнейшем, используя другие методы молекулярной биологии, можно описать данный механизм.

Клеточные линии—предшественники соматических гибридов различаются в зависимости от целей эксперимента. Слияния могут быть межвидовыми или проводиться между клетками разных типов тканей; получают гибриды опухолевых и нормальных клеток или опухолевых линий клеток, различающихся способностью к метастазированию, степенью дифференцировки или экспрессией изучаемых генов.

Мы использовали метод соматической гибридизации для анализа механизмов регуляции экспрессии гена АФП. В качестве модели нами была выбрана коллекция клонов крысиной гепатомы, различающихся по уровню синтеза АФП примерно в 1000 раз (Эрайзер, Абелев, 1984). Мы использовали наиболее стабильные клоны, устойчиво сохраняющие АФП-фенотип в ряду поколений. Схема эксперимента представлена на рисунке 4. В результате слияния было получено шесть соматических гибридов. Три из них образованы АФП⁺- и АФП⁻- клонами.

Полученные гибридные клетки использовали для иммунохимического анализа и обратной транскрипции-ПЦР (ОТ-ПЦР) анализа.

Иммуногистохимическое окрашивание антителами к белку АФП показало, что во всех гибридных культурах АФП не синтезируется. Важно отметить, что в АФП⁺ × АФП⁻ гибридных клонах выявляется флуоресцирующий белок GFP, которым был маркирован АФП⁺-клон. Это является доказательством того, что полученные гибриды содержат ДНК из АФП⁺-клонов (рисунок 5).

Результаты, полученные иммуногистохимическим анализом, подтверждаются и при исследовании экспрессии мРНК АФП в гибридных клетках методом ОТ-ПЦР. Этот метод с большой чувствительностью позволяет определить наличие мРНК исследуемых генов. При этом мРНК *транс*-факторов представлены в ядрах в очень низких концентрациях и другими методами выявляются плохо. Реакция ОТ-ПЦР происходит в два этапа: 1) обратная транскрипция — с помощью вирусного фермента обратной транскриптазы с мРНК определенного гена синтезируется соответствующая ДНК; 2) полимеразная цепная реакция — происходит копирование вновь синтезированной ДНК. При проведении ПЦР используют меченые нуклеотиды, что помогает выявлению ДНК в ходе последующего электрофореза.

Было показано, что мРНК АФП обнаруживается только в АФП⁺-клоне и не выявляется в АФП⁻-клонах и во всех соматических гибридах. То есть результаты наших исследований говорят о том, что соматические гибриды имеют АФП⁻

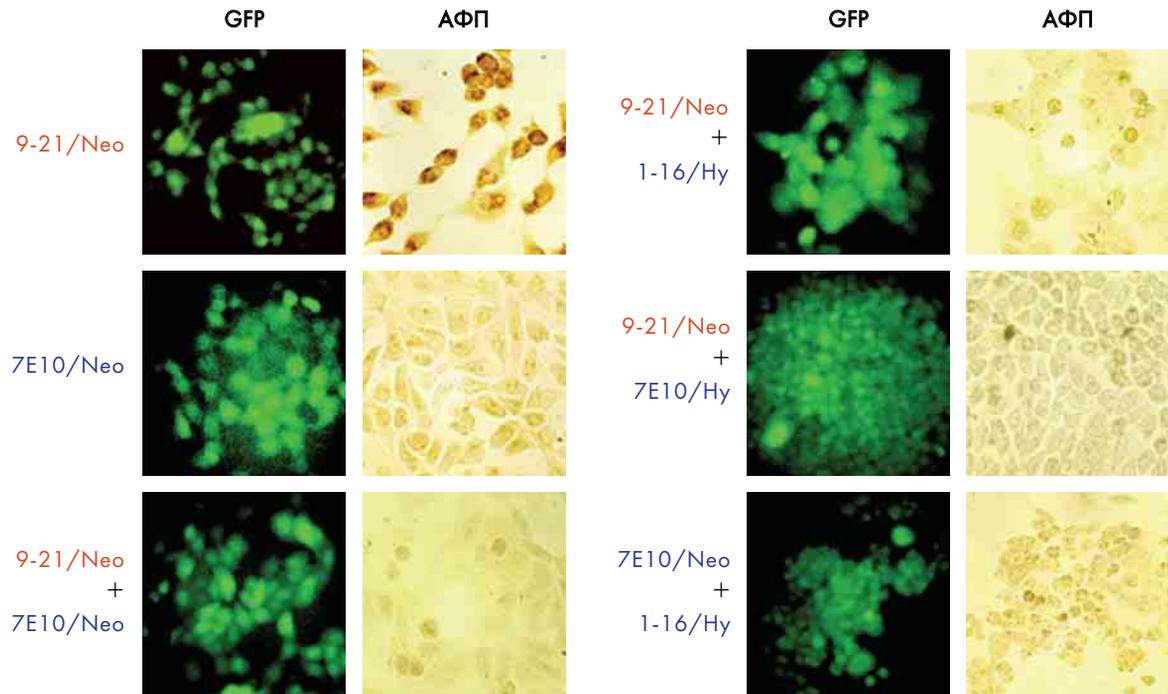


Рисунок 5. Подавление синтеза АФП в соматических гибридах.

Колонка «GFP» — флуоресценция белка GFP в клонах, трансфицированных ретровирусным вектором рLNCG-1; колонка «АФП» — непрямая иммунопероксидазная окраска исходных клонов гепатомы и соматических гибридов антителами к АФП крысы.

фенотип (рисунок 6). Вероятно, подавление экспрессии гена АФП в соматических гибридах происходит за счет наличия в АФП⁻-клонах негативного транскрипционного фактора, который связывается с репрессорным элементом АФП или подавляет экспрессию основного активатора гена АФП.

Так же был проведен ОТ-ПЦР анализ экспрессии большинства транскрипционных факторов в исходных клонах и соматических гибридах.

Оказалось, что экспрессия основных активаторов АФП-транскрипции HNF1 и FTF, выявляется в АФП⁺- и одном из АФП⁻-клонов, а также и в некоторых соматических гибридах. Таким образом, присутствия этих факторов не достаточно для экспрессии гена АФП в АФП⁻-клонах и гибридах.

Анализ экспрессии остальных *транс*-факторов в клонах гепатомы и соматических гибридах не выявил связи между появлением какого-либо из факторов с репрессией гена АФП.

Итак, отсутствие ГЯФ в соматических гибридах могло бы объяснить подавление экспрессии АФП, однако результаты соматической гибридизации свидетельствуют о том, что факторов, активирующих промотор АФП, оказывается недостаточно для экспрессии этого гена в АФП⁻-клонах. Это согласуется с нашим

предположением о существовании негативного фактора, подавляющего транскрипцию АФП независимо от активационных факторов.

Изучение профилей экспрессии генов в ГКК

В последние годы в связи с расшифровкой генома и развитием высокотехнологичных методов исследования стало возможным исследование широкого спектра экспрессии генов.

Во многих странах создаются биологические микрочипы (microarray) — системы, позволяющие проводить множественный одновременный анализ микрообразцов ДНК. Микрочип — это маленькая (от пары миллиметров) пластинка из стекла, пластика или кремния, вмещающая до нескольких десятков тысяч ячеек с нанесенными (прикрепленными) в них фрагментами ДНК или белков. Вкупе с прибором-анализатором это мини-лаборатория, позволяющая быстро получать самые точные результаты.

ДНК-микрочипы способны анализировать линейные молекулы — ДНК и РНК — к примеру, находить мутации в генах, сравнивая «больные» и «здоровые» ДНК, или отлавливать вирусные и бактериальные ДНК. Для анализа к микрочипу добавляют меченный флуоресцентными краси-

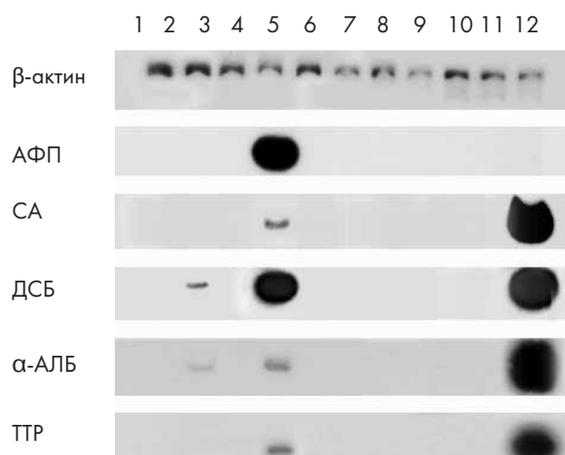


Рисунок 6. Экспрессия гепатоспецифических генов в клонах крысиной гепатомы и в соматических гибридах.

ОТ-ПЦР с праймерами к АФП, альбумину (СА), витамину-D связывающему белку (ДСБ), α-альбумину (α-АЛБ) и транскриптину (ТТР): дорожка 1 — негативный контроль обратной транскрипции без добавления фермента; 2–4 — АФП-клоны; 5 — АФП* клон; 6–11 — соматические гибриды; 12 — нормальная печень взрослой крысы.

Гибридизация с β-актином выполнена для контроля за качеством используемых образцов (мРНК этого гена равномерно распределена во всех клетках организма).

телями образец ДНК или мРНК исследуемого пациента или изучаемой ткани, клеточной линии. Принцип действия ячейки ДНК биочипа основан на комплементарных взаимодействиях азотистых оснований в двух нитях ДНК. Если последовательность оснований в одной нити ДНК (нанесенной в ячейку чипа) полностью комплементарна последовательности другой нити (ДНК пациента), то образуется стабильная совершенная двухнитчатая спираль — дуплекс. Однако присутствие даже одной неправильной пары предотвращает образование дуплекса. Положительная реакция (образование дуплекса), свидетельствует о наличии в исследуемом образце определенного фрагмента ДНК и фиксируется в виде светящегося квадрата (анализ проводится автоматически, рисунок 7).

Белковые чипы появились сравнительно недавно, с их помощью анализируют более сложные по форме, чем ДНК, белковые молекулы — антитела, антигены, гормоны, аллергены и др.

Метод ДНК-микрочипов позволяет изучить и сравнить спектры экспрессии нескольких тысяч генов в различных тканях или клеточных линиях. При сравнении нормальных и опухолевых тканей можно выявить группу онкомаркеров, характерную для данного типа опухолей, что имеет неоценимое значение для клинической диагностики. Также микрочипы начинают широко применяться в фармакологии для скрининга лекарственных веществ и токсинов.

При сравнении спектров экспрессии генов различных гепатом человека и нормальной печени было вновь показано, что возобновление экспрессии АФП является одним из событий наиболее четко маркирующих гепатоканцерогенез. При гибридизации с микрочипом на 9000 генов во всех рассматриваемых гепатомах АФП оказался геном, экспрессия которого максимально отличается в ГМК и нормальной печени. Сравнение профилей экспрессии генов в различных клеточных линиях гепатом, а также опухолей негепатоцитарного происхождения методом гибридизации с микрочипами более чем к тысячи генов позволило выявить 18 генов-маркеров этих опухолей, которые в ближайшем будущем могут быть применены в клинической практике. Возможно, использование ДНК-микрочипов позволит идентифицировать негативный фактор, подавляющий транскрипцию АФП.

Использование регуляторных элементов АФП в генной терапии

В последние годы активно разрабатывается технология генной терапии опухолей, в частности ГМК. Принцип лечения основан на введении в опухолевые клетки вирусных или плазмидных векторов, несущих гены, которые способствуют гибели опухолевых клеток, например р53 или тимидинкиназы. Наиболее успешно используют векторы на основе аденовирусов и ретрови-



Рисунок 7. Схема образования двойной спирали ДНК на биочипе.

Олигонуклеотид фиксирован на одном из элементов биочипа и избирательно связывает из многих флуоресцентно меченных фрагментов ДНК только комплементарный. В результате только этот элемент начинает светиться. Это происходит благодаря высокоспецифичным взаимодействиям комплементарных пар нуклеотидов А с Т и Г с С. Присутствие некомплементарной пары, например G–G, предотвращает взаимодействие и оставляет элемент микрочипа темным (иллюстрация взята с сайта http://www.bio.su/dig_008_002.htm).

русов, а также вирусов герпеса. Необходимые для лечения гены в таких вирусных векторах экспрессируют под контролем тканеспецифического регуляторного элемента, который должен быть активен именно в опухолевых клетках. Поиск подходящего регуляторного элемента является определяющим этапом в разработке стратегии для генной терапии. Для ГКК наиболее специфическим элементом, безусловно, является регуляторный район гена АФП. Промотор и энхансеры АФП успешно используют в вирусных и плазмидных векторах: при генной терапии на экспериментальных моделях происходит гибель высокого процента опухолевых клеток и существенно ингибируется рост ГКК. Однако этот метод имеет свои ограничения: в зависимости от степени дифференцировки опухоли определенная часть клеток может не продуцировать АФП, регуляторный элемент АФП в таких клетках не активен, и они оказываются нечувствительными к генной терапии. Возможно, такие опухоли можно лечить с использованием векторов под контролем регуляторных элементов СА или регуляторных элементов *транс*-фактора, подавляющего экспрессию гена АФП. Поэтому изучение механизмов, определяющих экспрессию АФП и тандемную регуляцию локуса СА/АФП, представляет значительный интерес для генной терапии.

Еще одним направлением лечения таких патологий печени, как цирроз или моногенные заболевания, является терапия, которая направлена на регенерацию нормальных гепатоцитов и постепенное замещение пораженных клеток на здоровые. Молекулярные механизмы экспрессии АФП при регенерации еще не достаточно хорошо изучены, это направление исследований представляется достаточно перспективным.

Заключение

Со времени открытия онкоэмбрионального маркера АФП и до настоящего времени не прекращаются исследования механизмов регуляции его экспрессии. Подробно описан 5'-регуляторный район гена, включающий в себя промотор, три энхансера и репрессор, определяющий падение экспрессии гена АФП во взрослой печени. Обнаружены общераспространенные и тканеспецифические транскрипционные факторы, участвующие в регуляции экспрессии большинства генов печени. Однако механизмы, определяющие падение синтеза АФП в онтогенезе, пока не ясны.

Могут возникнуть вопросы: что можно узнать нового о белке, изучением которого

занимаются более тридцати лет? Стоит ли заниматься этими проблемами?

Начнем с того, что очень мало известно о функциях АФП. Хорошо изучена лишь транспортная функция этого белка, которая считается основной. Другие функции белка, такие, как связывание эстрогенов и подавление иммунного ответа, по-видимому, отличают АФП от других белков семейства, но изучены недостаточно и описаны не для всех изучаемых видов.

Структура регуляторного района гена АФП описана подробно, тем не менее, роль каждого из цис-элементов в регуляции транскрипции АФП выяснена не до конца. Наиболее полно механизм регуляции описан для промотора гена АФП. Роль репрессора в регуляции, факторы способные с ним связываться, к настоящему времени не изучены. Возможно, дальнейшее изучение этих структур изменит наши представления о регуляции транскрипции этого гена.

Гены семейства альбумина расположены в одном участке хромосомы, непосредственно примыкают друг к другу. Вероятно, такая локализация генов не случайна и необходима для координированной регуляции их экспрессии. На данный момент известны лишь отдельные сведения совместной регуляции АФП и СА тем или иным транскрипционным фактором. Эти сведения не дают представления о полной картине координированной регуляции этих генов.

Наконец, практически ничего не известно о механизмах, подавляющих экспрессию гена АФП после рождения, и причинах восстановления экспрессии при регенерации и в гепатоканцерогенезе.

Каждая из рассмотренных выше проблем представляется нам важной и перспективной. АФП является маркером ГКК и ТК, и механизмы регуляции его экспрессии тесно связаны с опухолевой трансформацией. АФП и СА характеризуют дифференцированные гепатомы с эмбриональным и взрослым типами экспрессии генов. Механизмы канцерогенеза в разных типах ГКК могут иметь свои особенности. Для диагностики ГКК и разработки новых методов лечения важно понимать эти различия. Для применения регуляторных элементов АФП в генной терапии необходимо обладать полной информацией о возможностях регуляции этого гена.

Список используемых сокращений:

АФП — альфа-фетопротейн,
СА — сывороточный альбумин,
α-АЛБ — альфа-альбумин (афамин),
ДСБ — витамин-D-связывающий белок,

ГЯФ (HNF) — гепатоцитарные ядерные факторы,
 ГКК — гепатоклеточная карцинома,
 ГБ — гепатобластома,
 ТК — тератокарцинома,
 ГКГ — глюкокортикоидный гормон,
 ГРК — комплекс глюкокортикоидный гормон – рецептор,
 РК — ретиновая кислота,
 ТТР — транстиретин,
 ТТФ — трансферрин,
 АФП⁺-клон — АФП-продуцирующий клон,
 АФП⁻-клон — АФП-непродуцирующий клон,
 п.н. — пара нуклеотидов,
 т.н. — тысяча нуклеотидов,
 т.п.н. — тысяча пар нуклеотидов.

Литература

- Абелев Г.И., Перова С.Д., Храмова Н.И., Постникова З.А., Ирлин И.С.** 1963. Эмбриональный сывороточный α-глобулин и его синтез перевиваемыми гепатомами мышей // Биохимия, 28 (4): 625–634.
- Татаринев Ю.С.** 1965. Содержание эмбриоспецифического α-глобулина в сыворотке плода, новорожденного и взрослого человека в случаях первичного рака печени // Вопр. мед. химии, 2: 584–589.
- Чумаков П.М.** 2000. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью // Биохимия, 65 (1): 34–47.
- Эрайзер Т.Л., Абелев Г.И.** 1984. Подходы к изучению клональной структуры первичных гепатом // Иммунологические аспекты биологии развития. — М.: Наука, 138–141.
- Abelev G.I., Assekritova I.V., Kraevsky I.A., Perova S.D., Perevodchicova N.I.** 1967. Embryonal serum α-globulin in cancer patients: diagnostic value // Int. J. Cancer, 2: 551–558.
- Abelev G.I.** 1978. Experimental study of alpha-fetoprotein reexpression in liver regeneration and hepatocellular carcinomas // Cell Differentiation and Neoplasia. G.G. Saunders (ed.). — New-York: Raven Press: 257–269.
- Abelev G.I.** 1993. Alpha-fetoprotein biology // Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol., 11: 85–109.
- Belanger L., Baril P., Guertin M., Gingras M.C., Gourdeau H., Anderson A., Hamel D., Boucher J.M.** 1983. Oncodevelopmental and hormonal regulation of the AFP gene expression // Adv. Enzyme Regul., 23: 73–99.
- Belanger L., Sylvie R., Allard D.** 1994. New albumin gene 3' adjacent to the α-fetoprotein locus // J. Biol. Chem., 269: 5481–5484.
- Bernier D., Thomassin H., Allard D., Guertin M., Hamel D., Blagiere M., et al.** 1993. Functional analysis of developmentally regulated chromatin-hypersensitive domains carrying the α-fetoprotein intergenic enhancer // Mol. Cell. Biol., 13: 1619–1633.
- Bergstrand C.G., Czar B.** 1956. Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus // Scand. J. Clin. Lab. Invest., 8: 174–179.
- Gershon D., Sachs L.** 1963. Properties of a somatic hybrid between mouse cell with different genotypes // Nature, 198: 912–913.
- Glass C.K., Rosenfeld M.G.** 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors // Genes Dev., 14: 121–141.
- Locker J.** 2001. Tissue-specific regulation by transcription factors // Transcription factors. J. Locker (ed.). Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd. 1: 237–262.
- Shen C.N., Slack J.M., Tosh D.** 2000. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver // Nat. Cell Biol., 2 (12): 879–887.
- Sorieul S., Ephrussi B.** 1961. Karyological demonstration of hybridization of mammalian cell *in vitro* // Nature, 190: 653–654.
- Widen S.G., Papaconstantinou J.** 1987. Extinction of α-fetoprotein gene expression in somatic cell hybrids involves cis-acting DNA elements // Mol. Cell. Biol., 7: 2606–2609.

Восстановление видового разнообразия растений на сырых пойменных лугах в долине реки Айдер (Северная Германия)

Л. Разран



Леонид Разран
13-й выпуск (Кроссастеры),
школа № 520 (1991 г.),
закончил Кильский университет (Christian Albrecht Universität zu Kiel, 2001); к.б.н.,
работает в Ecology Research Centre, кафедра Геоботаники (Германия),
lrasran@ecology.uni-kiel.de

Один из главных вопросов науки геоботаники можно сформулировать так: «Почему определенные растения произрастают в определенном месте?» Чтобы ответить на этот вопрос, ученые рассматривают различные факторы неживой (климат, увлажненность, особенности почвы) и живой природы (взаимоотношения с другими растениями и животными). Таким образом выстраивается общая картина растительного покрова.

Правда, в последнее время этот вопрос формулируется несколько иначе, особенно людьми, занимающимися проблемами охраны природы: «Почему тот или иной вид растений в определенном месте больше не встречается, какие причины привели к локальному вымиранию популяции или препятствуют дальнейшему расселению вида на, казалось бы, пригодной для этого территории?»

Первая группа причин очевидна и обобщается под лозунгом «уничтожение среды обитания» как следствие вмешательства человека в природные процессы. А вот что собой представляет среда обитания, как ее восстановить, вмешательство какого характера имело столь пагубные последствия и даст ли предпринимаемая попытка восстановления природного баланса ожидаемый результат? — эти вопросы еще далеко не ясны.

Вторая группа причин и вовсе часто упускалась из виду. В отличие от большинства животных растения лишены возможности активно передвигаться в поисках пригодной для них

среды обитания. Соответственно, успех расселения целиком зависит от количества произведенных диаспор (семян или вегетативных частей растений, предназначенных для размножения и расселения) и возможностей их распространения внешними агентами. Однажды исчезнув в одном месте, популяция не может восстановиться до тех пор, пока достаточное число диаспор не будет привнесено извне.

Среди находящихся под угрозой исчезновения ландшафтов Западной Европы особое место занимают сырые луга. Эти системы отличаются высоким видовым разнообразием (диверзитетом). Даже непосвященный наблюдатель не может не отметить красоту цветущей луговины с разноцветными, сменяющими друг друга коврами полевых цветов. Удивительно, но факт — своим существованием столь богатое сочетание красок и форм обязано контролируемому вмешательству человека. Если бы человек никогда не появился на свете, 90% площади Европы покрывали бы сейчас густые леса, луговые растения ютились бы в местах, в силу естественных процессов оказавшихся свободными от леса — поймах рек, болотах, дюнах. Луга в их нынешней форме появились лишь в бронзовом веке с началом сельскохозяйственной активности первых поселений людей. Со временем наиболее плодородные и доступные для возде-



Рисунок 1. Цветущий сырой луг с пушицей, мытником болотным, лютиком едким и пальцекокоренником майским

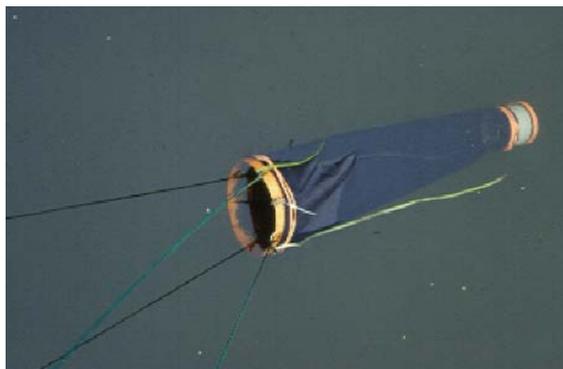


Рисунок 2. Ловушка для семян растений, использовавшаяся для изучения транспорта семян в р. Айдер.

львания участки были превращены в пашню, а там, где почва была слишком бедной и сырой, оставили пастбища для скота и сенокосы. Луговые растения хорошо приспособились к поеданию животными и регулярному укусу, большинство из них привыкло также «довольствоваться малым» по отношению к важнейшим питательным веществам в почве — азоту и фосфору.

Почему же луга, украшавшие ландшафт на протяжении нескольких тысячелетий, вдруг оказались на грани исчезновения, а растения, их составляющие, и до недавнего времени прекрасно уживавшиеся рядом с людскими поселениями, — на грани вымирания? Причина кроется в изменениях, происшедших в сельском хозяйстве в последние десятилетия. С появлением сельскохозяйственных машин и минеральных удобрений умеренная нагрузка на природные сообщества, способствовавшая развитию большого количества видов растений, сменилась интенсивной, нацеленной на получение максимального урожая с единицы площади. Фермерам уже невыгодно оказалось выгонять коров на луг, а вместо низкокалорийного сена скоту начали скармливать более питательный силос, полученный с гораздо меньшей площади, на которой после вноса удобрений вместо лугового разнотравья осталось лишь 2–3 вида злаков и клевер. С другой стороны, те участки лугов, где высокий уровень грунтовых вод и мягкая почва исключали использование сельхозмашин, а затраты на осушение не окупили бы выручки с урожая, были попросту заброшены. Вопреки расхожему мнению о том, что природа, освободившись от вмешательства со стороны людей, сама восстанавливает нарушенное равновесие, прекращение традиционного хозяйства на сырых лугах имело весьма пагубные последствия для их видового разнообразия. Без постоянного вмешательства (контролируемого беспокойства) те немногие виды, что умеют оптимально использовать

имеющиеся ресурсы, получают преимущество над остальными, и место цветочного ковра очень быстро занимают непролазные заросли таволги, чертополоха, крапивы или канареечника. Недостаток питательных веществ, ранее сдерживавший развитие таких растений в большинстве болотных и луговых экосистем теперь практически не играет роли из-за большого количества нитратов и фосфатов, смываемых с полей в грунтовые воды и выпадающих с дождем из атмосферы.

Так как же предотвратить окончательное исчезновение луговых сообществ, а с ними и большой доли видового разнообразия травянистых растений, насекомых и других животных, избравших эти структуры местом обитания, из современного ландшафта?

Как построить луг

Шаг первый, самый простой и сложный одновременно, — восстановить традиционные формы лугового хозяйства — одноразовый укос во второй половине лета или выпас небольшого стада на обширной территории. Приходится считаться с тем, что эти формы природопользования экономически невыгодны и требуют дополнительных затрат. Значит, и осуществить их возможно лишь с привлечением сил и средств природоохранных организаций и фондов.

Шаг второй — преодоление нехватки диаспор (seed limitation). Итак, создавая луг, мы наконец задумались над вопросом: а могут ли растения, которые мы надеемся в ближайшем времени там увидеть, до нашего луга добраться?

Оказалось, что довольно много видов растений путешествует по воде (особенно если луга заливные). Исследования, проведенные на р. Айдер на севере Германии, показали, что водой переносятся семена почти двух третей видов растений, произрастающих в речной долине (рисунки 2 и 3). К этому числу принадле-



Рисунок 3. Содержимое ловушки — семена ириса, ольхи, конского щавеля и т.д. Всего за два года исследований в ловушках найдены семена почти двухсот видов растений.



Рисунок 4. Наводнение в пойме р. Айдер.

жат, например, семена ириса и вахты трехдольной, снабженные специальными приспособлениями для увеличения плавучести, такими как заполненные воздухом полости и несмачивающаяся кутикула. Но и растения, семена которых не имеют адаптаций такого рода, в немалом количестве дрейфуют в речной воде и успешно расселяются на площадях, затронутых паводками. Общее количество семян растений, дрейфующих на поверхности, превышает 1 млн в год на каждый метр ширины русла.

Разумеется, расселение водным путем возможно только там, где сток не канализирован и реки сохранили естественную динамику паводков. Восстановление видового разнообразия опять упирается в проблему восстановления экосистемы в целом, во всем многообразии ее компонентов и функций. В случае с речными долинами природа преподала людям солидный урок: серия сильных наводнений на Эльбе, Рейне, Одере и Дунае, имевших место в последнее десятилетие, наглядно показала, что зажатые между дамбами, спрямленные и зауженные русла рек не способны вместить большие массы воды, и рано или поздно поток вынужден будет искать выход из теснины, сносить валы и затоплять поля и города (рисунки 4 и 5).



Рисунок 5. Растительный материал, дрейфующий на поверхности во время паводка и состоящий большей частью из семян ольхи.

Наряду с огромными материальными потерями из «наводнений века» удалось извлечь и положительный опыт — там, где удавалось заранее открыть шлюзы и допустить контролируемое затопление отдельных, ненаселенных и потому менее ценных участков бывшей речной поймы, так называемых «польдеров» или полей затопления, последствия половодья оказались значительно менее катастрофическими. Многие из польдеров после затопления перестали возделывать и превратили в луга, дав переносимым водой растениям шанс закрепиться на новом месте.



Рисунок 6. Восстановленный участок пастбища в пойме р. Айдер.



Рисунок 7. Перенос сена, полученного на лугах с высоким видовым разнообразием, на подлежащие восстановлению участки луга.

Там, куда не достают поверхностные воды, растениям приходится полагаться на другие виды передвижения — ветер и животных. Движения ветра мало зависят от нашего желания. А вот сельскохозяйственные животные могут быть использованы как еще один инструмент в руках менеджеров природы. Возможно, в недалеком будущем картина европейского ландшафта снова дополнится такой почти забытой фигурой, как пастух с посохом и собакой. Перегоняя животных с участков лугов, до сих пор сохранивших высокое видовое разнообразие, на находящиеся поблизости заново созданные пастбища, он бу-



Рисунок 8. Создание условий для произрастания луговых растений с помощью удаления верхнего слоя почвы.

(а) — Удаление верхнего слоя почвы на деградированном пойменном лугу (долина р. Айдер). (б) — Участок с удаленной почвой через 5 лет — растения пушицы и мытника болотного, как и другие луговые растения, ранее не встречавшиеся на участке проведения эксперимента.

дет способствовать переносу семян в желаемом направлении и расселению редких видов на большей территории (рисунок 6).

Наконец, если преодолеть факторы, лимитирующие распространение естественным путем не удастся, возможно и прямое вмешательство.

В последнее время довольно часто применяемым методом стало использование сена, полученного при укосе, осуществляемом с природоохранными целями на сохранившихся участках лугов с высоким видовым разнообразием и большим числом редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений (рисунок 7). Сено, особенно полученное во второй половине лета, очень богато семенами растений, большинство из которых еще не потеряли всхожесть. Таким сравнительно доступным и дешевым методом удастся перенести 70–80%, а иногда и больше, от видового разнообразия сообщества-донора на восстанавливаемое сообщество. При этом и сохраняют естественное сочетание видов, и получают распространение формы, оптимально адаптированные к локальным условиям среды.

Шаг третий в процессе восстановления лугового сообщества становится необходимым в тех случаях, когда нарушения природного баланса зашли так далеко, что стали необратимыми. Типичный пример — части речной поймы, где в результате мелиорации верхний слой почвы, состоявшей в основном из торфа, сильно разложился, и при этом высвободилось большое количество нитратов и фосфатов. На перенасыщенной питательными веществами (эвтрофицированной) почве луговое сообщество развиваться не может. Обеднение может быть достигнуто

регулярными укосами с изъятием биомассы, но этот процесс может растянуться на десятилетия, а с учетом постоянного притока азотных соединений с окружающих полей и из атмосферы и вовсе не увенчаться успехом.

Для создания условий, пригодных для произрастания луговых растений, иногда не остается ничего лучшего, чем полностью или частично удалить верхний слой почвы (рисунок 8). Парадокс, но экскаватор в качестве природоохранного инструмента тоже находит применение. Вместе с верхним слоем почвы удаляется не только избыток питательных веществ, но и доминирующая растительность вместе с корневищами и семенами. На образовавшейся открытой площади легко осуществить заселение луговыми растениями, — либо под влиянием естественных процессов, либо применяя метод переноса семян с сеном. Изъятый грунт можно засыпать мелиорационные канавы и восстановить естественный уровень грунтовых вод — еще один важный элемент восстановления сырых луговых экосистем.

Все описанные методы были использованы в экспериментальном масштабе в долине р. Айдер (Северная Германия) в рамках проектов «Пастбища в долине Айдера» и «Процессы распространения диаспор и видовое разнообразие». Была оценена роль различных векторов распространения семян (воды, ветра, животных и человека) в экосистеме речной поймы, а также получены участки восстановленных пойменных лугов и пастбищ. Работы осуществлялись сотрудниками Института экологии Кильского университета (Ecology Research Centre, University of Kiel) при поддержке фондов VmBF и DFG.

Гравитационная биология

С. Рязанский



Сергей Рязанский
13-й выпуск (Кроссастеры),
школа № 520 (1991 г.),
окончил биофак МГУ по
специальности биохимия
(1996 г.), к.б.н., космонавт-
исследователь, работает в
Институте медико-биологи-
ческих проблем РАН,
srez@mail.ru

Биология — наверное, самая интересная наука, изучающая наш удивительный и прекрасный мир. Загадочен мир клетки, пестро разнообразии цветочков и зверюшек, поражает своей сложностью и отлаженностью человеческий организм. Мне же посчастливилось работать в области биологии, затрагивающей основы существования, развития и функционирования живой материи на нашей планете, — космической биологии. Невозможно рассказать все и даже самое интересное, настолько многообразны работы, ведущиеся в данном направлении, поэтому это только общее и сильно поверхностное введение. Итак, ...

Биология как наука о закономерностях возникновения, развития и функционирования живой материи решает свои задачи на целом ряде направлений. Одним из них является гравитационная биология, которая исследует зависимость структуры, функции и поведения живых организмов от величины и направления гравитационных воздействий. Благодаря систематическим исследованиям, проведенным за последние десятилетия в наземных условиях и космических полетах, основы гравитационной биологии уже заложены, но интерес к этой проблеме не угасает. Ведь важно не только теоретически понять и описать закономерности воздействия гравитации, но и обеспечить безопасное и эффективное участие человека в освоении космического пространства и планет, где гравитационные условия существенно отличаются от наземных.

В конце XIX — начале XX вв. К.Э. Циолковским были теоретически обоснованы прогнозы о возникновении сенсорных, двигательных и вегетативных расстройств в условиях невесомости, о возможных изменениях формы живых

организмов. Он же провел аналогии между состоянием невесомости и условиями, с которыми человек сталкивается на Земле, погружаясь в воду или находясь в постели. Космос — это среда, где практически отсутствуют кислород, очень низкое давление, очень низкие температуры, высокий уровень радиации, а гравитация составляет всего лишь $10^{-6}g$, (это в миллион раз меньше земного!), т.е. за пределами земной атмосферы человек находится в условиях микрогравитации. Космическое действие всех перечисленных факторов (кроме микрогравитации) на организм представляет существенную опасность для жизни человека, однако, с помощью специальной конструкции космических кораблей ее можно минимизировать. Микрогравитация действует в течение всего космического полета. Важно отметить, что в реальности гравитация исчезнуть полностью никогда не может, поэтому не корректно определять состояние, возникающее во время орбитального полета как состояние невесомости или нулевую гравитацию. Правильным термином является именно «микрогравитация». Однако уровень гравитации настолько мал, что только очень чувствительные приборы могут измерить его величину. В условиях микрогравитации у человека закономерно развиваются адаптивные реакции, сопровождающиеся функциональной перестройкой гравитационно-зависимых и регуляторных систем организма.

За миллионы лет эволюционного развития живые организмы в совершенстве адаптировались к условиям жизни на Земле, и, естественно, к гравитации. Система антигравитационных функций включает: скелет (у одноклеточных — цитоскелет; у многоклеточных — наружный или внутренний; хитиновый, известковый, хрящевой или костный); мускулатуру, обеспечивающую поддержание позы и осуществление локомоций; систему пространственного анализа, координации и управления движениями, важная роль в которой принадлежит специфическим гравирецепторам. Дыхание, пищеварение, энергетический и другие виды обмена, система нейрогуморальной регуляции функций оказывают прямое влияние на потенциальные возможности антигравитационных систем, но, в свою очередь, и сами весьма подвержены влиянию гравитационных воздействий.

Воздействие микрогравитации на живой организм очень разностороннее, однако можно выделить три первичных механизма. Важнейшим из них является изменение весовой нагрузки на опорно-двигательный аппарат. Оно сказывается на характере синтетических процессов, уровне энергетического и других видов обмена веществ, функции кардиореспираторной системы, которая должна быть адекватна энергетическим потребностям организма; на характере нервной и гормональной регуляции движений. Но конечным выражением перестроек, обусловленных этим механизмом, являются изменения структурно-функциональных характеристик скелета и скелетной мускулатуры.

Другим механизмом развития ответной реакции на микрогравитацию является изменение гидростатического давления биологических жидкостей (главным образом, крови). Увеличение гидростатического напора при перегрузках или его уменьшение в условиях микрогравитации являются причиной изменений распределения крови в организме, что может привести к развитию острых нарушений кровообращения или к возникновению изменений водно-солевого обмена, уровня гидратации организма, его резистентности.

Третьим первичным механизмом, посредством которого гравитация реализует свое воздействие на биологические объекты, являются изменения в деятельности гравитационнозависимых рецепторов, включая специфические гравирецепторы вестибулярного аппарата. Этот механизм лежит в основе изменений, которые связаны с функцией пространственного анализа, координации движений в условиях микро- и гипергравитации. Рассогласование в деятельности афферентных систем при гравитационных воздействиях выражается также в развитии симптоматики болезни движений, иллюзорных реакций, в ухудшении самочувствия и рабо-



Рисунок 1. Ежедневные тренировки на орбитальной станции.



Рисунок 2. Трава земная — (а) и «космическая» — (б).

пособности человека. Нервный механизм является важным компонентом тех систем, которые обеспечивают адаптацию организма к гравитационным воздействиям.

На данный момент развития гравитационной биологии наиболее изученным объектом остается человек, что проистекало из необходимости обеспечения безопасности экипажей в космических полетах. Отсутствие весовой нагрузки, как показывают результаты исследований, проведенных в космических полетах, является причиной утраты антигравитационных свойств, выработанных в процессе эволюции и индивидуального жизненного опыта. Разветвленная цепь взаимосвязанных структурных и функциональных перестроек носит в этом случае явно выраженный энтропийный характер, снижает уровень организованности системы и общую резистентность организма. Для того чтобы в этих условиях предупредить возникновение эффектов неупотребления, атрофии от бездействия, приходится искусственно восполнять комплекс недостающих нагрузок. В противном случае приходится считаться с угрозой стабилизации гравитационных функций на уровне, при котором возврат к наземным условиям обитания окажется затрудненным и даже опасным.

Планируя интервенцию на планеты, отличающиеся от Земли силой притяжения, или создавая стационарные поселения в межпланетном пространстве, человечество должно исходить из двух теоретически возможных стратегий: полного или временного погружения в новую гравитационную среду. В первом случае биологическая задача будет состоять в стимулировании, ускорении адаптационных процессов без оглядки на опасность их перехода в далеко зашедшую, nasledstvenno закрепленную, необратимую форму. Во втором случае (он применяется в настоящий момент истории космических полетов) должны быть приняты меры по недопущению этой опасности, поддерживающие постоянную готовность к возврату на Землю без нанесения ущерба здоровью и долголетию космонавтов.

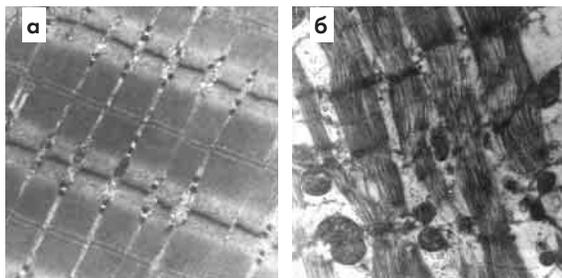


Рисунок 3. Структура мышц до — (а) и после — (б) пребывания в невесомости.

Помимо сугубо прикладных задач, связанных с обеспечением работоспособности человека в космическом полете, гравитационная биология предлагает огромный спектр интересных и совершенно не изученных на настоящее время вопросов о влиянии гравитационных воздействий в различных областях:

- клеточная и молекулярная биология (гравирецепция, прямые и опосредованные влияния острых и длительных изменений гравитационных нагрузок, конвекция, диффузия, обмен веществ, клеточные мембраны, цитоскелет);
- биология развития (репродукция, рост, продолжительность жизни, генетический аппарат);
- биология растений (гравирецепция, метаболизм, фотосинтез, репродукция, взаимосвязь

гравитационных воздействий с другими факторами среды);

— системная биология (гравирецепция, ориентация, локомоции, опорно-двигательные структуры, метаболизм, адаптация — гомеостаз — реадаптация, жизненный цикл, циркадианные ритмы, внутренние синхронизаторы);

— физиология кардиореспираторной системы (исследование реакций, механизмов регуляции, возможностей профилактики);

— физиология мышечной, костной и соединительной тканей (потеря мышечной массы, деминерализация костей, изменения кальциевого метаболизма, разработка профилактических мероприятий);

— нейрофизиология (межсенсорное взаимодействие, сенсорный конфликт, адаптационно-реадаптационные перестройки двигательных функций и сенсорных систем);

— физиология регуляции (эндокринология, гематология, иммунология, питание, пищеварение, фармакокинетика, почечная функция, циркадианные ритмы, терморегуляция).

Я абсолютно уверен, что гравитационную биологию, хочется надеяться, что и с вашей помощью, ожидает впереди трудный, но увлекательный путь дальнейшего постижения нашего удивительного мира.



Современные методы определения пространственной структуры белков

М. Членов



Марк Членов
13-й выпуск (Кроссастеры),
школа № 520 (1991 г.),
окончил кафедру биохимии
Биофака МГУ (1996 г.),
к.б.н., работает в биотехно-
логической компании
Differential Proteomics
(Бостон)*,
mark_chlenov@yahoo.com

Кристаллизация белков и разрешение их структур являются одними из самых перспективных направлений современной биологии. В их основе лежит свойство биомолекул образовывать кристаллы, способные рассеивать рентгеновские лучи. Закон Брэгга, описывающий зависимость между углами и фазами падающих и отраженных волн и расстояниями между атомами в кристаллической решетке, позволяет воссоздать трехмерную кристаллическую структуру по картине дифракции кристаллами рентгеновских лучей. С момента получения первой структуры гемоглобина Максом Перуцом в 1959 г. современная кристаллография проделала долгий путь. В настоящее время сотни лабораторий в самых разных странах мира занимаются либо исключительно кристаллизацией и разрешением структур белков, либо используют этот процесс в качестве дополнения и доказательства правильности тех или иных теорий и моделей, основанных на биохимических данных. Сотни структур публикуются каждый год в самых престижных биологических журналах мира, пополняя компьютерную базу данных GenBank. Эта цифра продолжает расти из года в год. Ведущие фармацевтические компании мира (Pfizer, Novartis, Genzyme и т.д.) тратят миллиарды долларов на кристаллизацию белков патогенных бактерий и вирусов для того, чтобы лучше

синтезировать потенциальные ингибиторы их функций. Технологии, используемые этими компаниями в процессе кристаллизации, значительно превосходят таковые, используемые основными научно-исследовательскими институтами. Они сочетают в себе не только последние достижения современной физики, но также роботизации и кибернетики. При этом всем, несмотря на значительный прогресс последних лет, кристаллография остается весьма трудоемким процессом, в котором многое зависит от простой удачи. Универсальных правил и гарантий получения кристаллов, которые будут достаточно хорошо рассеивать проходящие через них рентгеновские лучи, на настоящий момент не существует. Обычно процесс получения третичной структуры белка может занимать, в зависимости от опытности кристаллографа, интенсивности работы и других факторов, от нескольких месяцев до пары лет.

Процесс получения трехмерной структуры белка состоит из нескольких шагов. Каждый из них требует определенных навыков в биохимии, молекулярной биологии, статистической обработке данных, а также знакомства с интерфейсами программ, обеспечивающих построение конечной трехмерной структуры белка. Эти шаги включают в себя клонирование, очистку, кристаллизацию, сбор данных рассеивания, их обработку и компьютерное моделирование.

Клонирование

Успешная кристаллизация белков требует больших затрат белкового материала, обычно измеряющихся в миллиграммах или даже десятках миллиграммов. Поскольку объектами интереса современной кристаллографии зачастую являются белки, присутствующие в клетках в незначительных концентрациях (рецепторы, транскрипционные факторы, гормоны), их прямая очистка из организмов в достаточных количествах становится весьма проблематичной. Оптимальным способом решения проблемы является клонирование генов данного вида в бактериальные вектора под контроль сильных промоторов, и их последующая экспрессия

*В 1996–2000 гг. учился в аспирантуре ИМГ РАН. С 2000 по 2004 г. работал в лаборатории Сета Дарста в Рокфеллеровском Университете в Нью Йорке, занимаясь очисткой, кристаллизацией и разрешением структур белков.

в подходящих бактериальных штаммах. Наиболее часто для этой цели используются плазмиды семейства pET, производимого фирмой Novagen, совместно с клеточными штаммами, содержащими T7 профаг (DE3) в своей хромосоме. Плазмиды семейства pET не только позволяют клонировать гены под контроль одного из самых мощных в мире промоторов (РНК-полимеразы бактериофага T7), но также добавляют к синтезируемому белку отщепляемый гексагистиридиновый хвост (His tag), значительно облегчающий очистку.

«Включение» промотора посредством добавления к растущим клеткам нерасщепляемого аналога лактозы (IPTG) позволяет получать миллиграммы рекомбинантных белков из одного литра клеточной культуры. Одним из подводных камней при клонировании белков для их последующей кристаллизации является проблема растворимости. Многие чужеродные для клетки белки, произведенные в клетке в огромных количествах, образуют нерастворимые агрегаты, называемые телами включения (inclusion bodies). В большинстве случаев белки из подобных агрегатов удается извлечь посредством их растворения в концентрированной мочеvine или гуанидине. Однако в таких случаях ренатурация белков происходит *in vitro*, без клеточных систем, облегчающих правильное свертывание, что часто приводит к потере способности кристаллизоваться. В этой связи большинство кристаллографов предпочитают иметь дело только с теми белками, которые изначально оставались в растворимой фракции клеточных лизатов. Одна из методик, часто позволяющая увеличивать количество растворимого рекомбинантного белка, состоит в выращивании и индукции клеток при низких температурах (30 или даже 25 °C). Похожие результаты приносит также использование малых концентраций IPTG. Другой подход к этой проблеме — использование штаммов (pLys), кодирующих, помимо T7 РНК-полимеразы, еще и ее ингибитор, что замедляет скорость транскрипции рекомбинантного белка, увеличивая таким образом пропорцию его растворимой фракции.

Очистка

Белки, используемые для кристаллизации, должны обладать высокой степенью чистоты, что требует нескольких хроматографических шагов. Для очистки белков чаще всего используется система FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). Одним из наиболее популярных инстру-

ментов для очистки белков в современной кристаллографической лаборатории является FPLC АКТА фирмы Pharmacia. Эта высокоавтоматизированная система позволяет не только оперировать несколькими хроматографическими колонками одновременно, но и обладает большим количеством датчиков, записывающих все параметры данных шагов очистки. К ним относятся скорость прокачки буферов, их температура, давление, pH, ионная сила и, конечно же, оптическая плотность сходящего с колонки раствора при разных длинах волн.

Первый шаг очистки — получение «осветленного» клеточного лизата (clarified cell lysate), в процессе которого клетки, суспендированные в соответствующем буфере (содержащем лизоцим и ингибиторы протеаз), разрушаются либо с помощью ультразвука (sonication), либо с помощью высокого давления (french press). Кроме разрушения клеточной стенки и многочисленных мембран происходит также разрывание хромосомной ДНК на небольшие фрагменты, что делает полученную суспензию значительно менее вязкой. Фрагменты клеточных стенок и прочие нерастворимые компоненты убираются из раствора посредством высокоскоростного центрифугирования.

Следующий шаг — это аффинная хроматография (affinity chromatography), в ходе которой белок пропускается сквозь колонку с сорбентом, обладающим специфическим сродством к гистиридиновому хвосту белка, добавленному при клонировании. После этого шага очищенный белок либо концентрируют с помощью фильтров (Amicon, Centricon), либо переосаждают трехмолярным раствором сульфата аммония с последующим растворением осадка в меньшем объеме.

За аффинной хроматографией обычно следует гель-фильтрация (gel filtration/sizing), в процессе которой белковая смесь пропускается сквозь пористые сферы определенного сорбента, что обеспечивает ее разделение по молекулярной массе. Наиболее часто используемые колонки для гель-фильтрации — это Superose, Sephadex и Sephacryl. Первыми с колонки сходят самые тяжелые белки, за которыми следуют средние и более легкие. Самые легкие белки и примеси снимаются с колонки в последнюю очередь. Гель-фильтрация обеспечивает значительную очистку интересующего белка, также позволяя отделить его возможные агрегаты от основной, гомогенной, фракции. Как и после предыдущего шага, фракции, содержащие интересующий белок, определяются с помощью белкового геля и объединяются для следующего шага.

Следующей стадией очистки обычно служит ионообменная хроматография (ion exchange chromatography), в которой белки разделяются по своему заряду при разных значениях pH. В создаваемом при помощи двух буферов градиенте соли или pH первыми с колонки сходят те белки, которые обладают наименьшим сродством к данному сорбенту. Те, что обладают более сильным зарядом при выбранном pH, сходят последними. Типичными примерами ионообменной смолы являются Mono-Q и Mono-S.

Фракции, содержащие чистый рекомбинантный белок, объединяют, подвергают диализу, концентрируют, смешивают с глицерином, разбивают на небольшие аликвоты, замораживают и хранят при -80°C . Эффективность очистки определяют стандартным денатурирующим белковым гелем (SDS PAGE), на котором интересующий белок не должен содержать никаких примесей.

Обычно перед началом кристаллизации очищенный белок (или его фрагмент) исследуют при помощи масс-спектропии (electrospray или MALDI), чтобы убедиться в том, что он не претерпел никаких изменений в ходе очистки или протеолитического расщепления. Многие исследователи также оценивают и гомогенность своего белка при помощи нативного полиакриламидного гель-электрофореза или же метода светорассеивания.

Кристаллизация

Когда насыщенные растворы белков в виде висячих капель (hanging drops) помещают в герметичную ячейку, наполненную кристаллизующим раствором, концентрация соли (precipitant) в капле постепенно увеличивается, что приводит к выпадению белка в осадок, иногда принимающего форму кристаллов.

Процесс раскапывания разных растворов солей в ячейки, их смешивание с раствором белка, нанесение вакуумной смазки и их запечатывание всегда был очень долгим и трудоемким. Появление нескольких биотехнологических компаний (в первую очередь Hampton Research), занимающихся исключительно производством оборудования, растворов и прочих приспособлений для кристаллизации, значительно ускорило темпы получения кристаллов. В большинстве современных лабораторий кристаллы выращиваются в специальных кристаллических подносах (crystal trays), разбитых на 24 ячейки. В эти ячейки раскапываются растворы солей разных концентраций и pH (crystal screens). Самым простым и в то же время чаще всего приносящим

результаты методом кристаллизации является сульфат аммониевый и полиэтиленгликолевый (ПЭГ) скрининг, охватывающий широкий спектр их pH и молярности (процентности, в случае разных ПЭГов). Концентрированный раствор белка (обычно 20 мг/мл, хотя эта цифра может варьировать от 10 до 100 мг/мл) смешивают с равным количеством кристаллизующего раствора на покровном стекле (cover slip) и, перевернув его, помешают в виде висячей капли в загерметизированную с помощью вакуумной смазки ячейку кристаллического подноса, наполненную тем же раствором (mother liquor).

Другим, более редким, вариантом кристаллизации (в первую очередь из-за того, что это требует кристаллизующих подносов определенной формы) является сидячая капля (sitting drop). Чаще всего для увеличения шансов получения кристаллов кристаллические подносы с одними и теми же условиями хранят при 25 и 4°C . Так как кристаллы белков очень чувствительны к малейшим колебаниям температуры, для их роста используются специальные инкубаторы, строго поддерживающие заданную температуру. В среднем на получение изначальных кристаллов уходит от нескольких дней до пары недель. Если после этого капли остаются прозрачными (или же, наоборот, первоначальный осадок не растворяется), вероятнее всего, в этих условиях никаких кристаллов уже не вырастет. Те капли, которые содержат в себе кристаллы или которые выглядят обещающе, после этого воспроизводят, охватывая более узкий спектр молярности и pH данной соли. Изначальные кристаллы, полученные в одних или нескольких условиях скрининга, чаще всего не являются удовлетворительными для рассеивания рентгеновских лучей. Обычно они либо слишком малы (microcrystals), либо имеют игольчатую форму (needle crystals), либо образуют конгломераты, в то время как для получения хорошей картины дифракции требуются практически идеальные одиночные кристаллы, прямоугольной или же квадратной формы с четкими гранями.

Одной из методик улучшения формы кристаллов является дополнительный скрининг изначально найденных условий при помощи органических добавок (additives screen). Очень часто это приводит к значительному улучшению формы и качества изначальных кристаллов белков.

Следующим шагом является заморозка и хранение полученных кристаллов в специальном растворе криопротектора, предотвращающем их разрушение. Для этого создают пологий градиент «сидячих капель» (от данных условий кристаллизации до условий ближайшего подходя-

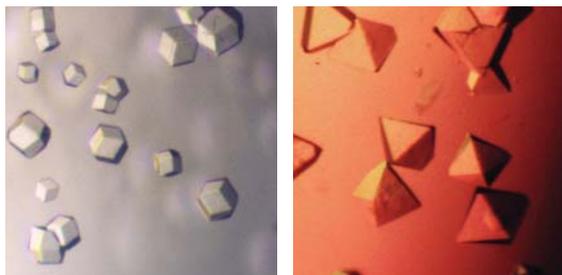


Рисунок 1. Кристаллы белка, выросшие в «висячей капле».

шего криопротектора), в которых полученные кристаллы последовательно вымачивают до тех пор, пока они не оказываются в 100% растворе криопротектора. После этого отдельные кристаллы вылавливают из капли с помощью специальной микропетли, замораживают в жидком этане, переносят в специальную пробирку и хранят в жидком азоте. Теперь кристаллы полностью готовы для следующего шага — рассеивания рентгеновских лучей и получения картины их дифракции.

Для успешного разрешения структуры белка, а именно получения фаз (solving phases), необходимо также выращивание кристаллов с тяжелыми атомами. Наиболее часто используемым для этого соединением является селенометионин, в котором атом серы замещен атомом селена. Для этого клетки, синтезирующие интересующий белок, выращивают в минимальной среде (M9), в которой единственным источником метионина является селено-метионин. В результате, рекомбинантный белок содержит тяжелые атомы селена в каждом своем метиониновом остатке, что в ходе разрешения структуры создает первые «пространственные ориентиры» и точки отсчета, по которым, как по цепочке, определяют остальные аминокислотные остатки молекулы белка.

Сбор данных рассеяния

Большинство современных кристаллографов используют синхротроны, которые являются одними из самых мощных в мире источников когерентного рентгеновского излучения. В отличие от стандартных рентгеновских аппаратов, где рентгеновское излучение получают за счет торможения электронного пучка о катодную пластинку, в синхротроне электроны постоянно циркулируют по замкнутому контуру (имеющему размеры от одного до сотен метров), излучая рентгеновские волны в местах преломления их траектории электромагнитами. Замороженный кристалл белка крепят на специальный при-

бор — гониометр, который позволяет контролировать углы его поворота с большой точностью, и помещают в струю жидкого азота под источник рентгеновского излучения. Получаемую в результате картину дифракции записывают при помощи прибора с зарядовой связью — CCD (coupled charge device) и отображают на экране компьютера в виде файла с графическим расширением.

Прогресс последнего десятилетия по части технологии детектирования картины рассеивания позволил сократить крайне трудоемкий процесс сбора данных от недель (и тысяч рентгеновских пленок) до часов, при этом все данные умещаются на одном магнитном носителе. Для анализа дифракционных данных существует большое количество разных компьютерных программ, большинство из которых написано для операционной системы UNIX. Информационный пакет HKL, содержащий в себе 3 программы: XdisplayF, обеспечивающую визуализацию картин дифракции; Denzo, проводящую анализ и объединение многочисленных слайдов; Scalepack, обеспечивающую их статистическую обработку. Этот информационный пакет относится к одному из самых массово используемых в современной кристаллографии. Анализ самой первой картины дифракции кристалла позволяет быстро определить все его основные параметры. К ним относятся: разрешение, от которого зависит, возможно ли будет увидеть отдельные аминокислоты на конечной структуре или же только элементы вторичной структуры; количество молекул белка в элементарной ячейке и ее размеры (unit cell); и тип расположения элементарных ячеек в кристалле (space group). Эта же программа просчитывает необходимое количество дифракционных картинок, которое нужно получить для полной оценки данной системы. После пропускания рентгеновского луча сквозь кристалл белка и фиксирования дифракционной

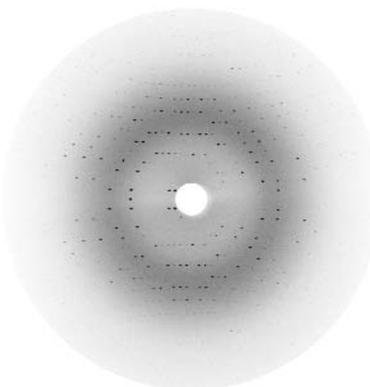


Рисунок 2. Типичная картина дифракции рентгеновских лучей, вызванная их пропусканием через кристалл белка.

картины последний поворачивают на один или на полградуса, и повторяют всю процедуру до тех пор, пока не будет охвачен весь необходимый спектр (обычно около 120–180°). Одновременно с записью картин дифракции происходит их статистическая обработка, в ходе которой все полученные сигналы анализируют и сравнивают с теоретически предсказанными. Весь процесс высокоавтоматизирован и, после изначальной установки тех или иных параметров, занимает всего несколько часов. Кроме обычных нативных кристаллов, для успешного разрешения фаз необходимо также собрать данные рассеивания селено-метиониновых кристаллов, что обычно делают при трех разных длинах волн.

Определение структуры белка

Данные, полученные из сотен дифракционных картин как нативных, так и Se-Met кристаллов, обрабатывают, переводят в цифровой формат и группируют с помощью программы Scalepack. Следующим шагом в определении структуры белка является нахождение пространственных координат атомов тяжелых металлов. Это достигается при помощи метода MAD (Multiple-wavelength anomalous dispersion), который оценивает возмущения обычной картины дифракции, вносимые сигналами от атомов селена. Программа, выполняющая эту функцию, называется Shake and Bake. После завершения работы она выдает пространственные координаты всех тяжелых атомов в элементарной ячейке кристалла. Другая программа — Mphare, применяя математическое преобразование, называемое трансформацией Фурье, строит пер-

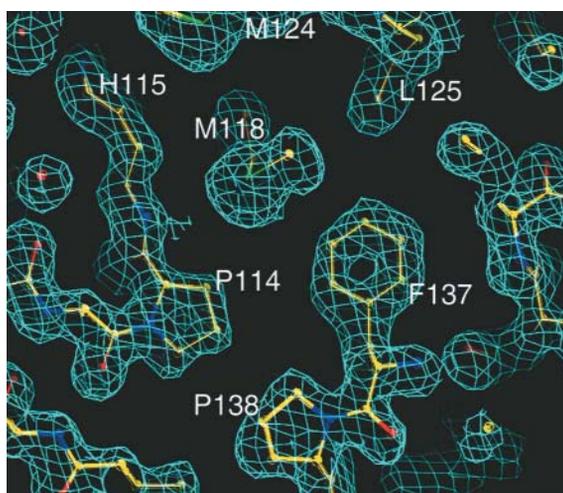


Рисунок 3. Улучшенная картина электронной плотности с наложенными на нее аминокислотными остатками.

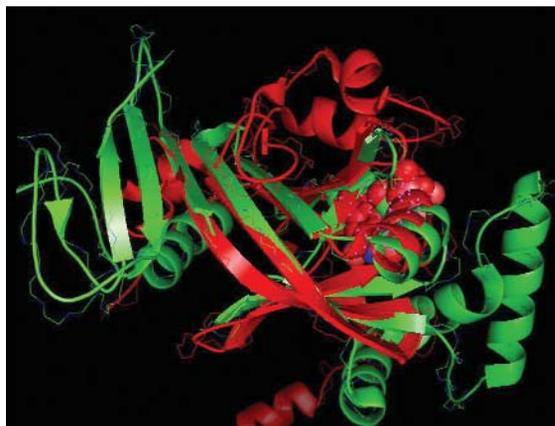


Рисунок 4. Трехмерная модель белка.

воначальную карту электронной плотности, используя картины дифракции кристалла под разными углами и координаты тяжелых атомов, полученные с помощью Shake and Bake. На этот процесс обычно уходит целый день. Эта карта часто содержит много шумов и позволяет увидеть лишь отдельные структурные мотивы. Существует большое количество программ (под Unix), обеспечивающих обработку и улучшение первоначальной электронной плотности. Одна из них называется Density Modification. После нее в общей картине уже можно рассмотреть отдельные аминокислоты и их группы. После ввода первичной последовательности белка и с помощью других программ компьютер автоматически строит первую модель, в которой он помещает известные аминокислоты в соответствующие им фрагменты электронной плотности. Процент успешного автоматического построения модели зависит в первую очередь от качества карты электронной плотности и, конечно же, ее разрешения. Это определяет время, которое придется затратить на построение и «доводку» модели вручную. Другая программа, появившаяся несколько лет назад и пользующаяся большой популярностью, называется Solve/Resolve. Она объединяет в себе функции Shake and Bake, Mphare Density Modification и обладает улучшенной автопостроительной функцией. Однако, как и в предыдущих случаях, очень многое зависит от качества изначальной карты электронной плотности. Построенная компьютером модель обычно состоит из разрозненных групп аминокислот, разнесенных в пространстве, и нуждается в окончательной доводке. Это осуществляется при помощи программы O, в которую загружают карту электронной плотности с наложенными на нее группами аминокислот. Эта программа позволяет вставлять, размещать в любой точке

пространства и вращать в трех измерениях все 20 аминокислот, соединяя, их друг с другом и строя из них элементы третичной структуры. Часто для этого используют специальные стереоочки, позволяющие видеть строящуюся модель в трехмерном изображении.

После построения окончательной модели определяют один из важнейших ее показателей Пи-фактор, характеризующий качество полученной модели и точность расположения в ней

аминокислотных остатков. Ну вот и все, на этом процесс разрешения структуры закончен! Полученную при помощи программы O модель сохраняют в виде файла, содержащего трехмерные координаты всех ее атомов. Наиболее распространенным, но не единственным, форматом для подобных файлов, является pdb. В таком виде все опубликованные структуры хранятся в базе данных GenBank, откуда их может бесплатно скачивать любой пользователь Интернета.

РНК-редактирование

Е. Мерзляк



Екатерина Мерзляк
14-й выпуск биокласса
(Вирусы), школа № 520
(1993 г.), закончила кафед-
ру молекулярной биологии
Биофака МГУ (1998 г.),
к.б.н., с 2004 г. работает в
биотехнологической фирме
«Евроген»*,
ekaterin99@mail.ru

Когда люди начинают изучать молекулярную биологию, то возникает ощущение, что по большому счету все уже открыто. Существует центральное положение, сформулированное Уотсоном и Криком, об однозначном переносе информации, закодированной в ДНК, на молекулу-переносчик — мРНК, после чего мРНК транслируется, и получается белок. Однако, как оказалось, эта схема не является столь однозначной и сильно усложнилась в последние годы.

Первым наблюдением, которое привело к изменению схемы ДНК → РНК → белок, можно считать открытие некодирующих последовательностей внутри кодирующих, т.е. открытие экзон-интронной структуры гена и, соответственно, явления РНК-сплайсинга. Далее необходимо отметить открытие РНК-редактирования, которое заключается во вставке и делеции уридилловых оснований в митохондриях простейших, относящихся к отряду Kinetoplastida. Оба этих наблюдения, по мнению самого Уотсона, принципиально изменили основную догму молекулярной биологии.

Еще одним удивительным открытием последних лет можно считать явление белкового сплайсинга, когда из пре-белка без участия каких-либо факторов вырезается определенный участок. По аналогии с РНК-сплайсингом, вырезаемые участки белка были названы инте-

ины, а те, которые сшиваются, — экстеины. Явление белкового сплайсинга было показано на дрожжах.

В этой статье я хочу рассказать о явлении РНК-редактирования. Оказалось, что РНК-редактирование отнюдь не уникальное явление и встречается практически во всех группах организмов. Стоит отметить, что на данный момент под термином «РНК-редактирование» понимают любое изменение мРНК по сравнению с ДНК, поэтому механизмы, которые лежат в основе этого процесса, разные. Редактированию подвергаются транскрипты, которые считываются как с ядерного, так и с пластидных (митохондриального и хлоропластных) геномов.

Значение процесса редактирования для жизнедеятельности организмов не подлежит сомнению. Так, в случае простейших, относящихся к семейству Trypanosomatidae, попытки вывести линии, у которых отсутствовали бы белки редактирующего комплекса, не увенчались успехом. Видимо, белки этого комплекса оказываются необходимыми для выживания и ничем не могут быть заменены.

Для насекомых РНК-редактирующие белки не столь жизненно необходимы. Мухи *Drosophila*, у которых полностью отсутствует фермент редактирующего комплекса dADAR, выживают. Однако у них наблюдаются серьезные расстройства нервной системы. Для 30-дневных мух характерно долгое пребывание в неактивном отдыхе, в периоды которого они лежат на спине. К 50-му дню у мух постоянно подняты крылья, часто встречаются асимметричные позы с одним поднятым крылом и ногой.

В большей части описанных примеров роль редактирования заключается в увеличении количества различных форм того или иного белка. Так, например, в гене *sacophony*, кодирующем белок кальциевого канала нервных клеток *Drosophila*, показано 10 сайтов редактирования. Таким образом, сочетание разных отредактированных сайтов может давать более 1000 различных белковых продуктов, и это не считая сплайсинга.

Однако роль редактирования не всегда столь однозначна. Так, известны примеры, когда этот процесс происходит в некодирующих областях: интронах, а также в 5'- и 3'-нетранслируемых регионах.

*В 1998–2002 гг. училась в аспирантуре и работала на кафедре молекулярной биологии Биофака МГУ. Кандидатская диссертация посвящена изучению редукции процесса редактирования у низших трипаносоматид. Сейчас занимается разработкой киназных сенсоров на основе зеленого флуоресцентного белка.

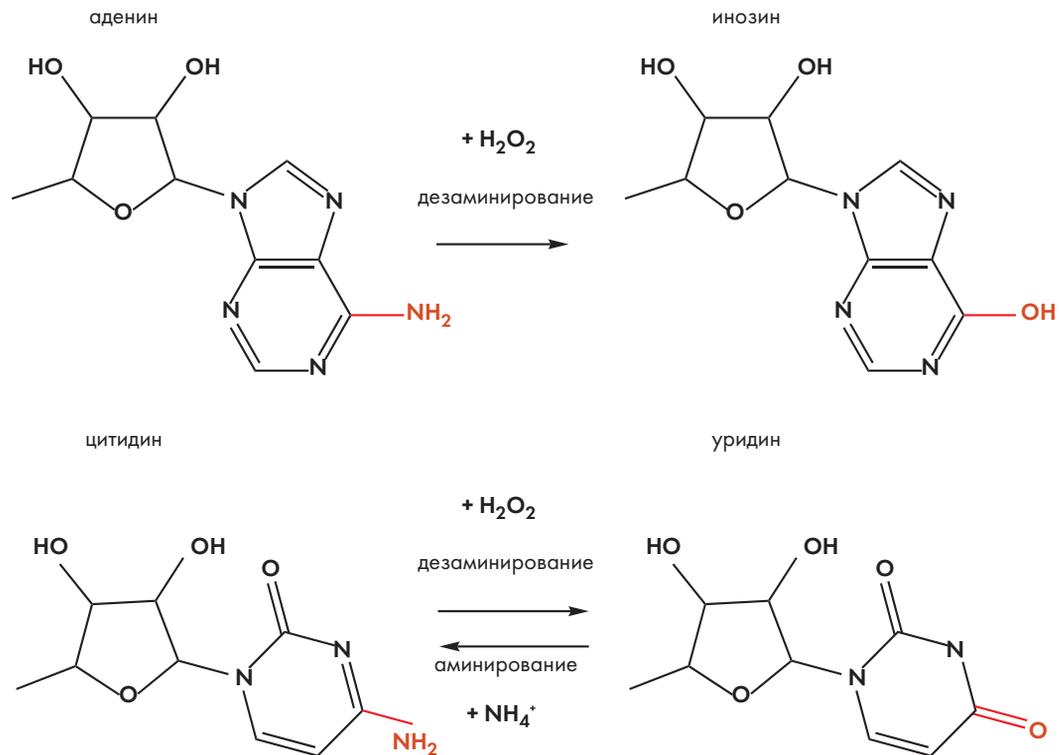


Рисунок 1. Схема реакций дезаминирования оснований мРНК, в результате которых под действием определенных ферментов аденин (А) превращается в инозин (И), а цитидин (С) — в уридин (У).

Разнообразие процесса редактирования

В настоящее время известно два основных типа редактирования.

1. Изменение нуклеотидного состава мРНК за счет модификации оснований во время или после транскрипции. В основном в этом случае речь идет о нуклеотидной конверсии. Например, в транскрипте белка — переносчика липидов аполипопротеина В (Аро-В) у млекопитающих происходит превращение цитидилового основания (С) в уридиловое (U) за счет удаления аминогруппы (дезаминирования); либо дезаминирование аденилового основания (А) приводит к появлению инозинового (I). При трансляции I в кодоне распознается как G (рисунок 1).

2. Изменение последовательности мРНК за счет вставки или вырезания определенного нуклеотида. Примером такого типа редактирования может быть вставка цитидиловых оснований (С) у миксомицета *Physarum polycephalum* или уридиловых оснований (U) у жгутиковых простейших, трапаносоматид. В данной группе общего механизма нет, в каждом случае за этот процесс отвечает своя группа ферментов.

Рассмотрим различные примеры, отражающие особенности процессов редактирования разного типа и их регуляторные функции.

Редактирование ядерных транскриптов

В ядрах клеток кишечника человека было показано сайт-специфическое дезаминирование мРНК аполипопротеина (Аро-В). Оказалось, что этот белок существует в двух формах и экспрессируется в двух типах тканей: «короткая» форма (Аро-В48) — в эпителиальных клетках кишечника, а «длинная» (Аро-В100) — в гепатоцитах. При этом, «короткая» форма является укороченной с С-конца производной «длинного» белка. При дезаминировании одного из цитидинов кодон САА, кодирующий аминокислотный глутаминовый остаток, превращается в UАА — стоп-кодон, останавливающий синтез белка на РНК-матрице. Аро-В48 входит в состав хиломикрон (хиломикроны — липопротеиновые комплексы, в составе которых жиры из эпителия тонкого кишечника через кровь попадают в организм). Хиломикроны на 90% состоят из триглицеридов. Аро-В100 входит в состав других липопротеиновых комплексов ЛОНП (липопротеины очень низкой плотности), которые секретирует печень в ответ на разные стимулы. Жировой состав этих частиц отличается от хиломикронов, ЛОНП на 50% состоит из холестерина и всего на 10% из триглицеридов. Таким образом, оба белка способны переносить триглицериды, а за связыва-

ние с холестерином отвечает именно С-конец белка, который отсутствует в случае Apo-B48.

В ядрах нейронов млекопитающих мРНК, кодирующая субъединицу глутаматного рецептора, также подвергаются редактированию. При этом глутаминовый кодон CAG превращается в аргининовый — CIG. Интересно отметить, что у пресноводных рыб изначально закодирован в геноме именно аргинин. У млекопитающих редактирование проходит не на 100%, поэтому рецептор состоит из комбинации отредактированных и неотредактированных субъединиц, — этим достигается различная чувствительность молекул рецептора к потоку ионов Ca^{2+} . И такое сочетание, по-видимому, необходимо для нормальной работы организма млекопитающего. Об этом говорит то, что мыши, у которых все рецепторы содержали в указанном положении глутамин, страдали ранней формой эпилепсии и быстро умирали.

С неправильной работой РНК-редактирующей системы могут быть связаны и заболевания человека. У людей, страдающих болезнью Альцгеймера, хореей Хантингтона и некоторыми формами шизофрении, показано практически полное отсутствие отредактированных мРНК этого гена.

Редактирование транскриптов органелл

Этот тип посттранскрипционного редактирования обнаружен в митохондриях и хлоропластах высших растений, при этом у семенных растений чаще встречается конверсия С в U, а у споровых как «С → U», так и «U → С» конверсии являются частыми и практически равновероятными. Обычно конверсии подвергается вторая позиция кодона. Описаны случаи, когда стоп-кодона внутри рамки считывания редактируются с образованием глутаминового или аргининового кодона, и белок в итоге получается длиннее. Чаще этот тип редактирования происходит в экзоне, хотя может быть и в интроне. Почти все митохондриальные гены подвергаются редактированию, и таких точек может насчитываться до 1000 в одном гене. В хлоропластах это явление более редкое — до 50 сайтов в одном гене. Редактирование найдено даже в мутантных хлоропластах ячменя, в которых почти полностью отсутствуют рибосомы. Эти данные могут свидетельствовать о том, что все белки, участвующие в редактировании, приходят из цитоплазмы, и, следовательно, имеют ядерное кодирование. Таким образом, этот процесс, происходящий в данном случае в полуавтономной в генетическом отношении

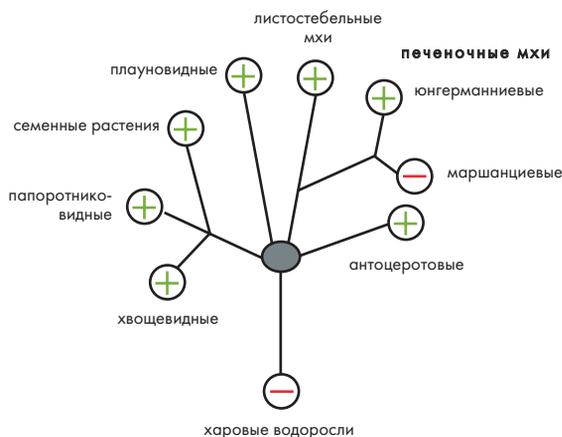


Рисунок 2. Наличие редактирования в разных группах Plantae.

(+) — наличие редактирования в этой группе, (-) — отсутствие редактирования, соотнесенные с филогенетическим деревом. Заштрихованный овал обозначает узел, в котором появилось редактирование. Однако, видно, что у одной из групп мхов — маршанцида — редактирование отсутствует.

клеточной органелле — хлоропласте, находится под контролем ядерного генома. Редактирование в растениях происходит, видимо, по-разному в разных органоидах. Когда митохондриальную мРНК с потенциальными сайтами редактирования удалось ввести в хлоропласты тех же растений, превращения нуклеотидов не произошло.

Интересен пример возможной роли редактирования в регуляции транскрипции хлоропластного генома табака. Нуклеотидная замена С на U в мРНК приводит к аминокислотной замене серина на лейцин в α -субъединице РНК-полимеразы (groA). Причем, в хлоропластах других растений, а также в геноме эубактерий, на этом месте закодирован именно лейцин.

Исследование роли индивидуальных аминокислот α -субъединицы РНК-полимеразы бактерии *E. coli* показало, что расположение лейцина в этой позиции важно для активации транскрипции из-за его связи с белками — регуляторами транскрипции. При анализе транскриптов было показано, что 70% из них отредактированы. Предполагается, что существует два типа альтернативных белков, причем белки, полученные с неотредактированной матрицы, не способны связываться с регуляторными белками, в отличие от белка, в котором замена произошла.

Считается, что у растений количество сайтов редактирования в хлоропластных генах обратно пропорционально эволюционной продвинутости организмов. Так, для хлоропластного гена, кодирующего β субъединицу АТФазы *atpb*, число сайтов редактирования уменьшается в ряду: мох *Anthoceros formosae* (29 сайтов), папоротник *Angiopteris* (3 сайта), сосна *Pinus*



Рисунок 3. Фотография мазка крови носителя *Trypanosoma cruzi*.

(1 сайт); а у покрытосеменных растений сайты редактирования полностью отсутствует. Аналогичная тенденция наблюдается и при анализе митохондриальных транскриптов, однако она не столь значительна. Предполагают, что процесс редактирования возник в хлоропластах и митохондриях растений, вышедших на сушу (так как он отсутствует у зеленой водоросли *Chara*), а далее постепенно редуцировался до полного исчезновения у покрытосеменных (см. рисунок 2).

РНК-редактирование у трипаносоматид

Одной из самых интригующих систем, где РНК-редактирование играет чуть ли не основную роль в реализации митохондриального генома, является группа паразитических простейших, относящаяся к отряду Kinetoplastida, включающего и семейство Trypanosomatidae. У этих организмов процесс редактирования заключается в посттранскрипционной вставке, либо в вырезании уридилловых остатков из пре-мРНК.

Жгутиковые простейшие, относящиеся к семейству Trypanosomatidae, являются возбудителями тяжелых заболеваний человека (например сонная болезнь, болезнь Чагаса и кожные и висцеральные лейшманиозы), скота и растений (рисунок 3), переносчиком являются насекомые (в частности сонную болезнь переносит муха цеце, болезнь Чагаса клопы рода *Triatoma*).

Первый пример такого типа модификации митохондриальной РНК был описан Бенне в 1986 г. (Benne, 1986). Этот процесс был открыт при изучении структуры митохондриального генома (кинетопластной ДНК=кпДНК) трипаносоматид крайне велик и виден при цитологическом окрашивании красителями на ДНК даже в световом микроскопе. На электронной микрофотографии видно, какую большую часть митохондрии занимает кпДНК (рисунок 4). Четко выраженное скопление ДНК в определенном месте митохондрии (кинетопласте) является характерным для всего отряда Kinetoplastida.

Кинетопластная ДНК этих простейших состоит из двух типов молекул ДНК макси-

(20–40 т.п.о. (тысяч пар оснований)) и миниколец (0,45–8 т.п.о.). Количество этих молекул отличается на порядки: 20–50 максиколец и до 10^3 – 10^4 миниколец. Эти молекулы образуют плотную сеть.

В начале 1980-х гг. при попытке определить первичную структуру максикольца *Trypanosoma brucei* не было показано ни одной открытой рамки считывания, которая не прерывалась бы стоп-кодонами (это значит, что ни один нормальный белок с такой мРНК считываться не мог). Это показалось крайне странным обстоятельством, так как к этому времени было известно, что митохондриальная ДНК обычно кодирует белки дыхательной цепи. При тщательном изучении этих последовательностей было обнаружено, что для восстановления открытой рамки считывания в гене цитохром-оксидазы II-ой субъединицы (СОII) необходима вставка 4-х уридилловых остатков (U). Это и явилось первым указанием на существование столь необычного процесса — уридилового редактирования. Далее было показано, что практически для всех митохондриальных генов, для 12 из 18 в случае *Trypanosoma brucei*, необходима вставка, либо делеция U. Число таких сайтов в одном гене может достигать нескольких десятков, а количество таких U может составлять несколько сотен. По характеру редактирования митохондриальные гены у разных трипаносоматид могут быть разделены на 3 типа: полностью или пан-редактируемые, частично редактируемые (чаще всего редактирование у таких генов подвергается 5'-концевая область) и нередатируемые гены. Считается, что у более поздно дивергировавших видов процесс редактирования затрагивает все меньшее количество генов, а в максикольце закодированы гены, соответствующие отредактированным транскриптам. Это ситуация схожа с уменьшением редактируемых сайтов в хлоропластном и митохондриальном геномах растений (см. выше).

Многими авторами были предприняты попытки описания механизма процесса уридилового редактирования. Одними из первых поя-



Рисунок 4. Электронная микрофотография митохондрии *Trypanosoma sp.* кпДНК — кинетопластная ДНК, плотная сеть, образованная сцепленными максиколецевыми молекулами ДНК. К митохондрии плотно подходит базальное тело жгутика.

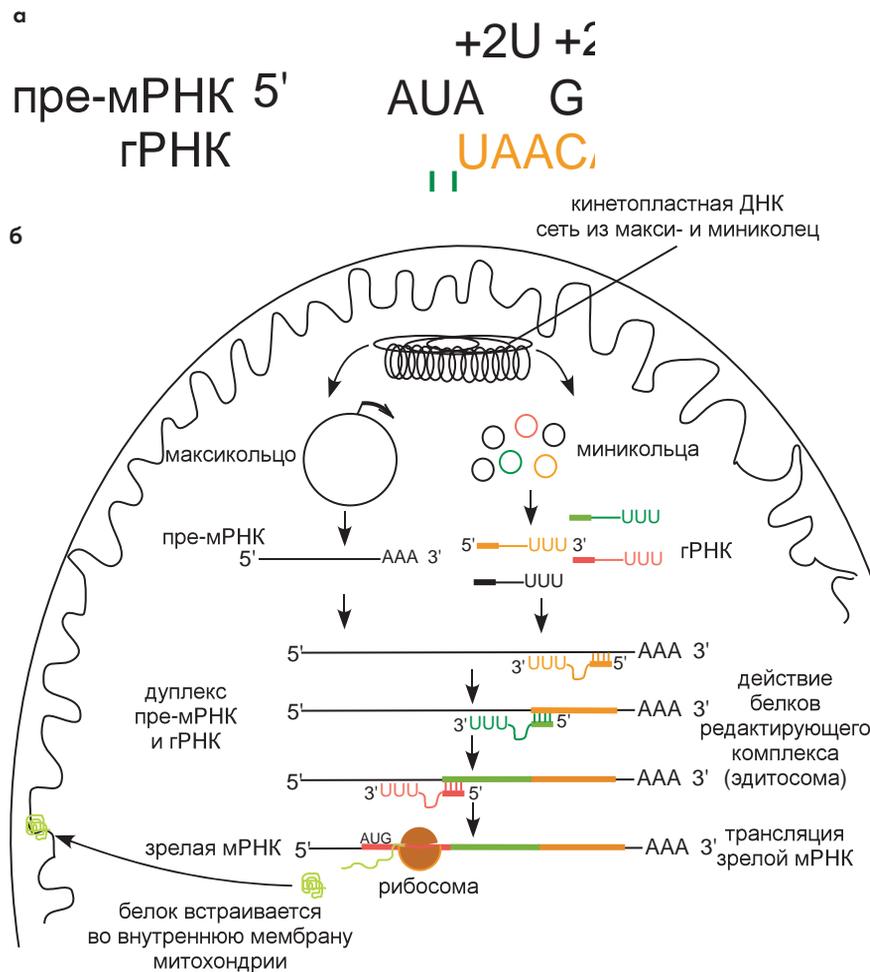


Рисунок 5. (а) — Схема строения гРНК. (б) — Схема РНК-редактирования у трипаносоматид (по Madison-Antenucci *et al.*, 2002).

Сверху представлена кпДНК (сеть молекул ДНК: мини- и максикольца). Максикольца являются матрицей для пре-мРНК, собственно подвергающиеся редактированию, миникольца — гРНК, которые являются матрицей для этого процесса.

вились свидетельства о $3' \rightarrow 5'$ направленности этого процесса по пре-мРНК, а также существовании матрицы, которая определяет место (сайт) редактирования, где произойдет вставка/делеция U. Такого рода матрицами оказались малые РНК митохондриального кодирования, так называемые гидовые РНК (гРНК). Размер этих молекул составляет 50–80 нуклеотидов. Это открытие определило функцию миниколец, которая до этого оставалась неясной. Именно в них оказалось закодировано большинство гРНК, необходимых для редактирования (рисунок 5а,б).

В структуре гРНК можно выделить три элемента (от 5'- к 3'- концу): якорный конец (20 нуклеотидов), который полностью комплементарен участку пре-мРНК, собственно редактирующий домен (35–40 нуклеотидов) и поли-U хвост (4–15 нуклеотидов). Поли-U хвост не закодирован в ДНК, а добавляется за счет работы ТУТазы (терминальной уридил трансферазы), аналогично тому, как добавляется поли-A хвост к мРНК у эукариот (рисунок 5а).

До последнего времени оставался открытым вопрос о механизме процесса редактирования у

трипаносоматид. Однако недавно удалось реконструировать этот процесс *in vitro*. Уридиловое редактирование включает в себя поэтапное действие трех ферментов. Его можно представить в виде схемы, показанной на рисунке 6. Для чего же нужен столь сложный механизм восстановления кодирующей последовательности? На данном этапе нет однозначного мнения, однако существует теория, объясняющая существование этого явления. Она заключается в том, что редактирование является регуляторным механизмом, позволяющим адаптивно менять метаболизм паразитов в зависимости от окружающих условий. В данном случае идет регуляция клеточного дыхания. Следует напомнить, что речь идет о восстановлении кодирующей последовательности мРНК митохондриальных генов. В своем жизненном цикле эти простейшие сменяют двух хозяев и должны иметь по крайней мере две программы, обеспечивающие различный уровень обмена веществ в зависимости от того, в каком хозяине он пребывает. В клетках крови млекопитающих, где вынуждены существовать кровяные паразиты, дыхательная цепь паразита отключена, а необходимую для жизне-

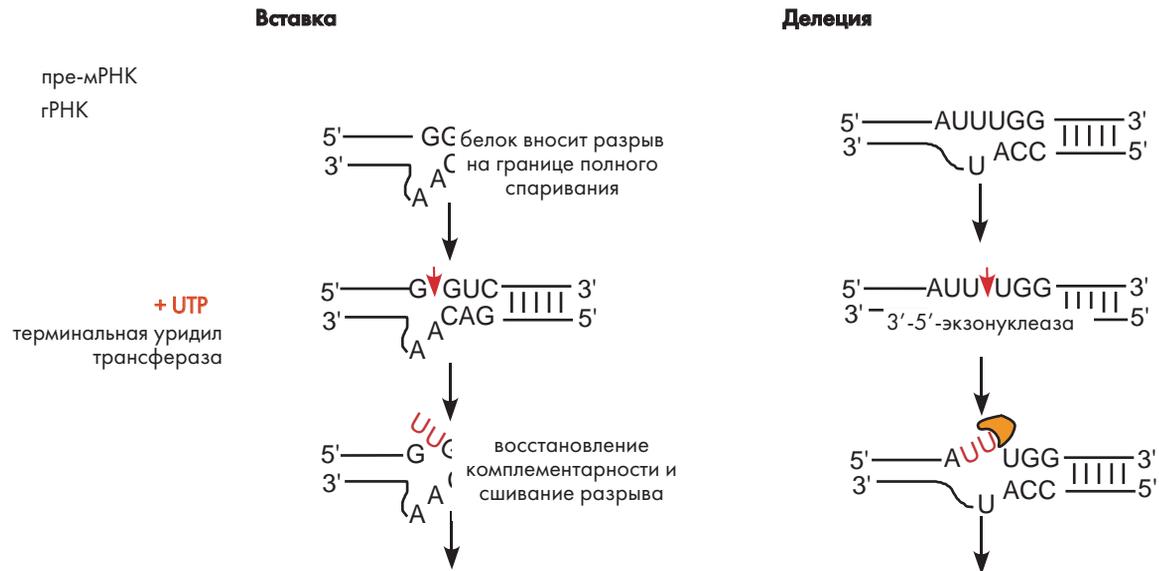


Рисунок 6. Схема редактирования — модель ферментативного каскада (по Madison-Антелуцци *et al.*, 2002).

Пре-мРНК изображена в каждом отдельном рисунке сверху, гРНК — внизу. В обоих случаях и во вставке и в делеции по окончании дуплекса эндонуклеаза вносит разрыв в пре-мРНК. Далее под действием TUTазы или экзонуклеазы происходит достройка либо отрезание U до восстановления комплементарности в дуплексе. На третьем этапе происходит сшивание разрыва в пре-мРНК. После этого последовательность событий может повториться снова до тех пор, пока вся пре-мРНК не будет полностью отредактирована.

деятельности энергию вырабатывает специальный органоид, описанный только у этих простейших, — гликосома. Процесс гликолиза не очень эффективен по сравнению с дыханием, но избыток в крови глюкозы делает его достаточным для обеспечения потребностей клетки. Редактирование — процесс достаточно «дорогой» для клетки, так как для его осуществления, как мы знаем, нужен целый комплекс белков и гРНК. В клетках эпителия кишечника насекомых, наоборот, глюкозы мало, и дыхательная цепь в митохондриях паразита активно работает. Другой фактор, который может участвовать в переключении метаболизма паразита, — это кислород. Возможно, в клетках крови происходит конкуренция за кислород между хозяйской клеткой и паразитом. Известно, что недостаток кислорода может ингибировать дыхательную цепь. В клетках эпителия кишечника насекомых, наоборот, кислорода достаточно, и дыхание протекает активно. Белки редактирующего комплекса имеют ядерное кодирование, таким образом, регуляция (наличие или отсутствие отредактированных мРНК) находится под контролем ядра.

Еще одной возможной функцией редактирования может быть формирование отредактированных мРНК с различной аминокислотной последовательностью. Такие транскрипты нам удалось идентифицировать при анализе кДНК гена 6-й субъединицы АТФазы (А6). Этот ген

тоже закодирован в митохондриях и подвергается частичному 5'-концевому редактированию. Для получения полноразмерной отредактированной мРНК необходимо три гРНК. Было показано, что существуют по крайней мере две разные мРНК с различной последовательностью 5'-конца, отредактированные разными гРНК. Возможно, белковые продукты таких матриц обладают различной способностью встраиваться в митохондриальную мембрану.

В качестве заключения надо отметить, что в молекулярной биологии есть несколько «любимых» объектов, которые активно изучают тысячи разных лабораторий по всему миру. Это, конечно, прежде всего, человек, мышь, мухи рода *Drosophila* и круглый червь *Caenorhabditis elegans*. Всему остальному разнообразию животного мира посвящено крайне мало работ. Столь односторонний подход в выборе объекта исследования часто оказывается не слишком продуктивным и сильно сужает наши представления о разнообразии процессов, которые могут протекать в клетке. Приведенный выше пример является хорошим тому подтверждением. Явление, обнаруженное на трипаносомах и поначалу представлявшееся странным исключением, оказалось широко распространенным и важным в жизни многих организмов, включая человека. Вероятно, еще много серьезных открытий будет сделано при изучении редких объектов, в частности простейших.