

Проблемы биотехнологии в свете сравнительно-эмбриологического анализа раннего развития млекопитающих

Н.Ю. Сахарова

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

Возврат яйцеклеток млекопитающих к олиголецитальности определяет резкие различия между ранним развитием млекопитающих и других амниот. Полное асинхронное дробление, расположение потомков двух первых бластомеров крест-накрест, интерфазные перемещения бластомеров, длительное сохранение ими тотипотентности – все это позволяет сравнивать самый ранний период онтогенеза млекопитающих с дроблением низших позвоночных, а именно гидромедуз (Мечников, 1886). В обеих группах животных дробление приводит к образованию морулы, которая у гидромедуз преобразуется в выходящую из оболочки оплодотворения планулу – свободно живущую личинку, а у млекопитающих – в бластоцисту, которая также выходит из оболочки оплодотворения (*z. pelucida*) и имплантируется в ткани матки, что позволяет считать бластоцисту паразитической личинкой млекопитающих, имеющей высокоспециализированные приспособления к питанию за счет материнского организма. Анализ имеющихся в литературе данных (Mintz, 1970; Markert, Petters, 1978 и др.) позволяет считать, что последующее развитие нового эмбриона происходит за счет имеющихся в теле личинки эмбриональных клеток и представляет собой аналог полиэмбрионии и педогенеза, характерных для развития некоторых высших паразитических насекомых. Косвенным подтверждением этой аналогии служит тот факт, что такое явление, как хромосомный (или геномный) импринтинг, характерен только для двух групп животных – млекопитающих и высших насекомых, использующих для размножения педогенез. Сопоставление раннего развития млекопитающих, низших многоклеточных и насекомых позволяет считать, что важной особенностью яйцеклетки млекопитающих является ее потенциальная способность, давать начало не одному, а нескольким организмам, используя принцип полиэмбрионии, как на самых ранних стадиях дробления, так и на стадии бластоцисты.

Ключевые слова: яйцеклетка, бластомеры, асинхронное дробление, сравнительная эмбриология.

Современная биомедицина, одним из направлений которой являются поиски и развитие экспериментальных биомоделей для исследования возможности лечения различных, в том числе и генетических, болезней человека, использует методы биологического и математического моделирования самых разнообразных процессов, идущих в живом организме от субатомных до многосистемных уровней (Каркищенко, 2005). Эта наука должна опираться на фундаментальные биологические исследования. Всё выше сказанное актуально для решения такой важной проблемы, как клонирование млекопитающих и получение

эмбриональных стволовых (ЭС) клеток человека. Для успешного решения этих проблем необходимо глубокое понимание особенностей раннего развития млекопитающих (Сахарова, Чайлахян, 2003). За последние годы были получены многочисленные экспериментальные данные, открывающие такие особенности развития млекопитающих, которые поставили перед учеными не только новые научные, но и нравственные вопросы (Clarke, 1986; Davies, 1986; McLaren, 1986, 1987; Andersen, 1987; Курило, 2000; Alexandre, 2001).

Один из таких вопросов, на который и сегодня нет окончательного ответа: что

собой представляет оплодотворенная яйцеклетка млекопитающих до того момента, как она имплантируется в ткани матки? Является ли она таким же эмбрионом, как оплодотворенная яйцеклетка лягушки (Davies, 1986; Anderson, 1987), или пре-эмбрионом (McLaren, 1987), или ооцитом, в котором процессы оогенеза продолжают-ся и после оплодотворения (O'Farrell et al., 2004)? Сложность интерпретации детально изученных фактов связана с рядом особенностей самых ранних стадий, сопровождающих оплодотворение (Сахарова, 2004). Другой вопрос, который имеет непосредственное отношение к проблемам биотехнологии, можно сформулировать следующим образом: что такое бластоциста — конечная стадия предимплантационного периода, на которой отбираются клетки-предшественники ЭС клеток? Для ответа на эти вопросы, по-видимому, бесполезно провести анализ событий, происходящих в яйцеклетке млекопитающих после её оплодотворения и сравнить их с тем, что происходит в других группах животных.

Яйцеклетки млекопитающих характеризуются почти полным отсутствием желтка, т. е., они вторично алецитальны, и это определяет особенности их эмбрионального развития, резко отличающегося от развития других *Amniota*, обладающих полителеллециальными яйцеклетками. Небольшое количество желтка выталкивается при первых делениях дробления и образующиеся бластомеры полностью его лишены. Яйцеклетки не обладают ясно выраженной полярностью, они претерпевают полное, асинхронное дробление. Деление одного из двух первых бластомеров идет в меридиональной плоскости, а другого — в экваториальной. Бластомеры длительно сохраняют тотипотентность и способны к интерфазным перемещениям (Белоусов, 1980; Гилберт, 1993). Эти характеристики не позволяют сопоставлять раннее развитие млекопитающих с таковым не только высших,

но и низших позвоночных. В то же время раннее развитие млекопитающих в значительной степени напоминает развитие низших многоклеточных, а именно метазоических гидромедуз, детально изученное еще И.И.Мечниковым в 1886 г. Их яйцеклетки не проявляют строгой полярности, многие из гидромедуз характеризуются анархическим дроблением, которому сопутствуют повороты и переориентировки бластомеров. Бластомеры проявляют высокую тотипотентность и при разделении способны дать начало развитию новых особей (Захваткин А., 1949). Всё это полностью соответствует описанию событий, происходящих в раннем развитии млекопитающих (Иванова-Казас, 1995).

В результате дробления и у гидромедуз и у млекопитающих формируется плотный комок клеток — морула, которая у гидромедуз преобразуется в планулу, выходящую из оболочки и представляющую собой свободно живущую личинку. У млекопитающих морула преобразуется в бластоцисту, имеющую вид полого шарика, стенка которого (трофобласт) состоит из одного слоя крупных вытянутых клеток. Внутри находится небольшое скопление мелких клеток, так называемая внутренняя клеточная масса (ВКМ), которая прикреплена к наружной стенке.

Алецитальность яйцеклеток у абсолютного большинства животных связана с наличием в их последующем развитии личиночной стадии. Логично предположить, что возврат к алецитальности у млекопитающих должен сопровождаться восстановлением в их развитии и личиночной стадии. Действительно, если руководствоваться основным определением эмбриологии как науки, изучающей развитие особи *et bryo*, т.е. в оболочке, то следует признать высказывавшееся ранее мнение (Дабагян, устн. сообщ., 1977) о том, что собственно эмбриональное развитие заканчивается выходом бластоцисты из оболочки оплодотворения, *z. pellucida*.

С учетом ее дальнейшей судьбы, бластоцисту следует рассматривать как *паразитическую личинку*, обладающую высокоспециализированным приспособлением для развития в теле хозяина, каковым является материнский организм. Трофобласт, участвующий в образовании плаценты, полностью обеспечивает её питанием.

Как хорошо известно, в ВКМ после имплантации бластоцисты в ткани матки наблюдаются типично эмбриологические процессы — происходит образование двух клеточных слоев, гипо- и эпибласта; последний формирует тело эмбриона, развитие которого идет аналогично развитию эмбрионов других *Amniota*. Это дает основание считать, что в бластоцисте (личинке млекопитающих) образовался новый эмбрион. Явление развития в личинке новых эмбрионов хорошо известно в эмбриологии и носит название полиэмбрионии. В этом случае внутри личинки образуются новые организмы, за счет определенных клеток, находящихся среди других соматических клеток. Полиэмбриония присуща некоторым паразитическим насекомым из перепончатокрылых (высшие насекомые). У них в результате дробления олиголецитальной яйцеклетки формируется личинка, которая представляет собой плотный комок клеток, окруженный трофамнионом, с помощью которого из тела хозяина поступает питание. Расположенные среди личиночных клеток, группы эмбриональных клеток размножаются и дают начало новым личинкам. Близко к полиэмбрионии стоит такое явление как педогенез, при котором находящиеся в теле личинки яйцеклетки дают начало новым эмбрионам. В частности такое размножение характерно для галлиц рода *Miastor* (Захваткин Ю., 1975; Бей-Биенко, 1980).

В случае млекопитающих, если считать бластоцисту аналогом паразитической личинки насекомых, можно предположить, что клеточный состав ВКМ неоднороден: среди клеток, составляющих тело

личинки, т. е. ВКМ, должна быть группа клеток, способная дать начало новому эмбриону. С этим предположением полностью согласуются результаты опытов по исследованию развития химерных зародышей, созданных из генетически различающихся бластомеров (Mintz, 1970; Markert, Petters, 1978). Согласно этим исследованиям, большая часть клеток ВКМ бластоцисты никогда не участвует в формировании взрослого организма, и в образовании зародыша участвуют всего три (или несколько больше) бластомера бластоцисты (Гилберт, 1993), то есть, говоря другими словами, начало рождающемуся организму могут дать лишь 3-4 клетки из всего состава ВКМ. По-видимому, в бластоцисте может быть несколько групп таких эмбриональных клеток, что, как один из вариантов, приводит к образованию однойяйцовых близнецов. Хорошо известен факт постоянного рождения у одного из видов броненосца четырех детенышей одного пола. Дальнейшее изучение этого феномена показало, что это происходит благодаря тому, что все 4 зародыша развиваются из одной бластоцисты, следовательно, в бластоцисте броненосцев существует 4 группы клеток, дающие начало 4 эмбрионам (Пэттен, 1959).

Таким образом, дробление млекопитающих несет признаки, сближающие его с дроблением низших беспозвоночных, а формирование паразитической личинки, дающей начало новым эмбрионам с помощью процесса, сочетающего в себе черты полиэмбрионии (наличие в теле личинки эмбриональных клеток) и педогенеза (развитие в теле личинки новых эмбрионов), показывает удивительное сходство с развитием некоторых паразитических насекомых. Выявленные аналогии развития могут быть иллюстрацией параллелизма в неродственных группах животных (Светлов, 1965). В то же время обнаруженные единые молекулярно-генетические механизмы формирования аналогичных орга-

нов у неродственных групп животных (Гилберт и др., 1997) позволяют предположить, что это сходство носит более глубокий характер.

В связи с этим следует обратить внимание на тот факт, что такое явление как геномный (или хромосомный) импринтинг обнаружен лишь в двух группах животных — у некоторых высших насекомых и у млекопитающих (Lyon, Rastan, 1984). У последних он определяет не только биологические, например, невозможность партеногенеза (Surani, Barton, 1983, McGrath, Solter, 1984 и др.), но и социальные (такие как умственные и характерологические) признаки (Pagel, 1999). Можно предположить, что возникновение геномного импринтинга у млекопитающих, отсутствующего у их прямых предков, связано с появлением личиночной формы развития.

Сходство некоторых фаз раннего онтогенеза млекопитающих и других, совершенно неродственных им животных согласуется с представлением об эволюции как комбинации неких «блоков». По этой гипотезе, имеющей исторические корни, в эволюции неоднократно используются различные сочетания ограниченного количества структурных и функциональных блоков, и по-видимому, именно блочность эволюции типов оказывается их основным свойством (Чайковский, 2003).

По-видимому, раннее развитие млекопитающих носит «блочный» характер, соединив в себе механизмы и стадии, сходные с таковыми у животных самых разных таксономических групп, не всегда связанных непосредственным родством с млекопитающими. Получив вторично алецитальность, яйцеклетка млекопитающих повторяет особенности дробления, характерные для самых низших многоклеточных. В этот процесс включаются новые элементы, присущие только развитию млекопитающих. Замедленное деление в период дробления послужило одной из

предпосылок гипотезы о том, что оплодотворенная яйцеклетка продолжает оогенез и формирует клетки-кормилки, аналогично тому, что происходит в оогенезе насекомых. Аналогом клеток-кормилок рассматривается трофобласт бластоцисты (O'Farrell et al., 2004). Однако можно дать другое объяснение этому загадочному явлению, связав его с такой особенностью раннего развития млекопитающих, как перемещения ранних бластомеров относительно друг друга.

Оказалось, что первое определение того, какие бластомеры дадут начало клеткам ВКМ бластоцисты, сформировавшим будущий взрослый организм, происходит на стадии 4 бластомеров (Tarkowski et al., 2001). Так как на этой стадии каждый из 4 бластомеров, будучи изолированным, способен развиваться в полноценный организм, можно предположить, что определение судьбы каждого из бластомеров, составляющих единый зародыш, зависит от его положения в целом и от взаимодействия с другими бластомерами в ходе их перемещений. По-видимому, длительные клеточные циклы и дают возможность для тех сложных межклеточных взаимодействий, которые определяют дальнейшее развитие и конкретную судьбу бластомеров.

Бластоциста, наряду со сходством с паразитической личинкой насекомых, несет черты, присущие только млекопитающим, и прежде всего то, что в качестве хозяина ею используется не животное другого вида а материнский организм. Эмбриональные клетки, находящиеся в теле личинки млекопитающих, дают начало не личинке следующего поколения, а новому эмбриону. Развитие его идет аналогично развитию эмбрионов других Amniota, в частности птиц, используя сходный механизм гастрюляции, образования осевых органов и т.д.

Представление о существовании личиночной стадии в онтогенезе млекопитающих позволяет объединить в единую схе-

му все, как казалось, противоречивые данные, полученные в ходе экспериментальных исследований и наблюдений за ранним развитием млекопитающих. Дискуссия по поводу классификации ранних стадий развития млекопитающих привела к тому, что в настоящее время большинство исследователей поддерживают точку зрения, по которой в *раннем пренатальном онтогенезе млекопитающих, в том числе и человека, существует два эмбриона* (Johnson and Selwood, 1996). Первый — *conceptus* — образуется при дроблении оплодотворенной яйцеклетки, второй — *embryo proper* — формируется из внутренних клеток бластоцисты. Многие исследователи пытаются установить связь между этими различными эмбрионами, занимаясь поисками половых детерминантов, закономерностей билатеральной симметрии обоих зародышей и т.д. (Zernicka-Goetz, 1998; Piotrowska, Zernicka-Goetz, 2002; Gardner, Davies, 2003). Однако во всех этих исследованиях не дается определения того, что же такое бластоциста — промежуточное специализированное образование, являющееся результатом развития одного эмбриона и дающее начало другому. Если это «продукт оплодотворенной яйцеклетки, большая часть которого дифференцируется в ткани, защищающие и питающие» (McLaren, 1986), то по всем своим характеристикам *бластоциста соответствует личинке, в которой из соматических клеток путем полиэмбрионии развивается новый эмбрион*. Такое представление переводит поиски механизмов его формирования из эмбриологии в биологию бесполого размножения, разновидностью которого и является полиэмбриония (Токин, 1987).

Экспериментальным подтверждением приведенных выше рассуждений могут служить результаты опытов по использованию ЭС клеток, т.е. истинно соматических, для создания зародышей (*embryo proper*), способных к развитию в полно-

ценных, фертильных взрослых особей. Такие зародыши были образованы из ЭС клеток, полученных как из ВКМ бластоцисты (Nagy et al., 1993), так и из клеток морулы и бластомеров более ранних стадий дробления (Tesar, 2005). Последний автор делает акцент на том, что «эти исследования поднимают интересный вопрос о том, обладают ли ЭС клетки, полученные от эмбрионов разных преимплантационных стадий, одинаковым потенциалом развития». Это еще раз подчеркивает, что понимание особенностей раннего развития млекопитающих помимо теоретического имеет в настоящее время и большое практическое значение в связи с разнообразными биотехнологическими работами, такими, как клонирование, криоконсервация эмбрионов и культивирование ЭС клеток. Особое внимание следует обратить на полиэмбрионию — показателя неустойчивой клеточной организации (Захваткин А., 1949). Она характерна как для самых ранних стадий дробления, когда проявляется как способность отдельных бластомеров дать начало полноценному организму (Гилберт, 1993), так и на стадии бластоцисты, когда лишь определенные клетки личинки способны развиваться в новый эмбрион. Следовательно, одним из специфических свойств яйцеклетки млекопитающих следует признать ее потенциальную способность давать начало не одному, а нескольким организмам, но подходы к манипуляциям с эмбриональными клетками должны учитывать особенности каждой стадии развития.

Литература

- Бей-Биенко Г.Я. Общая энтомология. М.: Высшая школа. 1980.
- Белюсов Л.В. Введение в общую эмбриологию. Изд. МГУ. 1980.
- Гилберт С. Биология развития. Т.1. М.: Мир. 1993
- Гилберт С.Ф., Опиц Д.М., Рэф Р.А. Новый синтез эволюционной биологии и биологии развития//Онтогенез. Т. 28. С.325-343. 1997.

- Дабагян Н.В.* Занятия малого практикума по эмбриологии на биофаке. Изд. МГУ. 1977.
- Захваткин А.А.* Сравнительная эмбриология низших беспозвоночных. М.: Сов. наука. 1949.
- Захваткин Ю.А.* Эмбриология насекомых. М.: Высшая школа. 1975.
- Иванова-Казас О.М.* Эволюционная эмбриология животных. СПб., 1995
- Пэттен Б.М.* Эмбриология человека. М.: Медгиз. 1959.
- Каркищенко Н.Н.* Концептуальное пространство и топологические структуры биомедицины. Биомедицина. 2005. № 1. С. 5-16
- Курило Л.Ф.* Некоторые этические вопросы технологии эмбриональных стволовых клеток // Проблемы репродукции. 2000. № 3. С. 1-6.
- Манк М.В.* Биология млекопитающих / Пер. с англ. 1990. Эмбрионы, гены и их эволюция. М.: Мир". 1986.
- Сахарова Н.Ю.* Млекопитающие: эмбрион в личинке // Природа. № 5. 2004. С.28-38.
- Сахарова Н.Ю., Чайлахян Л.М.* Некоторые теоретические вопросы клонирования в свете сравнительного анализа раннего развития млекопитающих // Докл. Акад. наук РФ. 2003. Т.393. № 3. С.426-429.
- Токин Б.П.* Общая эмбриология. М.: Высшая школа. 1987.
- Светлов П.Г.* Факты и теория параллелизма. Конф., посв. пам. проф. В.Н.Беклемишева. Москва, 1965.
- Чайковский Ю.В.* Эволюция. М.: Центр систематических исследований, 2003
- Alexandre H.* A history of mammalian embryological research // Int. J. Dev. Biol. 2001. V. 45. P. 457-467.
- Gardner R.L., Davies T.J.* The basis and significance of pre-patterning in mammals // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2003. V. 358. P. 1331-8.
- Lyon M.F., Rastan S.* Parental source of chromosomal imprinting and its relevance for Xchromosoma inactivation // Differentiation. V. 26. P. 63-67.1984.
- Markert S.L., Petters R.M.* Manufactured hexaparental mice show that adults are derived from three embryonic cells // Science. V. 202. P. 56-58. 1978.
- McGrath J., Solter D.* Completion of mouse embryogenesis requires both maternal and parental genomes // Cell. V. 37. P. 179-183. 1984.
- Mintz B.* Gene expression in allophenic mice// Control mechanisms in the expression of cellular phenotypes. P.15-43./ Ed. Padykula H.A. Acad.Press. N-Y,L. 1970.
- Nagy A., Rossant J., Nagy R., Abramow-Newerly W., Roder R.* Derivation of completely cell culture derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P.8424-8428.
- Pagel M.* Mother and father in surprise genetic agreement// Nature. V.397. P.19-20. 1999.
- Piotrowska K., Zernicka-Goetz M.* Early patterning of the mouse embryo - contributions of sperm and egg// Development. 2002. V.129.№24. P.5803-13.
- Surani M.A.H., Barton S.M.* Development of gynogenetic eggs in the mouse:Implications for parthenogenetic embryos // Science. V. 222. P. 1034-1036. 1983.
- Tarkowski A.K., Ozdenski W. Czolowska R.* How many blastomeres of the 4-cell embryo contribute cells to the mouse body // Int. J. Dev. Biol. 2001 V. 45. P. 811-816.
- Tesar P.J.* Derivation of germ-line-competent embryonic stem cells lines from preblastocyst mouse embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005. V. 105.P. 8239-8244.
- Zernicka-Goetz M.* Fertile offspring derived from mammalian eggs lacking either animal or vegetal poles // Development. 1998. V. 125. No. 23. P. 4803-8.

THE PROBLEMS OF BIOTECHNOLOGY IN THE CONTENT OF COMPARATIVE EMBRYOLOGY ANALYSIS OF EARLY MAMMALIAN DEVELOPMENT

N.Yu. Sakharova

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino

Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

Mammalian oocyte reversion to oligolethality defines differences between the early development of mammals and other Amniota. The absence of definite egg polarization, full asynchronous cleavage, cross-position of two first blastomere descendants, interphase movement of blastomeres and their prolonged totipotency – all those allow us to compare the earliest period of mammalian development with the cleavage period of lower Metazoa, Hydrozoa (Mechnikov, 1886). In both groups of animals the cleavage results in formation of morula, which in Hydrozoa transforms into planula. It leaves fertilisation envelope and becomes the free-living larva. In mammals the morula turns into blastocyst, which also leaves the envelope (zona pellucida) and is implanted into uterus. It allows us to consider the blastocyst as a "parasite" larva of mammals, whose very specialized mechanisms are perfectly adopted to receive nourishment from mother's organism. The analysis of published data (Mintz, 1970, Markert, Petters, 1978 and others) enables us to think that the subsequent development of a new embryo is provided by embryonic cells that are in larva body and that is obviously analogous to polyembryony and pedogenesis being very characteristic for the development of some high insects. Indirect support for this analogy is the existence of chromosomal or genetic imprinting only in two groups of animals – mammals and some of high insects, particularly for *Miastor*. In the living cycle of this insect there is the phase of larva using the process of pedogenesis for reproduction.

Comparison of early development of mammals, lower Metazoa and high insect permit us to focus attention on high potential ability of mammalian egg cells to form not one but several organisms using polyembryonal principle both on early stages of cleavage and on the blastocyst stage.

Key words: oocyte, asynchronous cleavage, blastomeres