

## Подход к экспериментальному изучению функции генома клетки

Б. Л. Переверзев

*БОРИС ЛЕОНИДОВИЧ ПЕРЕВЕРЗЕВ — доктор медицинских наук, врач-онколог Онкологического диспансера № 2 (Москва). Область научных интересов: биофизика, количественная цитохимия, биологическое приборостроение.*

*125130 Москва, Старопетровский пр., д. 6, Онкологический диспансер № 2, тел. (095)150-15-19.*

Предпринята попытка разобраться в причинах отсутствия решающих успехов в теоретической онкологии. Обращено внимание на нечеткость формулировки цели научных исследований, допускающую разную трактовку понятия «клетка». Изложены принципы, на которых строится новая методология изучения клетки как непостоянного во времени живого объекта. В новых условиях становятся реальными прогнозы сроков решения проблемы рака. Экспериментальная реализация «новой» методологии привела к выводам, имеющим общее биологическое значение.

Средства массовой информации не так давно объявили о крупной победе биологов — ученые США расшифровали нуклеотидную последовательность ДНК генома человека. Решена часть глобальной проблемы исследования структуры и функции генома человека. Исследования в рамках этой проблемы дают ключ к раскрытию механизмов реализации генетической информации, что является необходимым условием для последующего управления биологическими процессами.

Что касается структуры генома, то здесь ситуация более или менее ясная. Сложнее обстоят дела с изучением функции генома клетки в целом. Вот, что по этому поводу пишет известный специалист по молекулярной биологии Б.М. Медников [1]: «Изучение структуры генома зашло в тупик: это направление работает на себя»..... «В молекулярной биологии до сих пор живы представления той наивной поры, когда казалось, что постигнув структуру, мы поймем и функцию»..... «Повидимому, изучить функцию можно, только изучая функцию, а отнюдь не структуру. Более того, только поняв принципы функционирования геномов, мы сможем объяснить удивительные различия в их структуре; обратный подход убедительно показал свою беспомощность и бесперспективность. Короче, мы поймем структуру из функции, а не функцию из структуры».

Для введения в тему, обозначенную названием статьи, напомним некоторые важные моменты на пути развития биологии. Так, в 1865 году выдающийся чешский естествоиспытатель Г. Мендель установил числовые соотношения, раскрывающие закономерность наследования признаков родителей в ряду поколений. История этого крупнейшего научного открытия, положившего начало современной биологии, общеизвестна. Важно подчеркнуть, что в ту пору Г. Мендель был преподавателем физики и что установленные им числовые соотношения явились первыми биологическими константами. Другое крупное событие — внедрение академиком Н.М. Эмануэлем в биологию и медицину методов химической кинетики (1957—84 гг.). В обоих случаях в науку о живом была привнесена непривычная для биологов и медиков методология, базирующаяся на математике. Сейчас ни у кого не вызывает сомнений в по-

лезности математики для развития биологии и медицины, но подобное признание в значительной степени формально. Подлинная методология несет в себе своеобразную логику мышления и ориентирование на новые научные ценности. А это всегда конфликт и необходимо время, чтобы всем стало ясно, что речь идет о событиях, определяющих веки развития науки в целом. Так было с открытием Г. Менделя. Непросто было и с признанием работ Н.М. Эмануэля. Мне довелось работать в коллективе, руководимом Н. М. Эмануэлем. По моему мнению, нам удалось реализовать некоторые его идеи в поисках подходов к решению ряда сложнейших проблем клеточной биологии.

На сегодня современная наука не располагает общепризнанными рациональными подходами к изучению механизмов превращения нормальных клеток в злокачественные (основная проблема теоретической онкологии), механизмов клеточной дифференцировки (центральная проблема биологии развития), к экспериментальному изучению функции генома клетки в целом (часть глобальной проблемы исследования структуры и функции генома клетки).

В период с 1966 по 1993 гг. В Институте химической физики АН СССР была выполнена серия работ в области количественной цитохимии нуклеиновых кислот нормальных и злокачественных клеток [2—7]. В результате была установлена связь между биологическими свойствами клеток и формой двумерных распределений клеточных популяций, охарактеризованных содержанием ДНК и РНК в каждой клетке — графические зависимости в координатах «содержание ДНК—содержание РНК», выраженных в единичных нормированных весовых единицах [8—10]. Форма двумерных распределений оказалась разной для клеток разного типа и постоянной для клеток определенного типа независимо от вида экспериментального животного. Это позволяет интерпретировать полученные данные. Мы считаем, что через анализ формы двумерных распределений открываются возможности для изучения закономерностей функционирования генома клетки во взаимосвязи с основными проявлениями ее жизнедеятельности [11—14], причем законы, определяющие клеточную дифференцировку и перерождение нормальных клеток в злокачественные оказываются производными на пути решения глобальной проблемы исследования работы генома клетки в целом. По сути речь идет о формировании новой методологии исследования кинетики внутриклеточных процессов.

Наши работы были начаты с традиционной для медико-биологической науки целью — сравнить цитохимические особенности нормальных и раковых клеток с тем, чтобы попытаться найти различия между ними и затем полученные сведения использовать для диагностических и иных нужд. На первом этапе исследований нам

предстояло сопоставить содержание ДНК в нормальных клетках и их злокачественных аналогах. К тому времени подобные работы уже проводились и было известно, что в нормальных клетках содержание ДНК меняется в зависимости от фазы клеточного цикла — от 2с до 4с ДНК (1с — содержание ДНК в половой клетке, величина постоянная для вида). Было также известно, что в злокачественных клетках все сложнее. Нас не удовлетворяли подходы предшественников по целому ряду причин и прежде всего по причине, связанной с тем, какой смысл обычно вкладывается в понятие «нормальная и злокачественная клетка». Размышления на эту тему проходили одновременно с освоением и развитием методов количественной цитохимии.

В начале 1970-х годов (когда мы приступали к своим исследованиям) количественная цитохимия делала свои первые шаги и исследователей вдохновляли открывающиеся возможности работы с отдельными клетками. Стандартный подход к сравнению нормальных и злокачественных клеток был очевиден — надо было измерить ДНК в отдельных клетках, выделенных из здоровых тканей животных, а затем сравнить их с данными, полученными на злокачественных аналогах. Учитывали при этом средние показатели либо гистограммы, отражающие частоту встречаемости клеток с разным содержанием ДНК. От исследователя требовалось лишь правильно интерпретировать данные, что не всегда просто сделать, так как измеряемые массы ДНК составляют около  $1 \cdot 10^{-14}$  г.

Было ясно, что содержание ДНК в группах клеток зависит не только от природы клеток, но и от того, с какой интенсивностью происходит их размножение: в обычной клеточной популяции большинство клеток, свыше 80%, находится в фазе пролиферативного покоя, и содержание в них ДНК характеризуется величиной 2с, после вступления клеток в фазу синтеза количество ДНК удваивается и становится равным 4с. Таким образом, при обычном проведении эксперимента предпологаемые различия между нормальными и злокачественными клетками могли оказаться производными от нескольких переменных факторов.

К той же задаче можно подойти иначе — задаться целью исследовать содержание ДНК в «геноме» нормальной или злокачественной клетки. Сама задача приобретает уже иной смысл. Здесь так же, как и в обычных экспериментах, приходится измерять множество фиксированных и окрашенных специальными красителями клеток, но работать необходимо только с теми, которые находятся вне фазы синтеза. Мы избрали делящиеся клетки — фигуры митоза или метафазы (в этот период вместо ядра в клетках видны хромосомы. Содержание ДНК в них постоянно, для нормы — 4с). В обычных клеточных популяциях таких клеток мало и надо прибегать к специальным приемам, чтобы получить в достаточном количестве (около 5%). И здесь возникает ряд проблем, связанных с понятием «геном» клетки: в какой степени сохраняется постоянство ДНК в геноме клеток животных определенного типа, какие минимальные отклонения в нем мы хотим зарегистрировать? При таком варианте задачи встает ряд дополнительных задач прежде всего методического характера, в частности надо иметь совершенную технику измерений, оценить погрешности метода измерений, модифицировать методы окраски клеток, ввести стандарты и др.

Итак, мы имеем два подхода к научному исследованию. Первый — традиционный. Путь, по которому по-

шли мы, потребовал прежде всего определиться с используемыми понятиями клетки и генома и уже затем предпринимать последующие шаги — готовить техническую и методическую базу для экспериментальной работы.

Основные экспериментальные данные, которые были получены нами, связаны с существованием прямой зависимости между содержанием ДНК и содержанием суммарных РНК в пролиферирующих клетках (находящихся в фазе синтеза), которую можно выразить формулой

$$^*y = a \cdot ^*x$$

где  $^*y$  — содержание РНК;  $^*x$  — содержание ДНК;  $a$  — коэффициент;  $^*$  — знак, указывающий на принадлежность нуклеиновых кислот к пролиферирующим клеткам.

Вопреки полученным нами результатам в некоторых современных учебных руководствах по биохимии или молекулярной биологии можно встретить утверждение о том, что не существует прямой связи между содержанием ДНК и РНК в клетках. Но это разногласие кажущееся, поскольку в учебниках говорится о клетках вообще. В таком варианте утверждение можно считать справедливым (заметим, однако, что подобных клеток в природе не существует). В биологии и в частности в ее методологических аспектах большинство сведений о клетке и особенно о химических процессах, протекающих в клетках, базируется на исследованиях клетки вообще. Ее обобщенный, усредненный или абстрактный образ можно найти в любом руководстве по биологии — это известное изображение клетки с округлыми границами, цитоплазмой, ядром, ядрышком, аппаратом Гольджи, разными органоидами. Во всех случаях это стационарный образ. За ним стоит принцип усреднения информации, получаемой на основании исследования множества клеток или клеточной популяции, степень однородности которой часто не учитывается. В этом случае информация приобретает вероятностный характер и, разумеется, статистическая обработка результатов не делает информацию надежнее, а, главное, полной. Мы постараемся показать ниже, что разгадки многих тайн скрываются как раз в средних показателях — надо только взять и внимательно посмотреть, из чего же они складываются.

Исследования соотношения масс РНК и ДНК в клетках занимают особое место в истории цитологии. Начиная с момента публикации широко известного теперь биохимического метода (Г. Шмидт и С. Дж. Таннгаузер, 1945 г.), многим ученым стало ясно, что в связях между ДНК и РНК в клетках (тканях) скрываются важные закономерности. Разрабатывали эту тему также и крупные отечественные ученые, академики А.Н. Белозерский и А.С. Спириин, заложившие основы современной молекулярной биологии. Были получены многие весьма ценные сведения, определившие фундамент современной биологии, но они оказались все же менее значимыми, чем ожидалось. Сейчас этот показатель (РНК/ДНК) трактуется чаще всего как некий «относительный показатель биосинтетической активности клеток». В нашем случае отношение РНК/ДНК, точнее  $^*РНК/^*ДНК$  в клетках является многофункциональной характеристикой: это новый тип биологических констант,  $a = const$ , показатель относительной (и абсолютной) скорости биосинтеза РНК в клетках  $a = v$ , один из основных кинетических параметров процесса клеточной дифференцировки  $a = b$  и, не исключено, показатель доли генома, функционирующей в клетках определенного типа. Это отношение

можно рассматривать в качестве некоего количественного паспорта клетки определенного типа.

Обобщенному образу клетки мы противопоставляем кинетический образ, отражающий непостоянство клетки в ее жизненном цикле. От вероятностной (стохастической) модели клетки мы переходим к детерминированной, временной модели (показателем времени служит содержание ДНК в интервале от 2с до 4с). В качестве такого образа выступают границы двумерных распределений однородных по биологическим свойствам клеточных популяций в принятых координатах (ДНК—РНК). Как оказалось, они имеют вид простых геометрических фигур — эллипсов и трапеций (для нормы). С их помощью мы получили возможность измерять размеры и углы наклона линий и придать им смысл жизненного пути клетки в связи с тем биологическим явлением, свойством или процессом, моделью которого служит выбранная клеточная популяция. В нашем случае информация, получаемая в биохимических опытах, исходит всего лишь из точки на принятом графике. Ее положение может быть случайным, поскольку зависит от нескольких, не всегда учитываемых факторов. В своих экспериментах мы отказались от случайного подбора клеточной популяции и на графике добиваемся развертывания прежней точки на плоскости в жестких координатах. В результате получаем новую информацию, недоступную ранее.

Здесь необходимо подчеркнуть, что в рамках рассматриваемой проблемы (причины или механизмы, из-за которых клетка ведет себя так или иначе) под понятиями «биологические свойства (явления, процессы) клетки» имеются в виду генетически детерминированные события, развивающиеся закономерно во времени, и в данном случае нет особых различий в терминах «явление», «свойство», «процесс» — за ними стоит одно и то же. В связи с этим условимся понимать под «биологическими свойствами клетки» любые проявления жизнедеятельности клетки, характеризующиеся закономерными количественными и качественными особенностями функционирования генома.

К дефиниции понятий «явление», «свойство», «процесс» по отношению к клетке мы обратились в связи с осмыслением причин, из-за которых возможны вариации содержания суммарных РНК в клетках. Что касается содержания ДНК, то его изменение в геноме клетки если и возможно, то только в плане видообразования. В масштабе одной жизни все случайные события в клетках либо нивелируются (клетки погибают либо восстанавливаются), либо они приводят к такого рода патологиям, передающимся дочерним клеткам, какими обладают злокачественные клетки, либо к событиям, которые обуславливают старение организма. (Самостоятельная тема — исследование врожденных уродств). Главный тезис — основные биологически важные события в клетках происходят закономерно и если ДНК в клетках является хранилищем генетической информации (существуют специальные механизмы, поддерживающие ее постоянство), то все многообразие клеток обусловлено закономерной во времени реализацией этой информации. Ведущая роль здесь отводится РНК. Невозможно себе представить, чтобы содержание суммарных РНК в клетках варьировало бы произвольно или случайно. Перечислим некоторые факторы, определяющие содержание РНК. Прежде всего оно зависит от вида клетки, от того, функционирует она или нет (известно, что содержание суммарных РНК в клетках при повышении функциональной активности органа значи-

тельно увеличивается), от того, происходят ли в клетке процессы, связанные с ее созреванием или дифференцировкой, находится ли она в фазе пролиферативного покоя или в фазе синтеза, от состояния клетки — раковая-нераковая и т.д. И сколько бы мы не называли таких факторов, они в той или иной мере будут связаны с теми, которые здесь перечислены. Онкологи нередко объясняют особенности поведения конкретных злокачественных опухолей «биологическими свойствами клеток», при этом они обычно имеют в виду особенности скорости роста опухоли, особенности метастазирования, чувствительность опухоли к гормональному или иному воздействию организма. Вообще, не совсем корректно сопоставлять опухоль и клетки, и именно углубление в дефиницию этих понятий позволяет сформулировать задачу научного поиска и условия ее решения. Это прежде всего подбор клеточной популяции, в которой вариации в данном случае суммарных РНК связаны только с одним из изучаемых явлений. Если это невозможно, то надо стремиться к тому, чтобы таких явлений было бы минимальное число и они были известны. Вот тогда кинетический образ клетки из чисто умозрительной модели превратится в экспериментальный объект для изучения кинетики выбранного биологического процесса.

Например, популяцию клеток, выделенных из тимуса животных (мыши), мы рассматриваем как модель тимоцита, находящегося на разных стадиях процесса клеточной дифференцировки. Такая клеточная популяция состоит почти из одних тимоцитов (примесь других типов клеток ничтожно мала), которые различаются по степени зрелости (дифференцировки) — среди них есть так называемые малые тимоциты, средние, большие. Границ, разделяющих группы таких клеток не существует, а все известные схемы дифференцировки тимоцитов условны, главная идея этих схем состоит в выстраивании последовательности процесса дифференцировки от малого тимоцита к большому или, наоборот, от большого к малому. На этих схемах клетки различаются по размерам, по соотношению размера ядра и цитоплазмы и т.д. Естественно, ни о каких кинетических параметрах собственно процесса дифференцировки речи не идет. В нашем же случае было установлено, что распределения тимоцитов животных, оцененные по содержанию ДНК—РНК, на соответствующем графике приобретают вид трапеции, параллельные стороны которой приходятся на точки по оси абсцисс со значениями 2с и 4с ДНК, верхняя наклонная граница — на биссектрису, исходящую из координатного угла ( $0,955 \pm 0,124$ ), а нижняя граница расположена под углом, тангенс которого составляет  $0,245 \pm 0,054$ . Не останавливаясь на уже опубликованных данных, отметим здесь главные результаты, полученные из анализа характера распределений клеточной популяции тимоцитов. Полученные зависимости позволили оценить такие показатели процесса клеточной дифференцировки, как число митозов  $n$ , которые проходит одна недифференцированная клетка (это тимоцит, который имеет 2с ДНК и такое же по массе содержание суммарных РНК) на своем жизненном пути ( $n = 5$ ), вероятность перехода дочерних клеток на очередной этап клеточной дифференцировки ( $p \approx 0,75$ ). Кроме того, для шести групп тимоцитов, находящихся на последовательных этапах процесса дифференцировки (b1-b6) получены следующие отношения РНК/ДНК: b1 = 1,0; b2 = 0,82; b3 = 0,64; b4 = 0,44; b5 = 0,28 и b6 = 0,19.

Как можно было ожидать, наибольшее сопротивление наши идеи вызвали у специалистов в области молекулярной биологии. Сначала это касалось положения о наличии линейной связи между содержанием ДНК и суммарными РНК в пролиферирующих клетках, затем попыток интерпретировать коэффициенты этой связи. По нашим представлениям биссектриса, исходящая из координатного угла, показывает, что в процессе редупликации ДНК в недифференцированных клетках на материнской однострочной молекуле ДНК образуется, кроме новой молекулы ДНК, еще и РНК, ее полный аналог. Дальнейшее развитие подобных идей — дело специалистов. А сейчас мы можем констатировать, что получив доступ к биологическим константам, мы открываем возможности обсуждения таких процессов в клетке, о существовании которых ранее и не подозревали. С большой долей вероятности мы считаем, что измеренные значения констант могут оказаться показателями доли генома, функционирующего в клетках определенного типа. В случае подтверждения наших предположений, их значение для биологии в целом может оказаться примерно таким же, как роль атомных весов химических элементов для современной химии и ядерной физики. Это касается будущего. Некоторые коррективы в общей и молекулярной биологии мы можем сделать и сейчас.

Например, согласно современным представлениям, в клетках находится около 80—85% рибосомных РНК, около 20% транспортных РНК, 1—5% информационных РНК, около 1% ядерных РНК. Такие сведения многократно подтверждены разными авторами, но они опять же являются суммарными показателями для тех конкретных клеточных популяций, которые исследователи использовали в опытах. В реальных живых клетках абсолютное и относительное количество разных типов РНК может значительно отличаться от этих данных. Так, РНК может составить 40—60% [15, 16]. Но эти данные мало цитируют — они не вписываются в привычную логику мышления ученых, отраженную в существующих схемах биосинтеза белка. Если же принять нашу точку зрения, то придется многое пересмотреть в биологии. В целом подобные новшества лишь сблизят биологию с точными науками.

Рассмотрим возможности предлагаемого нами подхода в приложении к проблеме рака. В этой проблеме есть три разные задачи: 1) познание механизмов превращения нормальной клетки в злокачественную; 2) выявление закономерностей развития опухолей; 3) решение прикладных задач (лечение, диагностика и др.). В нашей интерпретации первая задача звучит как «установление закономерностей функционирования и особенностей состояния генома злокачественной клетки». Такая формулировка представляет собой своего рода техническое задание на решение теоретической части проблемы рака, итогом которого должно быть некое формализованное описание состояния и функционирования генома злокачественных клеток или, иначе, получение аналитического выражения, которое будет отличаться от приведенной выше линейной зависимости. Оно может оказаться единым для всех злокачественных опухолей. Их индивидуальные особенности отразатся в значениях соответствующих констант. Не исключено, что процесс перерождения нормальной клетки в злокачественную является пороговым, а не последовательным, как об этом судят иногда онкологи, наблюдающие фоновые изменения в тканях при развитии злокачественных опухолей. В этом случае наши

представления о «механизмах» процесса будут носить чисто теоретический характер. Практическое значение будут иметь установленная закономерность и новые биологические константы. Именно они дадут возможность целенаправленно влиять на биологию клетки, решать задачи однозначной диагностики природы клетки (в настоящее время диагностика природы клеток по морфо-функциональным особенностям носит вероятностный характер).

Мы видим несколько подходов к решению такой задачи. Не исключаем штурмовой вариант, когда соединение логики мышления физика со знаниями биологии приведет к модифицированию формулы линейной связи таким образом, чтобы она адекватно описывала искаженную форму двумерных распределений популяции злокачественных клеток в координатах ДНК—РНК. Другой путь рассчитан на выполнение систематической исследовательской работы. Здесь есть короткий путь через изучение формы двумерных распределений популяций злокачественных клеток, которые сохраняются в банках перевиваемых культур (при этом надо сначала установить, а затем проанализировать разнообразие этой формы). Более надежный путь — изучение «нормы» в разных ее вариантах, накопление данных о кинетических параметрах процесса дифференцировки в норме и патологии, уточнение и развитие изложенной здесь методологии.

В данной статье мы затронули только начала методологии изучения кинетики внутриклеточных процессов и наш экспериментальный материал, на котором базируются основные ее положения, а также некоторые теоретические выводы, конечно же, уязвимы для критики. Тем не менее мы рассчитываем на то, что настоящая публикация послужит стимулом для тех исследователей, которые определяют свои творческие планы в раскрытии тайн клеточной биологии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Медников Б.М. В кн.: Молекулярные механизмы генетических процессов: Молекулярная генетика, эволюция и генетическая инженерия. М.: «Наука», 1982, с. 82.
2. Переверзев Б.Л., Конрадов А.А. Цитология, 1974, № 9, с. 1171.
3. Переверзев Б.Л., Овсепян Э.Р., Конрадов А.А., Алещенко А.В. Там же, 1976, № 9, с. 1130—1133.
4. Переверзев Б.Л. Там же, 1978, № 10, с. 1220—1224.
5. Переверзев Б.Л. Там же, 1979, № 5, с. 558—565.
6. Переверзев Б.Л. Докл. АН СССР, 1978, № 4, с. 946—948.
7. Переверзев Б.Л. Цитология, 1980, № 11, с. 1374—1375.
8. Переверзев Б.Л., Конрадов А.А., Максимов В.М. Там же, 1981, № 10, с. 1213.
9. Переверзев Б.Л., Конрадов А.А., Максимов В.М. Тез. 1 Всес. биофизич. съезда, 1982, т. 3, с. 177 (2111).
10. Конрадов А.А., Переверзев Б.Л., Максимов В.М. Изв. АН СССР. Сер. биол., 1984, № 1, с. 124—129.
11. Переверзев Б.Л. В кн. Биометрические аспекты системной целостности организма. М.: Изд-во МГУ, 1987, с. 58—81.
12. Переверзев Б.Л. Образ клетки и ее кинетическая модель. Доклады МОИП, 1983 г. Общая биология. Экспериментальные исследования структуры и функции биологических систем. М.: Наука, 1985, с. 56—58.
13. Переверзев Б.Л. Тр. 1 Всес. раб. совещ. «Биофизика рака», 1987, с. 113.
14. Переверзев Б.Л. Генетика в центре проблем. Наука в России, 1993, № 1, с. 72—75.
15. Aviram M., Heshko A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, v. 65, p. 1303.
16. Brandhorst B.P., McConkey E.H. J. Mol. Biol., 1979, v. 85, p. 451.