

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОМЕНТА ПЕРЕХОДА ОРГАНИЗМА ИЗ ОДНОГО ПЕРИОДА РАЗВИТИЯ В ДРУГОЙ ПО КОЛИЧЕСТВУ ФУНКЦИОНАЛЬНО ИЗМЕНЕННЫХ КЛЕТОК

© И. П. Шабалкин, П. И. Шабалкин

ГУ Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Исследовано несколько стадий раннего развития морской звезды *Asterias rubens* (средняя и поздняя бластула, ранняя и поздняя гастрюла, ранняя личинка), различающихся между собой по морфологическим признакам. На каждой стадии развития *A. rubens* анализировали изменение состава клеточных популяций с помощью метода количественной оценки функционального состояния генома клетки, основанном на цитофотометрическом анализе популяции клеток при окраске ядер по Фельгену и нафтоловым желтым S. В качестве критерия оценки функционального состояния клетки использован показатель КФАГЕН — коэффициент функциональной активности генома клетки, который выведен из отношения гистон/ДНК после определения оптической плотности окрашенного двумя хроматофорами ядра клетки. Установлено, что в момент перехода организма из стадии поздней бластулы в стадию ранней гастрюлы различия по величине значений КФАГЕН между стадиями развития статистически достоверны. При этом сравнение гистограмм распределения клеток показало, что в популяции клеток на стадии ранней гастрюлы присутствуют 33 % клеток, которые по уровню функциональной активности своего генома отличаются от популяции клеток поздней бластулы. Точно так же переход организма из стадии поздней гастрюлы в стадию личинки сопровождается статистически достоверным различием по КФАГЕН между этими стадиями. Установлено, что биологическая система переходит в качественно новое состояние, если количество элементов этой системы изменяется (увеличивается или уменьшается относительно стандартной точки отсчета: норма, предыдущее состояние системы и т. д.) не менее чем на $1/3$.

Ключевые слова: стадия, развитие, переход, бластула, гастрюла, личинка, ДНК, гистон.

Одной из главных проблем естествознания является поиск общего для всей природы количественного критерия, определяющего переход любой многокомпонентной системы из одного качественного состояния в другое, в силу того что «пороговые механизмы свойственны всем процессам, протекающим в мире» (Моисеев, 1987). Поскольку организм — это одна из систем природы, он, как и все в природе, должен функционировать согласно всеобщему закону развития объективного мира — закону «перехода количественных изменений в качественные». В соответствии с последним изменение качества объекта происходит тогда, когда накопление количественных изменений достигает определенного предела. Достигнув определенной пороговой величины (так называемой границы меры), количественные изменения объекта приводят к перестройке его структуры, в результате чего образуется качественно новая система со своими закономерностями развития и структурой. Закон устанавливает и обратную зависимость: качественные изменения ведут к количественным изменениям.

Принимая во внимание, что «единый процесс развития охватывает неживую природу, живое вещество и общество» (Моисеев, 1987), а также учитывая, что закон перехода количества в качество опирается на количественную зависимость между явлениями, мы полагаем, что получить доказательства существования (по крайней

мере для биологической системы) количественного показателя перехода системы из одного в качественно другое состояние становится возможным, если рассматривать многоклеточный организм как сообщество, состоящее из потомков одной материнской клетки (зиготы), отличающихся друг от друга только по уровню функциональной активности их генома, так как от работы генов зависит функциональное состояние клеточной популяции. В этом случае необходимо знать как минимум два параметра: 1) критерий функционального состояния; 2) количество клеток, которые к моменту перехода отклонились по функциональному состоянию от популяции клеток до перехода.

Исходя из этих соображений была поставлена задача определить с помощью методов количественной гистохимии порог перехода биологической системы из одной стадии развития в другую.

Материал и методика

Объектом исследования были выбраны зародыши морской звезды *Asterias rubens*, полученные с Беломорской биологической станции МГУ. Использование для изучения эмбрионов *A. rubens* было продиктовано возможностью легкого и точного определения по морфоло-

гическим признакам различий между этими стадиями (Гилберт, 1993). Изучены следующие стадии раннего развития морской звезды.

1. Средняя бластула. Дробящиеся эмбрионы неподвижны, поскольку на поверхности бластомеров еще нет сформированных ресничек.

2. Поздняя бластула. Эмбрионы подвижны и крутятся в оболочке за счет биения ресничек на поверхности бластомеров.

3. Ранняя гастрюла. На вегетативном полюсе отчетливо видно начало инвагинации архентерона (первичной кишки).

4. Поздняя гастрюла. От архентерона отщуровываются целломические мешки.

5. Личинка. Сформированные питающиеся зародыши с прорванным ротовым отверстием.

Всех зародышей фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, приготовленном на морской воде. На каждый срок фиксации брали по 6—8 зародышей. Перед гистологической обработкой эмбрион разрушали, осторожно надавливая на покровное стекло пинцетом, для того чтобы все клетки лежали в одной плоскости. В каждом эмбрионе анализировали 100 клеток. Таким образом, на каждый срок фиксации приходилось 600—800 проанализированных клеток. Гистологическую обработку препаратов осуществляли по общепринятым методикам (Пирс, 1962; Шабалкин, 1998). Был использован метод количественной оценки функциональной активности генома клетки (Шабалкин, 1998). Метод основан на цитофотометрическом анализе популяции клеток при окраске ядер по Фельгену (окраска на ДНК) и нафтоловым желтым S (окраска на гистоны). В качестве критерия оценки функционального состояния клетки предложен показатель $K_{\text{ФАГЕН}}$ — коэффициент функциональной активности генома клетки, который выведен из отношения гистон/ДНК после определения оптической плотности окрашенного ядра. В силу того что материальной основой генома служит ДНК-белковый комплекс, где ДНК является носителем генетической информации, а белки (в частности, гистоны) выполняют различные структурно-регуляторные функции (Георгиев, 1989; Ostashevsky, 1995), коэффициент $K_{\text{ФАГЕН}}$ дает возможность изучить количественный состав популяции клеток, находящихся по функциональной активности своего генома в том или ином состоянии. Анализировали функциональное состояние популяций на основе сравнения гистограмм распределения клеток в зависимости от значений $K_{\text{ФАГЕН}}$ в I—IV группах сравнения (см. таблицу).

Для оценки степени отклонения одной исследуемой популяции относительно другой по количеству клеток с конкретной, т. е. экспериментально найденной величиной $K_{\text{ФАГЕН}}$, был использован показатель C , выраженный в процентах. Показатель C складывается из суммы показателей (C_1 и C_2), где C_1 — доля клеток одной популяции с конкретными величинами $K_{\text{ФАГЕН}}$, которая превышает долю клеток другой популяции в одних и тех же разрядах гистограммы последней, C_2 — доля клеток одной популяции, величины $K_{\text{ФАГЕН}}$ которых не имеет аналогичных значений в пределах гистограммы другой популяции.

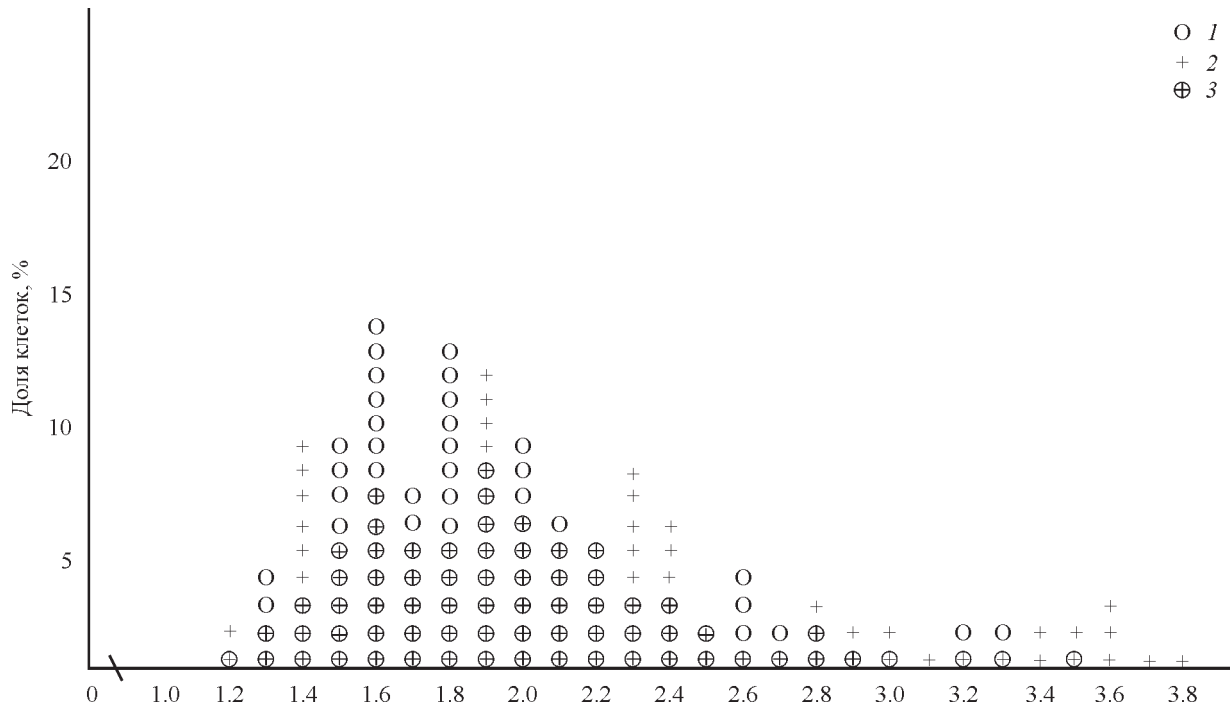
Все измерения проводили на микроспектрофотометре «Универ» (Австрия) при длинах волн 575 (количественная оценка ДНК) и 445 (оценка количества гистонов) нм. Для статистического анализа материала использовали t -критерий Стьюдента ($P \leq 0.05$).

Результаты и обсуждение

Полученные результаты представлены в таблице и на рисунке. Из экспериментальных данных следует, что различие по величине значений $K_{\text{ФАГЕН}}$ при сравнении раннего и последующего этапов развития организма статистически достоверно во II и IV группах сравнения. Как видно из данных таблицы, для этих групп сравнения нулевая гипотеза отвергается, так как верхний доверительный интервал меньшей средней арифметической не достигает половины нижнего доверительного интервала большей средней арифметической (Урбах, 1963; Автандилов, 1980). Анализ гистограмм, построенных по полученным значениям $K_{\text{ФАГЕН}}$, показал, что только во II и IV группах сравнения общий показатель C равен или превышает 33 %. Данный факт прямо указывает на то, что процесс перехода зародышей морской звезды из одной стадии развития в другую сопровождается отклонением от предыдущей стадии по уровню функциональной активности генома не менее чем $1/3$ клеток. При этом переход на новую стадию развития обусловлен, как правило, появлением большого количества клеток со значениями $K_{\text{ФАГЕН}}$, соответствующими клеткам предыдущей стадии развития с достаточно высокой степенью дифференцировки (см. рисунок). При этом из гистограмм распределения клеток по величине $K_{\text{ФАГЕН}}$ зародышей морской звезды на стадиях поздней гастрюлы и ранней личинки (см. рисунок) можно видеть, что пределы гистограммы, соответствующей клеточной популяции зародышей на стадии поздней гастрюлы, находятся в интервале между величинами значений $K_{\text{ФАГЕН}}$ 1.2—3.5. В пределах этих значений имеются клетки, принадлежащие популяции зародышей на стадии личинки. Хотя последние и соответствуют по своим значениям $K_{\text{ФАГЕН}}$ клеткам популяции зародышей на стадии поздней гастрюлы, но доля их в одних и тех же разрядах изучаемой гистограммы превышает долю клеток популяции зародышей на стадии поздней гастрюлы на 29 %. Эта величина и будет соответствовать показателю C_1 . В то же время, как можно видеть на рисунке, гистограмма распределения клеток популяции, соответствующей зародышам на стадии личинки, включает в себя в пределах 3.6—3.8 значений $K_{\text{ФАГЕН}}$ 5 % клеток, которые отсутствуют в пределах значений $K_{\text{ФАГЕН}}$ гистограммы, характеризующей популяцию клеток зародышей на стадии поздней гастрюлы. Другими словами, доля клеток в 5 % соответствует показателю C_2 . Отсюда величина суммарного значения C будет равна 34 % ($29 + 5 = 34$).

Динамика изменения величины $K_{\text{ФАГЕН}}$ и показателя C в процессе перехода зародышей *Asterias rubens* к новому этапу или стадии развития

Номер группы	Группа сравнения	$K_{\text{ФАГЕН}}$	C , %
I	Средняя бластула	1.55 (1.49 ± 1.61)	20
	Поздняя бластула	1.59 (1.53 ± 1.65)	
II	Поздняя бластула	1.59 (1.53 ± 1.65)	33
	Ранняя гастрюла	1.85 (1.77 ± 1.93)	
III	Ранняя гастрюла	1.85 (1.77 ± 1.93)	29
	Поздняя гастрюла	1.95 (1.85 ± 2.05)	
IV	Поздняя гастрюла	1.95 (1.85 ± 2.05)	34
	Ранняя личинка	2.15 (2.01 ± 2.29)	



Гистограммы распределения клеток по величине $K_{ФАГЕН}$ у зародышей *Asterias rubens* на стадиях поздней гастролы и ранней личинки.

По оси абсцисс — значения $K_{ФАГЕН}$; по оси ординат — частота распределения клеток с определенным значением $K_{ФАГЕН}$, выраженная в % от общего числа проанализированных клеток. 1 — клетки на стадии поздней гастролы, 2 — клетки на стадии ранней личинки, 3 — величины значений $K_{ФАГЕН}$ клеток совпадают. Гистограммы построены по усредненным данным.

Все вышеизложенное указывает на то, что в ходе развития порог перехода популяции в качественно новое состояние определяется интервалом времени, в течение которого в популяции должно быть накоплено на предыдущей стадии не менее $1/3$ функционально активных клеток, необходимых организму на раннем этапе новой стадии развития.

Представленные результаты нашли свое подтверждение в литературных данных. Так, Яковлев (1979), изучая функциональное состояние популяции гепатоцитов после частичной гепатэктомии (ЧГЭ), нашел, что в ответ на ЧГЭ в популяции гепатоцитов появляются клетки, которые берут на себя всю функциональную нагрузку, приходящуюся на печень. Эта часть (30—35 %) паренхимных клеток задерживается на границе периода трансформации и периода G_1 до тех пор, пока в популяции не будет накоплено эквивалентное количество новых гепатоцитов. Эти результаты свидетельствуют о том, что переход популяции гепатоцитов в качественное новое состояние, отражающее процесс регенерации печени, определяется интервалом времени, в течение которого в популяции должно быть накоплено не менее $1/3$ клеток, которые участвуют в восстановлении функций печени до уровня, близкого к функциональному состоянию гепатоцитов интактной, т. е. неоперированной, печени.

Шабалкин и соавторы (1999) также указывают на то, что количество клеток, определяющих после ЧГЭ момент перехода популяции в качественно новое состояние в системе интактная—регенерирующая печень, соответствует появлению $1/3$ гепатоцитов с измененной функциональной активностью их генома. Особый интерес представляют исследования, полученные в области патофизиологии. При изучении патофизиологии нервной сис-

темы (Свердлов, 2000) установлено, что в основе одной из болезней (тяжелой миастении), связанной с нарушением нервных механизмов управления движениями, лежит снижение числа ацетилхолиновых рецепторов до $1/3$ от нормального на мембране концевых пластинок волокон скелетных мышц. Снижение числа ацетилхолиновых рецепторов влечет за собой уменьшение потенциала концевой пластинки, который может оказаться ниже порогового для возбуждения мышечного волокна. Увеличение числа таких волокон и обуславливает феномен быстрого мышечного утомления при миастении. Показано (Борзенков, 2004), что приживление трансплантата роговицы достигается при условии, если концентрация АТФ в эндотелии роговичного трансплантата более 30 усл. %.

Изучение функционального состояния клеточных популяций при доброкачественной и злокачественной формах патологии толстой кишки человека показало, что переход популяции клеток в качественное новое состояние (норма → раковая опухоль; доброкачественный полип → раковая опухоль) сопровождается изменением функционального состояния генома не менее чем $1/3$ клеток популяции (Шабалкин и др., 2002).

В другой работе (Шабалкин и др., 1999) было установлено, что у детей, больных острым лимфобластным лейкозом, но находящихся в момент обследования в состоянии ремиссии, наступлению рецидива предшествуют изменения в качественном составе популяции клеток костного мозга. За 3—13 мес до клинического проявления рецидива морфологическим методом (т. е. по доле бластных клеток) в популяции костного мозга больного число клеток, отклоняющихся от нормы по уровню функциональной активности генома, превышало 33 % (показатель С), причем если показатель С был меньше 33 %,

это означало, что больной находился в состоянии ремиссии на протяжении всего срока наблюдений (4 года).

Исходя из полученных данных Шабалкин и соавторы (1999) высказывают гипотезу, согласно которой любая биосистема переходит в качественное новое состояние, если количество элементов этой системы изменяется (увеличивается или уменьшается относительно стандартной точки отсчета: норма, предыдущее состояние системы и т. д.) не менее чем на $1/3$.

Исследования на экспериментальных моделях растущих опухолей (Шабалкин и др., 2000) также указывают на то, что найденный эмпирически 33%-ный показатель является мерой перехода системы из одного качественного состояния в другое. Дополнительным аргументом в пользу выдвинутой гипотезы служат данные, полученные из области молекулярной биологии и физико-химии полимеров. При изучении структуры ДНК установлено, что конформационные изменения природных ДНК зависят от содержания ГЦ-пар и относительной влажности (Pilet, Brahms, 1972). При высокой относительной влажности (95 %) существует только В-форма, при низкой относительной влажности она переходит в А-форму, причем для этого должно выполняться дополнительное условие — содержание ГЦ-пар должно быть выше 30 %. При изучении физико-химических свойств жидкокристаллических полимеров холестерического типа обнаружено, что структура холестерической мезофазы сополимеров зависит от концентрации холестерических звеньев (Фрейдзон, Шибаяев, 1988). Введение небольшого количества звеньев в нематический полимер, индуцируя спиральную надмолекулярную структуру, не меняет характера расположения боковых мезогенных групп (жестких фрагментов, входящих в состав полимера). Однако при увеличении доли звеньев более чем на 30 % характер упаковки мезогенных групп меняется. На рентгенограммах сополимеров, содержащих более 30 % звеньев, в области малых углов рассеяния появляются рефлексы, указывающие на формирование элементов слоевого порядка, т. е. упаковки звеньев в виде слоистой структуры. В свете существующих представлений о полимерной молекуле ДНК как жидком кристалле данные Фрейдзона и Шибаяева (1988) являются чрезвычайно интересными, так как ассоциируются с возможной схемой образования надмолекулярной структуры ДНК.

Все вышеизложенное, включая и наши экспериментальные данные, указывает на то, что найденный эмпирически 33%-ный показатель является мерой перехода системы из одного качественного состояния в другое.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам кафедры эмбриологии Биологического факультета МГУ М. Л. Семенову и Н. В. Кошелевой за предоставление материала для исследований.

Список литературы

- Автандилов Г. Г. 1980. Введение в количественную патологическую морфологию. М.: Медицина. 220 с.
- Борзенко С. А. 2004. Адреналиновый тест — новый скрининговый неинвазивный способ определения жизнеспособности трансплантатов донорской роговицы. В кн.: III Рос. конгр. по патофизиологии: Тез. докл. М. 220—221.
- Георгиев Г. П. 1989. Гены высших организмов и их экспрессия. М.: Наука. 351 с.
- Гилберт С. 1993. Биология развития. М.: Наука. 320 с.
- Моисеев Н. Н. 1987. Алгоритмы развития. М.: Наука. 303 с.
- Пирс Э. 1962. Гистохимия. М.: Изд-во иностр. лит-ры. 420 с.
- Свердлов Ю. С. 2000. Патофизиология нервной системы. В кн.: Патологическая физиология. М. 115—180.
- Урбах В. Ю. 1963. Математическая статистика для биологов и медиков. М.: Наука. 321 с.
- Фрейдзон Я. С., Шибаяев В. П. 1988. Жидкокристаллические полимеры холестерического типа. В кн.: Жидкокристаллические полимеры. М.: Наука. 245—291.
- Шабалкин И. П. 1998. Использование величины отношения гистон/ДНК в качестве критерия оценки функциональной активности генома клетки. Цитология. 40 (1): 106—115.
- Шабалкин И. П., Мазуров С. Т., Шабалкин П. И., Минаев В. И., Ягубов А. С., Мамонтов С. Г. 2002. Характеристика функционального состояния клеточной популяции при доброкачественной и злокачественной формах эпителиальных новообразований толстой кишки. Вестн. РГМУ. № 5 (26): 68—72.
- Шабалкин И. П., Минаев В. И., Шабалкин П. И., Ягубов А. С. 2000. Нарушение системных связей в организме при канцерогенезе. Докл. РАН. 375 (3): 404—409.
- Шабалкин И. П., Ягубов А. С., Мамонтов С. Г., Шабалкин П. И. 1999. Роль количественного фактора в изменении функционального состояния популяции при нормальном и опухолевом росте. Докл. РАН. 365 (4): 561—567.
- Яковлев А. Ю. 1979. Динамическое резервирование гепатоцитов — механизм обеспечения специализированных функций регенерирующей печени. Цитология. 21 (11): 1243—1252.
- Ostashevsky J. Y. 1995. Changes in chromatin loop conformation due to histone removal. J. Cell. Biochem. 216 (Suppl.): 171.
- Pilet J., Brahms J. 1972. Dependence of B—A conformational change in DNA on base composition. Nature New Biol. 236: 99—100.

Поступила 11 III 2005

QUANTITY OF FUNCTIONALLY CHANGED CELLS AS AN IDENTIFICATOR OF THE MOMENT OF THE ORGANIZMUS TRANSFER TO THE NEXT PERIOD OF DEVELOPMENT

I. P. Shabalkin, P. I. Shabalkin

Cancer Research Center RAMS, Moscow

As «the threshold gears are peculiar to all processes which are flowing past in the world», the problem of looking up of quantitative criterion determining transition of a biological system from one condition to another, is one of the main problems of natural sciences. For analysis of the given problem we investigated some stages

of forwardness of marine aster *Asterias rubens* (mean and late blastula, early and late gastrula, early larva), distinguishing among themselves by morphological characters. Change of structure of cell populations at each stage of development *A. rubens* analyzed with the help of method of quantitative assessment of functional condition of cells genome (Шабалкин, 1988). The method is based on cytophotometry analysis of cell populations coloured by Feulgen (quantifying of DNA in cell) and Naftol yellow S (quantifying of histones in a cell). As the criterion of estimation of functional condition of the cell was used the parameter C_{FAGEN} , coefficient of functional activity of cell genome deduced from histone/DNA ratio after estimation of the absorbency of the nucleus coloured by two chromophores. The data obtained showed that at the moment of organism transition from one stage of development (late blastula) to another (early gastrula) the difference in C_{FAGEN} values between these stages was statistically authentic. Thus comparison of cell distribution histograms has show that cell population conforming to the early gastrula contains 33 % cells with the level of genome functional activity that differs from this one in the cell population conforming to the late blastula. Just in the same moment, the transition of an organism from the stage of late gastrula to the stage of larva is accompanied by statistically authentic distinction in C_{FAGEN} between these stages and availability of more than 1/3 cells (34 %) of the population at the larva stage showing genome functional activity different from that at the late gastrula stage. Thus, it is established, that the biological system passes to qualitatively new condition, if quantity of members of this system changes (increaser or decreases comparatively to a standard point of reference: the norm, previous system status and etc.) not less than on 1/3.

Key words: stage, development, transition, blastula, gastrula, larva, DNA, histone.
