
ФИЗИКА ЖИЗНЕННЫХ ПРОЦЕССОВ

Б.Н. БЕЛИНЦЕВ

ФИЗИЧЕСКИЕ
ОСНОВЫ
БИОЛОГИЧЕСКОГО
ФОРМООБРАЗОВАНИЯ

ПОД РЕДАКЦИЕЙ *М.В. ВОЛЬКЕНШТЕЙНА*



МОСКВА "НАУКА"
ГЛАВНАЯ РЕДАКЦИЯ
ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
1991

ББК 28.0 Т
Б43
УДК 577.3

Серия "Физика жизненных процессов"
издается с 1965 г.

Белинцев Б.Н. Физические основы биологического формообразования/ Под ред. М.В. Волькенштейна. — М.: Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит., 1991. — 256 с. — ISBN 5-02-014556-4

Рассматривается одна из самых загадочных биологических проблем — морфогенез, т.е. возникновение сложноорганизованных структур в процессе развития организма. Автор предлагает современные физический и математический подходы к этой проблеме на основе теории самоорганизации (синергетики, или теории диссипативных структур). Автор строит достаточно общую модель самопроизвольного возникновения и усложнения биологической организации. Дается обзор физических, математических и биологических теорий формообразования и предлагается оригинальное синтетическое развитие этих представлений.

Для физиков и математиков, интересующихся биологическими проблемами, и биофизиков, работающих в области приложения физических представлений к решению биологических проблем.

Ил. 81. Библиогр. 325 назв.

Б $\frac{1903010000-049}{053(02)-91}$ 63-91

ISBN 5-02-014556-4

© "Наука". Физматлит, 1991

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	5
Ч А С Т Ь I	
ЭЛЕМЕНТАРНЫЕ ПРОЦЕССЫ ФОРМИРОВАНИЯ НАДКЛЕТОЧНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПРИ МОРФОГЕНЕЗЕ	11
Глава I. Общий обзор литературы	13
§ I.1. Комментарии к употребляемым понятиям эмбриологии	13
§ I.2. Математические модели контроля детерминации	22
§ I.3. Математические "механизмы" самоорганизации	24
§ I.4. Модели формирования паттернов клеточной дифференцировки	29
Глава II. Формальное описание первичного упорядочения в морфогенетическом поле	33
§ II.1. Формальное представление элементарных свойств поля	33
§ II.2. Организация поля "источником" и "стоком"	37
§ II.3. Самоорганизация макрокопического порядка. Зарождение, стабилизация и трансформация диссипативных структур	44
Выводы	55
Глава III. Коллективные явления на многоклеточной фазе развития миксомицет <i>Dictyostelium discoideum</i>	55
§ III.1. Жизненный цикл. Коллективные процессы в развитии псевдоплазмодия. Химическая сигнализация, хемотаксис, клеточная дифференцировка	55
§ III.2. Теоретические модели	63
§ III.3. Мелкомасштабная кластеризация клеток	69
§ III.4. Агрегация на фазе струсообразования	73
§ III.5. Дивергенция клеточных типов в слизи	83
§ III.6. Полное пространственное расслоение дифференцированных клеток и морфологическая поляризация агрегата	93
§ III.7. Сопоставление с экспериментальными данными	98
Выводы	103
§ III.8. Формулировка сводной модели коллективного развития <i>D. discoideum</i>	106
Глава IV. Самоорганизация разметки при эпителиальных морфогенезах	114
§ IV.1. Универсальная разметка морфогенетической активности эпителиев. Активные деформации клеток и упругие напряжения в эмбриональном материале	114
§ IV.2. Самоорганизация разметки морфогенетической активности. Теоретическая модель [216, 220]	121

§ IV.3. Поляризация клеток в двумерном пласте [224]	135
§ IV.4. Обсуждение биологических данных.	140
§ IV.5. Поляризация клеток в пласте с внешними упругими связями	148
Заключение	164
Список литературы	169
Дополнение. Формирование основного плана строения в раннем развитии насекомых	176
1. Обзор экспериментальных данных и теоретических моделей	176
2. Теоретическая модель	183
Список литературы	193
ЧАСТЬ II	
КЛЕТочная АДГЕЗИЯ. ФИЗИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТКИ С СУБСТРАТОМ	195
ДИНАМИКА РЕЛЬЕФА КЛЕТочной ПОВЕРХНОСТИ	203
Список литературы	211
ЧАСТЬ III	
О ПРИРОДЕ РОСТОВЫХ ПУЛЬСАЦИЙ В РАЗВИТИИ ГИДРОИДОВ	213
Список литературы	223
Приложение	
1. Влияние последовательности оснований на стабильность двойной спирали ДНК	223
2. Почему процесс плавления сверхспиральных ДНК столь некооперативен?	229
3. К вопросу о скорости формирования промоторных комплексов РНК-полимеразы <i>Escherichia coli</i> с ДНК фага T7	236
4. Кинетическое определение констант неспецифического связывания РНК-полимеразы <i>Escherichia coli</i> с ДНК фага T7	245
Список литературы	248
Библиография работ Б.Н. Белинцева	250

ПРЕДИСЛОВИЕ

30 апреля 1988 г. в возрасте 35 лет скоропостижно скончался один из наиболее интересных и ярких советских биофизиков Борис Николаевич Белинцев. Его научная жизнь продолжалась недолго — всего 12 лет, но вместила решение широкого круга разнообразных проблем. Это было возможно только благодаря исключительному научному дарованию Бориса Николаевича и удивительно преданному отношению к своей научной работе, которая занимала основное место в его жизни. Борис Николаевич писал *):

”В школьные годы я жил вдалеке от научных центров и поэтому не имел возможности видеть, как люди занимались наукой. Тем не менее к окончанию школы я твердо решил, что буду заниматься физикой. Не знаю, хорошо или никак от этого моего выбора физике, но сам я никогда не испытывал разочарования. Скорее напротив — все более вхожу во вкус. Могу сказать также, что до сих пор ощущаю тот импульс, который 15 лет назад увлек меня и привел к физике. Этот импульс сообщила мне небольшая книжечка — сборник задач, придуманных П.Л. Капицей. Вразумительные ответы я имел не более, чем на половину из тех вопросов. Позднее, уже студентом Физтеха, я понял, что и эти мои ответы никуда не годятся. Тем не менее импульс все-таки был. Я оценил, что физика — это не только несчастные блоки, наклонные плоскости и линзы. Помимо обычной функции задач — проверить понимание предмета — задачи Капицы возбуждают интерес к предмету. Тогда, наверное, впервые я ощутил разницу между решением задач по заданной схеме и теме и исследованием, когда, приступая, не знаешь, за что можно ухватиться. Мне почему-то представилась атмосфера научной работы. Атмосфера, в которой работа — не источник благ и достатка и одновременно уныния. Эти задачи (я знал — составленные исследователем, а не педагогом) — в них что-то от игры и именно эту атмосферу я тогда интуитивно ощутил. Тут, возможно, было наложение в моем сознании впечатлений от кинофильмов типа ”Девять дней одного года” и романов типа ”Иду на грозу”. Но впечатление от этих задач в отличие от художественных произведений я воспринимал как исходящее от прямо причастного и поэтому как более достоверное. Поэтому уже старшекурсником я побывал несколько раз на

*) Из набросков к воспоминаниям о П.Л. Капице.

семинаре Капицы в ИФП и эту атмосферу почувствовал снова. Это мое юношеское представление о каком-то духе игры в научной жизни не закрепилось впоследствии при более тесном сближении с этой жизнью...”

Б.Н. Белинцев родился в 1952 г. в г. Черкассы, а вскоре с семьей переехал в г. Грозный, где и прошли его детские годы. В 1970 г. он поступил в Московский физико-технический институт, который закончил с отличием в 1976 г. В этом же году вышла в свет первая научная статья Бориса Николаевича, посвященная физике ДНК. Хотя в дальнейшем он не раз возвращался к этому направлению биофизики, с 1976 г. его научные интересы резко изменились. Кандидатская диссертация, которую он защитил в 1979 г., называлась “Динамические коллективные свойства развивающихся систем”. В этой работе ставятся вопросы об общих закономерностях коллективного поведения на клеточном уровне, о возникновении и поддержании пространственной упорядоченности клеток в многоклеточных ансамблях. В дальнейшем эта тема развивается необычайно интенсивно. За короткий срок в тесном взаимодействии с биологами были получены основополагающие результаты, которые в начале 1987 г. были защищены в качестве докторской диссертации. Соавтор ряда работ этого плодотворного периода доктор биологических наук проф. Л.В. Белоусов вспоминает:

“Я познакомился с Борисом Николаевичем Белинцевым около 1980-го года, когда он впервые пришел для разговора о возможностях математического моделирования морфогенеза. Поскольку мне и до того сильно “везло” на подобные разговоры, помню, что сначала я отнесся к гостю без большого энтузиазма. Я думал, что речь пойдет, как неоднократно до той поры было, о “притягивании за уши” биологического материала к уже существующей и чем-либо удобной для собеседника математической идее или просто машинной программе. Однако встречи наши продолжались и оказалось, что на этот раз я ошибся. Меня сразу же привлекли внимание и бережное отношение Бориса Николаевича к биологическим фактам и, в особенности, великолепное по ясности и обобщающей силе их понимание. “Почему этот человек не биолог?” — думалось мне. Но очень скоро я понял, что, конечно, он насквозь — физик. Постепенно наши роли менялись, и из вопрошаемого я все чаще превращался в слушателя. Фрагмент за фрагментом Борис Николаевич излагал мне и присоединившемуся к этим работам А.Г. Зарайскому элементы теории недавно рассказанных ему морфогенетических процессов, заполняя четко выписанными формулами и схемами доску в нашей аудитории на кафедре эмбриологии МГУ. Ясно помню то чувство эстетического наслаждения, когда добытый нами в нелегких трудах многих лет экспериментальный материал выстраивался в стройную взаимосвязанную последовательность. В некоторых местах возникали бреши, которые мы тут же старались заполнить новыми опытами. Главное, к чему стремился и чего достигал Борис Николаевич, — это полная, хотелось бы сказать, звенящая, ясность: никакого тумана, сумбура, показного глубокомыслия, к которому так нетрудно скатиться в нашей достаточно путанной области науки. Особенно хорошо помню я весенние дни, кажется 1984 г., когда стало ясно, что из теории, строившейся Борисом, без всяких допущений вытекает явление так называемых дришевских регуляций (интересно,

что описавший их почти 100 лет назад выдающийся немецкий биолог Г. Дриш рассматривал эти регуляции как неотразимый аргумент в пользу невозможности сведения биологии к физике!). Помню, что я позволил тогда Борису и сказал, что вижу такую возможность, но не могу доказать ее иначе, чем на "пальцах". На следующий день он принес мне готовую машинную распечатку строгого доказательства, к которому он, оказывается, уже раньше пришел совершенно независимо. Настало время публиковать первые результаты. Когда Борис Николаевич принес наше первое сообщение своему завлабу чл.-корр. М.В. Волькенштейну, тот, при всей своей постоянной благожелательности, отнесся к нему с понятной настороженностью — слишком необычны были как исходные посыпки, так и простота и фундаментальность выводов, и он показал рукопись известному цитологу Ю.М. Васильеву с вопросом: может ли такое быть? В ответ Ю.М. Васильев рассказал о только что вышедшей статье американских авторов, развивающих, применительно к другой группе морфогенезов, сходные идеи. Работе тут же был дан "зеленый свет", а нам стало понятно, что мы "не одни в этом мире". Помню, что Бориса Николаевича это совершенно не огорчило, а лишь убедило, что он на правильном пути в новой для себя области. И он начал еще более активно работать.

Работа, как мне кажется, шла в основном в двух направлениях: по пути более углубленных аналитических концепций субклеточных механизмов морфогенеза и по пути построения обобщающих теорий, в том числе — возрождения концепции морфогенетического поля (см. статью в "Природе", № 2, 1989 г.).

Я глубоко убежден, что тем результатам, которые успел получить Б.Н. Белинцев, суждена долгая и плодотворная жизнь в науке. Только сейчас зарубежные ученые начинают о них узнавать, и их оценка — неизменно самая высокая. Мы потеряли Бориса Николаевича в самом начале этой волны признаний. Эта потеря невосполнима, потому что он не только своими научными результатами, но и одним лишь присутствием, участием или просто короткими вопросами в дискуссиях создавал вокруг себя ту атмосферу высокой науки, которая так трудно достигается.

В чем состоит значение данной книги для биолога? Морфогенез — одна из наиболее глубоких и "вечных" проблем биологии. Разрешить ее — значит понять, каким образом в ходе индивидуального развития, а также органической эволюции из относительно однородных зачатков возникают сложнейшие пространственно упорядоченные структуры. Долгое время казалось, что проблема эта сугубо биологическая, что явления морфогенеза ис только не могут быть объяснены физическими законами, но даже им противоречат. Лишь сравнительно недавно, в середине 50—60-х годов нашего века наметились достаточно содержательные (а не прежние чисто декларативные) возможности подхода к морфогенезу как к физическому процессу. Однако вплоть до самого последнего времени и эти возможности выражались, главным образом, в построении "демонстративных" моделей, которые показывали, как мог бы, в принципе, протекать биологический морфогенез, но которые очень плохо или вовсе не стыковались с реальными биологическими данными. Это, естественно, порождало скепсис биологов по отношению к физичес-

ким и модельно-биологическим подходам, рождало мнение, что физико-математические подходы к морфогенезу — не более чем некоторая ни к чему не обязывающая игра.

Работы Б.Н. Белинцева — одни из первых, в которых сделаны весьма существенные шаги на пути смыкания эмпирических данных современной биологии развития с физико-математической теорией. Мне не известны в мировой науке другие работы, где физическая теория развития поставлена на столь прочный биологический фундамент”.

Предлагаемая вниманию читателей книга основана на докторской диссертации Б.Н. Белинцева, но содержит и другие его работы, посвященные онтогенезу. В приложении приведены работы по молекулярной биофизике. В книгу не вошли многие работы Белинцева, в частности статья 1977 г., в которой показано сходство видообразования с фазовыми переходами.

Что же сделал Б.Н. Белинцев и о чем рассказано в книге?

Б.Н. Белинцев сформулировал основы теории самоорганизации развивающегося зародыша. В 1952 г. Тьюринг опубликовал статью, озаглавленную ”О химической основе морфогенеза”. В этой работе было показано, что открытая химическая система, в которой реализуются автокаталитические реакции и диффузия, способна к самоорганизации — в результате неустойчивости возникает неоднородное распределение вещества в пространстве, происходит нарушение симметрии.

Б.Н. Белинцев показал, что морфогенез не сводится к чисто химическим явлениям. Важнейшую роль здесь играют механохимические процессы. Физико-математическая модель Б.Н. Белинцева использует теорию нелинейных дифференциальных уравнений. В нелинейных диссипативных системах реализуются неустойчивости и бифуркации. Установлены условия, при которых в клеточных пластах возникают спонтанные переходы с понижением симметрии, т.е. самоорганизация. В книге с помощью этих моделей исследованы конкретные биологические системы. Детально изучен один из простейших объектов, которому присущ морфогенез, — миксомицет *Dyctiostelium discoideum*. При достаточном количестве пищи он представляет собой совокупность одноклеточных организмов — амёб; при нехватке пищи происходит объединение амёб, дифференцировка клеток и определенный морфогенез вновь образованного организма. Б.Н. Белинцев впервые построил теоретическую модель макроскопических событий в коллективной фазе развития миксомицета. Проведенный анализ дал полное объяснение режимов группового поведения клеток, раскрыл природу макроскопического контроля. Теория эффективно применима и к другим развивающимся биологическим системам — к морфогенезу зародышей насекомых, к эпителиальному морфогенезу и т.д. Теория Б.Н. Белинцева дала новое подлинно физическое толкование старых представлений биологии развития — морфогенетического поля (А.И. Гурвич), позиционной информации (Л. Вольперт).

После завершения работы над докторской диссертацией Борис Николаевич приступил к работе над новой задачей, которая явилась продолжением предыдущих. Если раньше он исследовал системы, в которых клетки являлись простыми элементами, то теперь была поставлена задача рассмотреть собственно клетку как сложную систему и на единой

методологической основе построить теоретическую модель движения отдельной клетки (на первом этапе — движения клеточной поверхности).

Эта методологическая основа состояла в следующем: клетка рассматривалась как сложная физическая система, движение которой связано с самоорганизующимися процессами в ней. Для исследования такой системы необходимо разделить ее на иерархически взаимодействующие подсистемы, построить физическую модель, описывающую эти подсистемы. В результате можно было рассчитывать на понимание того, как эти подсистемы или их взаимодействия участвуют в клеточном движении. Главную сложность в таком подходе представляет правильное выделение относительно простой подсистемы из огромного числа структур и элементов клетки с учетом их взаимодействия.

К сожалению, Б.Н. Белинцев лишь начал работать в этом направлении. Он подготовил к печати две статьи: "Клеточная адгезия" и "Динамика рельефа клеточной поверхности", но не успел увидеть их опубликованными. В этих работах построены теоретические модели отдельных стадий клеточного движения — начального этапа прикрепления клетки к субстрату и образования волн на поверхности распластанной клетки.

Дальнейшее развитие работ планировалось в следующих направлениях*):

а) описание процесса перегруппировки фокальных контактов (это обсуждено в конце работы "Клеточная адгезия"),

б) описание появления и движения складок цилиндрических отростков на поверхности клетки (что являлось первоначально целью работы "Динамика рельефа клеточной поверхности"),

в) описание процесса формирования актиновых пучков из кортикальной сети,

г) синтез всех названных выше процессов для описания процесса образования контакта отростка клеточной поверхности с субстратом и актинового пучка, соединенного с местом контакта.

В перспективе на этом пути можно подойти и к построению модели движения клетки по подложке в целом, поскольку такое движение в значительной степени состоит из элементарных актов выбрасывания отростков в разных направлениях, прикрепления их к субстрату и развития натяжения в этих прикрепившихся отростках. Суммарное действие таких натяжений многих отростков и приводит к движению клетки по подложке.

Смерть Б.Н. Белинцева — невосполнимая потеря. Так много предстояло сделать. Он был истинным ученым, нашедшим свой путь, внесшим крупный вклад в науку. Он был человеком высокого таланта и культуры, образцом душевной чистоты и благородства. Но эта книга — не просто памятник выдающемуся человеку. Это итог прекрасных работ и источник нового знания. Содержание книги очень богато, и несомненно, что дальнейшее развитие теоретической биологии и биофизики будет тесно связано с этими исследованиями.

*) Эта программа не формулировалась в таком виде Б.Н. Белинцевым, а является обобщением, сделанным на основе бесед с ним М.А. Барановым.

”Любая научная биография поучительна в положительном или отрицательном смысле. Биография, такая как у П.Л. Капицы, может научить очень многому. Конечно, не всему можно научиться. Трудно представить себе, чтобы такая научная судьба могла сложиться при другом человеческом характере, менее, что ли, упругом. Податливость характера — качество, необходимое для выживания, но не более того. Чтобы что-то создать, надо еще чем-то быть. Студентом я оценивал судьбу Капицы как цепь везений. Эта биография — скорее ряд испытаний судьбы, чем ее подарков. Характер — это не то, что выбирают или переделывают. Его поздно переделывать, когда, наконец, понимаешь, какой тебе больше подходит. Но такие вещи, как жизненные установки, как выбор ближайших и далеких задач, доступны нашим силам...”

Эти слова — наброски воспоминаний Б.Н. Белинцева о П.Л. Капице — могут быть в полной мере отнесены к нему самому.

Чл.-корр. АН СССР *М.В. Волькенштейн,*
А.П. Минеев,
Е.Л. Капица-Белинцева

Мне хотелось бы выразить глубокую признательность друзьям и коллегам Бориса Николаевича — Л.В. Белоусову, М.А. Лившицу, А.П. Минееву, А.В. Полоцкой, Н.А. Шароповой — за большую помощь в работе над рукописью.

Их заинтересованное участие и постоянная поддержка всемерно способствовали выходу в свет этой книги.

Е.Л. Капица-Белинцева

**ЭЛЕМЕНТАРНЫЕ ПРОЦЕССЫ ФОРМИРОВАНИЯ
НАДКЛЕТОЧНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПРИ МОРФОГЕНЕЗЕ**

Ни одна из конструкций, созданных человеком, не способна конкурировать по сложности решаемых задач с обыкновенной мухой. Одной из таких задач является создание себе подобных. Каким образом яйцеклетка и спермий, объединяясь, дают зародыш, а из него в свою очередь развивается взрослый организм? До настоящего понимания этих вещей еще очень далеко.

Известно, что вся исходная информация, на базе которой строится, а затем и функционирует организм, сосредоточена в ДНК. Эта информация закодирована в виде уникальной последовательности нуклеотидов — субъединиц ДНК. В разных органах клетки функционируют по-разному — одни секретируют гормоны, другие проводят сигналы и т.п. — потому, что в них доступны для считывания разные фрагменты ДНК — гены. Рано или поздно молекулярная биология выяснит, как включаются различные гены и как из этого получается тот или иной тип специализированных клеток взрослого организма. Но только ли в этом состоит проблема?

Очевидно, нет. Активность клеток в развивающемся зародыше (включение нужных генов, синтез нужных белков и т.д.) должна проявиться в свое время, в своем месте. Эмбриологи могут довольно точно указать место в зародыше, на котором в определенное время начинают формироваться глаза, конечности и т.п. [1]. Но каким образом "знает" это сам зародыш? Иными словами, как организуется макроскопический порядок при морфогенезе? Здесь есть ряд проблем, которые физики считают своими проблемами.

Понимая, что все начинается с одной клетки — оплодотворенного яйца, естественно ставить вопрос: в какой мере конечный результат процесса развития предопределен этим началом? Этот вопрос не так прост, как кажется.

С одной стороны, из известного факта сходства однояйцевых близнецов прямо следует, что одинаковые начальные состояния (самые первые клетки будущих близнецов являются точными копиями) и развитие в одинаковых условиях дают одинаковый конечный продукт. Тем самым устанавливается, что строение взрослого организма с точностью до тонких деталей предопределено начальным состоянием плюс внешними условиями процесса развития. Больше того, как было сказано, уже на ранних стадиях развития однозначно определено, какие структуры целого организ-

ма сформируются из разных частей зародыща. Например, уже на бластуле можно указать, из какой группы клеток много часов спустя разовьется нервная система, из какой — мышцы, а из какой — внутренние органы [1].

Из этих фактов вполне логично сделать общий вывод: разные области зародыща уже на ранних этапах развития каким-то образом запрограммированы к различному дальнейшему развитию. Такой логики объяснения эмбриогенеза придерживалась старая эмбриология, которую называли также "механикой развития". От механики здесь то, что многообразии конечных состояний клеток — их принадлежность разным органам и тканям — выводится из многообразия состояний их предшественниц в более раннем зародыше, т.е. изначальная преддетерминированность развития. Иными словами, считается, что структуры взрослого организма в той или иной форме предсуществуют в раннем зародыше. Однако этот вывод, а с ним и сама логика "механики развития", оказался, вообще говоря, не правомочным. Существует широкий круг явлений — так называемые эмбриональные регуляции, — опровергающий его [2].

Способность к таким регуляциям проявляют зародыши многих видов животных — морские иглокожие, амфибии и др. Суть явления состоит в следующем. Ранний зародыш (до гастрюляции) можно разделить на части, можно срастить несколько зародышей, перемешать клетки так, чтобы изменилось относительное расположение отдельных частей зародыща. Оказывается, при этом относительное расположение и пропорции различных структур формируются такими же, как в норме. Ясно, что так не должно было бы получаться, если бы действительно отдельные части зародыща были запрограммированы к формированию определенных частей взрослого организма.

В свое время (начало нынешнего века) вывод из этих результатов — непригодность самой логики "механики развития" для объяснения эмбриогенеза — прозвучал как вызов физике [2]. С тех пор ключевым понятием нового подхода к обоснованию зародышевого развития стала *самоорганизация*. Если план строения взрослого организма ~~не~~ в какой форме не предсуществует в раннем зародыше, то эти структуры должны формироваться в процессе его развития путем самоорганизации.

Однако это еще не объяснение, а только символ объяснения. Необходимо уметь обосновать самоорганизацию макроскопического строения зародыща, исходя из более элементарных свойств эмбрионального материала. Этой общей проблеме посвящена настоящая работа.

Список свойств индивидуальных клеток, могущих иметь отношение к их коллективному поведению в развитии, достаточно внушителен. Эмбриональные клетки делятся, движутся, деформируются, дифференцируются, секретируют сигнальные вещества и реагируют на них, формируют специализированные межклеточные контакты и т.д. Не имея заранее представления об общих путях самоорганизации, поставленной проблемы не прояснить. Именно опыт физики, а также математики и химии последних двух-трех десятилетий дает это представление.

В физике о самоорганизации говорят, когда при симметрии внешних условий в какой-либо системе самопроизвольно нарушается симметрия макроскопического состояния. Качественно формирование зачатков различных структур взрослого организма при том, что было ска-

зано выше об эмбриональных регуляциях, относится к той же категории явлений. Для простых активных сред, таких как химическая смесь Белоусова — Жаботинского или неравномерно прогретый слой жидкости, подходы к описанию подобных явлений уже основательно разработаны [3—5]. Удастся выделить суть явления самого по себе, не зависящую от физической природы объекта. Наиболее общим мотивом различных физических механизмов самоорганизации является селективное усиление выделенных пространственных гармоник внешнего воздействия. Такое воздействие может быть достаточно произвольным, а результатом оказывается некоторое стандартное макроскопическое состояние. Если мы имеем дело с самоорганизацией макроскопического порядка в какой-либо системе, то для понимания явления необходимо уметь обосновать именно эту способность. Это и будет самой общей программой наших действий в настоящей работе.

ГЛАВА I

ОБЩИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

§ 1.1. Комментарии к употребляемым понятиям эмбриологии

Компетенция [6]. Под компетенцией эмбриональных клеток понимают их способность при соответствующих (не обязательно специфических) внешних воздействиях дифференцироваться в том или ином направлении. Иными словами, *компетенция подразумевает способность клеток к выбору пути развития*. Так, эктодерма зародыща амфибий под влиянием энтодермы дифференцируется в нервную ткань; в отсутствие такого влияния она развивается в эпидермис кожи.

В ходе дифференцировки одна компетенция сменяет другую, так что текущее состояние определяет и подготавливает очередную компетенцию.

Компетенция — ограниченное число вариантов выбора. Хотя клетки ранних стадий развития тотипотентны, выбор пути развития, подразумеваемый компетенцией, ограничен небольшим числом альтернативных вариантов. В ряде случаев показано, что это число равно двум (зародышевое развитие насекомых [7—11], детерминация имагинальных дисков в личиночный период [12], бластоциста млекопитающих [13—15]).

Дихотомический характер компетенции подразумевает, что прогрессивная специализация зародышевых клеток осуществляется путем иерархической серии бинарных выборов. Например, в линии развития холинэргических моторных нейронов происходила спецификация сначала в эктодерму, а не мезодерму; затем — в нервную ткань, а не эпидермис; затем — в нейрон, а не глию; затем — в моторный, а не сенсорный нейрон и, наконец, — к синтезу ацетилхолина, а не аминокислоты [16].

Детерминация. О детерминации говорят, когда выбор пути развития, соответствующий компетенции клеток, осуществлен [6]. Это событие часто наступает задолго до такого состояния дифференцировки.

в котором ее признаки обнаруживаются на гистологическом уровне. Сужение потенциалов развития, сопровождающее детерминацию, обнаруживается в опытах по трансплантациям — детерминированные клетки при пересадке развиваются всегда в соответствии с их исходным положением в зародыше, каким бы типам дифференцировки не соответствовало их новое местоположение [17, 18].

Детерминация как выбор определенного пути развития при наличии нескольких альтернативных не устраняет последние. Они сохраняются как потенциально возможные. Так, клетки имагинальных дисков в личинке насекомых способны сохранять состояние детерминации на протяжении многих циклов делений. Но вместе с тем в искусственных условиях культивирования обнаруживают спонтанно возникающие дискретные изменения типа детерминации — трансдетерминацию [12, 19].

Отсюда следует представление о детерминации как об одном из нескольких возможных состояний динамического равновесия [10]. В этих терминах компетенция должна трактоваться как мультистабильность динамической системы контроля состояния клетки [20].

Представление о детерминации как об одном из небольшого числа дискретных состояний гомеостатического равновесия имеет отношение к вопросу о том, какого рода сигналы должны быть ответственны за инициацию той или иной программы развития, заложенной в зиготе. Для того чтобы оказаться в таком равновесии, совершенно не обязательно все параметры системы приводить к соответствующим значениям. Для динамической системы — эмбриональной клетки — число таких параметров, вероятно, очень велико. Внешние сигналы, управляющие детерминацией, не могут контролировать все эти параметры. Но даже сложная, многокомпонентная система, обладающая небольшим числом дискретных устойчивых стационарных состояний, окажется в одном определенном из них при достаточно неспецифическом внешнем воздействии. От внешнего управляющего сигнала требуется лишь, чтобы он переводил параметры в область притяжения этого состояния. Чем шире эта область, тем ниже требования к специфичности управляющего сигнала. Именно так, вероятно, следует понимать хорошо известный факт низкой специфичности воздействий, имитирующих эффект естественного индуктора [1].

Включение определенной программы развития при детерминации предполагает активацию соответствующего специфического набора генов [8, 21]. Какого именно — определено предшествующей компетенцией. Сейчас только начинают формироваться представления о молекулярной природе соответствующих генетических и эпигенетических перестроек [22].

И н д у к ц и я. Классические примеры индукционных взаимодействий — индукция нервной системы в эктодерме в результате ее контакта с энтодермой (нейральная индукция) и индукция линзы в эпидермисе нейрулы, где индукцирующее действие исходит от глазного пузыря [6, 23]. До сих пор не установлена природа феномена индукции — не ясно, какие молекулы исполняют роль естественного индуктора, каким путем они передаются и какого рода информацию сообщают [6]. Но некоторые, пока очень общие выводы сделать можно.

Индуктор – триггер, стимулирующий внутренние потенции компетентной ткани. Нейральную индукцию оказалось возможным вызвать на удивление широким набором воздействий. Индуцирующую активность обнаруживают жирные кислоты, стероиды, аммоний и многие другие агенты [1].

Если индуцировать эктодерму индуктором, выделенным из зародыша другого вида, результатом всегда оказывается нервная система с особенностями, характерными для индуцируемого организма [1].

Вывод из этих данных – программа нейрализации заключена в реагирующей ткани; индуктор активирует процесс реализации этой программы [24, 25].

Индукция и самоорганизация. При нейральной индукции индуцируемая нервная пластинка развивается в организованный осевой комплекс структур – ее передняя часть формирует зачаток головного мозга, средняя и задняя развиваются в спинной мозг. Индукция вызывает наряду с детерминацией пути развития клеточек, их организацию в пространстве.

В ранних исследованиях предполагалось, что индуктор является одновременно "организатором" пространственной программы развития [26]. Однако позднейшие эксперименты убеждают, что индукция этой программы не передает, а "организатором" является сама реагирующая ткань зародыша [24, 25].

Генетическая программа развития. Что бы конкретно ни определялось такими понятиями, как программа развития, компетенция, индукция, детерминация, они отражают самую общую суть эмбриогенеза – его высокую временную организацию. В конечном счете эта организация сводится к тому, что в определенное время активируются определенные наборы генов – разные в разных областях зародыша. Но что является мерилом текущего времени для клеточек развивающегося зародыша и как оркеструется работа многих тысяч их генов?

По-видимому, определенная, важная часть функций управления развитием приходится на геном. Иными словами, хромосомная ДНК представляет собой не только каталог информации о специфических белках, но и управляющий процессор, в котором заложена программа контроля за извлечением этой информации – программа развития [248].

Сейчас трудно установить пределы справедливости этой идеи. Можно привести лишь некоторые разрозненные факты, на которых она базируется.

На стадии нейрулы в зародыше асцидий фермент ацетилхолинэстераза обнаруживается гистохимическими методами в клетках хвостовых мышц [249]. Показано, что появлению этого фермента предшествует генная активация, транскрипция РНК, белковый синтез [249]. Яд цитохалазин Б, нарушающий цитокinesis, но не репликацию ДНК, не препятствует появлению фермента по нормальному графику, хотя при этом деления клеток останавливались уже со стадии восьми бластомеров [249]. Напротив, обработка зародыша ядом, блокирующим синтез ДНК на ранних стадиях развития, блокирует также появление фермента [250]. В то же время фермент производится клетками, обработанными этим ядом, если они (клетки) прошли ровно семь циклов репликации ДНК [250].

Отсюда делается вывод о том, что репликация играет роль "часов развития" [250]. Каков более детальный механизм – не ясно, но это уже другой вопрос.

Наиболее полные доказательства причастности самого генома к контролю за развитием специфических структур и функций в многоклеточном организме собраны на дрозофиле. Соответствующие контролирующие гены называются гомеозисными. Из этих генов лучше других изучены Биторакс и Антеннапедия [251]. Каждый гомеозисный ген вовлечен в контроль развития вполне определенной структуры насекомого — его действие регионально специфично. Так, мутации в гене Биторакс (точнее, как выяснилось, это комплекс генов [251]) приводят к замещению одного из брюшных сегментов на грудной и больше ничего не затрагивают. При мутации Антеннапедия на месте пары антенн развивается пара ножек.

Очевидно, развитие макроскопических органов или сегментов насекомого определяется множеством белков. Следовательно, активность гомеозисных генов обеспечивает сигналы к включению экспрессии, воспринимаемые батареями структурных генов, чем в свою очередь определяется развитие разных специфических структур [251].

Совокупность данных о гомеозисных генах воплотилась в следующую схему генетической стратегии развития [7, 11]. Каждый домен насекомого несет определенный генетический адрес. Последний устанавливается по "древу клеточных линий", показанному на рис. 1. Все разветвления на этом древе — бинарные и соответствуют двум состояниям — включенному и выключенному (на рис. 1 условно 1 и 0) рядам ключевых генов-переключателей (в другой терминологии — генов-селекторов). Состояние такого переключателя, определенное однажды в некоторой группе клеток развивающегося зародыша, сохраняется и во всех дочерних клетках. Таким образом, адрес данной клеточной линии становится длиннее после каждого очередного ветвления. Окончательный адрес клеток взрослого организма, закодированный по данной схеме, содержит в себе всю историю бинарных выборов состояния, пережитую клетками-предшественницами. Этот адрес и определяет тип органа или ткани насекомого.

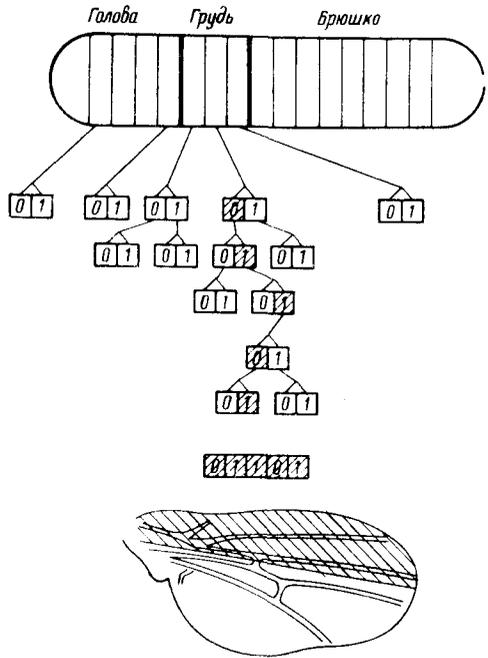
Перенос управления от одного гена-переключателя к другому, т.е. очередной шаг в формировании генетического адреса данной клеточной линии, вероятно, хронометрируется циклами репликации ДНК. Такая связь между транскрипцией управляющих генов и делениями ядер показана для генов, контролирующих сегментацию дрозофилы при формировании бластомеры в раннем зародышевом развитии [252].

Определенная очередность передачи управления между генами-переключателями может достигаться благодаря их физической близости на хромосомах. Такое функционально значимое тандемное расположение установлено для генов комплекса Биторакс [251].

В последнее время, благодаря активизации исследований с привлечением методов генной инженерии, приведенная гипотетическая схема генетической стратегии развития обретает хорошую почву. Однако даже при полном подтверждении она не может снять некоторые принципиальные вопросы. Прежде всего — вопроса об анатомической упорядоченности развития.

Вообще, разделяемая многими идея о генетической программе развития, должна приниматься с существенными оговорками. Главное, что ею подразумевается, это то, что гены, посредством своих продуктов, определяют макроскопические формы организма. При этом уже слово "опре-

Рис. 1. Гипотетическая схема последовательного установления генетических адресов для различных клеточных линий плодовой мушки. Пять уровней ветвления условно соответствуют пяти генам-переключателям. "1" и "0" на каждом уровне определяют включенное и выключенное состояние соответствующего гена. Жирным выделена одна линия и ее условный окончательный адрес, определяющий переднюю часть крыла взрослого насекомого. В основании "древа" (наверху) – зародыш, на котором указаны презумптивные части тела и ранняя сегментация зародыша [7]



деляют" нуждается в уточнении, но обычно считается, что знания полной информации, кодируемой генами, *достаточно*, чтобы определить форму, создаваемую их продуктами.

Даже это утверждение в буквальном смысле неверно. Достаточно вспомнить, например, о двух конформационных состояниях белка актина — *G* и *F*, из которых только во втором актин включается в надмолекулярные структуры цитоскелета и от которых, в свою очередь, зависят форма клетки и ее двигательная активность [16, 253]. Очевидно, помимо соответствующей генетической информации, задающей первичную структуру белка, здесь существенны физические условия в клетке [253].

Аналогичный пример, относящийся уже к многоклеточной морфологии, дает известное явление фенкопий [253]. Фенотипы многих морфологических мутантов дрозофилы могут быть полностью воспроизведены неспецифическими воздействиями (временный тепловой удар, кислотная обработка и т.п.) на генетически дикий тип зародыша в определенные стадии развития. Мутантные гены и временные возмущения во внешних условиях оказывают одинаковый эффект на процесс развития и эквивалентны по результату. Существенно, что при таких возмущениях развития одна, вполне организованная морфология замещается другой — также хорошо организованной. Более того, набор возможных возмущенных морфологий ограничен и оказывается намного уже набора возмущений. Очевидно, процесс развития подразумевает определенные принципы организации, допускающие ограниченный набор пространственных форм, и эти принципы не сводятся к прочтению генетического текста [253].

Разнообразные проявления эмбриональных регуляций, как уже отмечалось, исключают изначальную заданность плана строения взрослого в раннем зародыше и тем самым приводят к выводу о самоорганизации развития.

Идеи о генетической программе развития и самоорганизации часто выдвигаются как альтернативные, как бы исключаящие друг друга объяснения. Сторонники обеих находят убедительные доводы в поддержку своей точки зрения и слабые места противоположной. Можно предполагать, что место истины — посередине.

Вероятно, правильнее всего считать представления о генетической программе развития и его самоорганизации *дополнительными*. Тем самым, как у Бора, подчеркивается то обстоятельство, что "... в противоречащих друг другу явлениях мы имеем дело с различными, но одинаково существенными аспектами единого комплекса сведений об объекте" [254].

Ключевыми понятиями представления о самоорганизации зародышевых структур являются "морфогенетическое поле", "позиционная информация", "разметка", групповое поведение клеток. Их философский смысл состоит в признании необходимости некоторого специального механизма пространственной организации, как самостоятельной, не сводимой к генетической программе компоненты эмбриогенеза. Именно эта компонента исследуется в данной работе.

Морфогенетическое поле [26—30]. Установление пространственной организации в развивающемся зародыше связывают с функцией так называемого морфогенетического поля (МП). Для эмбриологов — это первичное понятие, введение которого продиктовано экспериментами по хирургическому вмешательству в развитие.

В этих экспериментах при удалении сравнительно небольшой части клеточного материала зародыша в результате часто обнаруживают изменение судьбы в развитии всех оставшихся частей. Локальное действие проявляется в судьбе целого. Это и есть суть явления эмбриональных регуляций. Регистрируемую глобальную координацию в развитии частей зародыша приписывают единому морфогенетическому полю.

По мере развития такое же вмешательство вызывает значительно более локализованный эффект. Так, удаление части клеточного материала из области будущей конечности амфибий не мешает развитию целой конечности [255]. Но если удалена вся соответствующая область, нанесенный ущерб не восстанавливается. Таким образом, обнаруживается определенная автономность области, формирующей конечность.

Развитие таких независимых областей связывают с вторичными полями. В пределах вторичного поля эффект хирургических манипуляций не выходит за пределы этого поля. По мере развития зародыша первичное морфогенетическое поле замещается рядом вторичных. Для зародышей позвоночных выделяют поля конечностей, глаз, сердца и др.

Попытаемся систематизировать характерные признаки морфогенетического поля на примере процесса регенерации гидроидного полипа. При изоляции фрагмента туловища полипа он регенерирует полный организм, но так, что в ходе регенерации количество клеточного материала не увеличивается. Головной отдел при этом всегда формируется на одном из концов — том, который был ближе к голове до изоляции [30].

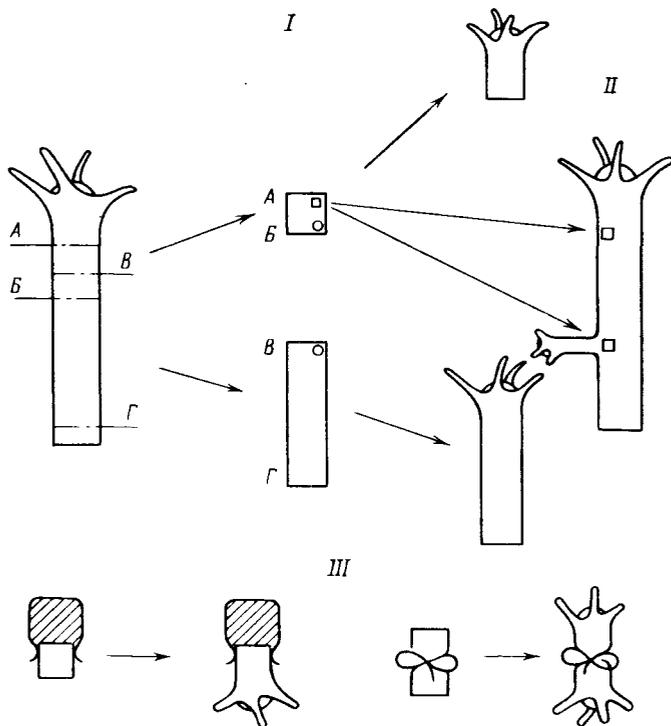


Рис. 2. Регенерация гидроплина из туловищного сегмента, обнаруживающая общие черты морфогенетического поля: *I* – одна и та же группа клеток (кружки) регенерирует головной отдел в одном сегменте (*БГ*) или остается туловищем в другом (*АБ*), *II* – поле подавления имеет ограниченный радиус действия, *III* – внешнее препятствие на презумптивном головном конце регенерирующего сегмента снимает подавление с противоположного конца; это же делает поперечная перегородка

Хотя в данном случае головной отдел формируется вполне определенной группой клеток туловищного сегмента, приписывать это каким-либо предсуществующим свойствам выделенных клеток, отсутствующим у других, неверно. Одна и та же часть туловища формирует голову в одном сегменте и остается туловищем в другом (рис. 2). С другой стороны, любая, наперед заданная часть туловища исходного животного может регенерировать голову, если на соответствующем месте отделена старая голова.

Таким образом, убеждаемся, что все клетки животного исходно одинаково способны регенерировать головной отдел. Тем не менее, после операции, уже в процессе регенерации выделяется часть из них, которая реализует данную способность. В этом смысле имеет место нарушение исходной однородности, что и является первым типичным признаком развития, контролируемого морфогенетическим полем.

Как и в изучаемых физикой полях, для МП можно указать его источник, генерирующий некоторое действие в своей окрестности. В данном

случае таким источником является формирующийся зачаток головы. Его действие на остальные клетки туловищного сегмента состоит в подавлении их способности к регенерации головного отдела. Это действие можно блокировать простой перетяжкой сегмента или подавлением развития головной закладки на обычном месте (см. рис. 2).

Характерным признаком, присущим первичным морфогенетическим полям, является способность регулировать пропорции развивающейся структуры. В опытах по регенерации большой и малый сегменты полипа регенерируют животное с подобным строением, т.е. примерно одинаковым отношением размеров головы к туловищу, — свойство размерной инвариантности.

Морфогенетическое поле обладает ограниченным радиусом действия (см. рис. 2, II). Типичная оценка последнего составляет ≤ 1 мм. В таком интервале умещается порядка ста клеток типичных размеров. Названные оценки близки для полей разных зачатков в зародышах разных видов [31]. Считается, что данная универсальность отражает общую физическую природу полей разных зачатков [31].

Возникновение МП, как правило, связано с внешним стимулом или с некоторой изначальной неоднородностью. В опытах по регенерации таким стимулом является сама операция отделения головной части. Но роль внешнего стимула в процессе формирования поля не больше, чем роль триггера, инициирующего автономный процесс. Хорошая иллюстрация такой автономности — опыты по индукции почкования в колонии гидрополипа [256]. Стимулом для развития нового побега в колонии может быть простой механический нажим на основной ствол (см. рис. 51). Однако такой стимул не контролирует весь процесс развития побега. Последний может осуществляться и после устранения нажима и даже на том месте, которое вообще не подвергалось воздействию.

Характерный радиус действия поля подавления не обязан совпадать с размерами той области зародыша, в которой может формироваться порождающий его зачаток. Если первый размер составляет небольшую часть второго, то возможно возникновение более или менее регулярной решетки повторяющихся зачатков. Это происходит, в частности, при морфогенезах зачатков различных структур кожного покрова — перьев, волосков, щетинок, чешуек, желез. Геометрия этой решетки может быть различной — для перьевых зачатков ее ячейки представляют собой правильные шестиугольники; волоски или щетинки часто организованы либо периодически повторяющимися рядами, либо вообще нерегулярно.

Перечисленные, чисто феноменологические признаки поведения дают представление о содержании самого понятия морфогенетического поля. Основная нагрузка этого понятия — объединить общие черты процесса формирования разнородных структур в развивающемся зародыше. Действительно, указанные признаки легко обнаруживаются при анализе экспериментального материала по закладке целого ряда органов — сердца, глаз, конечностей — у зародышей многих видов [17]. Дальнейшая задача состоит в выяснении физической природы МП. Для ее решения необходимо интерпретировать выделенные свойства в терминах физически измеряемых величин. Эта задача составляет один из основных предметов настоящего исследования.

Морфогенетическое поле определяет разметку структурообразования.

Позиционная информация. Приписываемые морфогенетическому полю черты общности в развитии разных зачатков предполагают одновременно ограниченность "сферы деятельности" МП, поскольку формирование разных зачатков включает в себя еще и разную специализацию клеток. Последнее определяется включением в разных доменах зародыша разных специфических наборов генов. Именно идея "позиционной информации" [31] позволяет выделить те процессы в морфогенетическом поле, о которых можно говорить, отвлекаясь от конкретной специализации клеток данной области зародыша.

Суть идеи состоит в следующем. Общий процесс структурообразования является существенно двухстадийным. В нем на первом этапе — прежде активации специфических генов — осуществляется пространственная разметка. Ею устанавливается группа клеток, в которой эта активация произойдет в следующий промежуток времени. Проявление специфической компетенции клеток поля данного зачатка приходится только на вторую стадию. В контроле пространственной разметки гены, экспрессия которых определяет специфическую дифференцировку, по-видимому, не участвуют [31, 32].

Такое разграничение подтверждается опытами с генетическими мозаиками [33, 34]. Мозаичные зародыши насекомых конструировались путем имплантации мутантных по какому-либо морфологическому признаку клеток в нормальный зародыш. Далее экспериментально решался вопрос, влияет ли мутация на сигнал, управляющий включением специфической активности клеток, или сигнал остается незатронутым, а мутацией изменена специфическая реакция на него. Если мутантные клетки развиваются в данном месте мозаики так же, как в гомологичном месте чистого мутантного зародыша, то справедлив второй вариант. Выяснилось, что для многих мутаций с морфологическим эффектом имеет место именно такая ситуация [33, 34]. Следовательно, разметки в мутантном и нормальном зародышах одинаковы.

В сжатом виде сказанное можно выразить формулой:

$$\begin{array}{l} \text{Специфическая} = \text{Универсальная} \times \text{Специфическая} \\ \text{структура} \quad \quad \quad \text{разметка} \quad \quad \quad \text{реакция} \end{array}$$

"Полевые" черты структурообразования, поскольку ими определяется то общее, что есть в развитии разных зачатков, относятся именно к разметке. В силу указанной универсальности принимается, что она (разметка) должна управляться на основе механизмов, характеризующих достаточно общие физические свойства клеток.

Координация активности клеток. Можно назвать два общих пути организации надклеточного порядка.

Первый путь — *пространственная сегрегация подвижных клеток (сортинг)* [35]. Данный механизм пространственного упорядочения показан в экспериментах с диссоциированными клетками эмбриональных тканей [36, 37]. Однако, насколько нам известно, при формировании пространственной организации в естественном развитии высших многоклеточных сортинг не играет роли. У низших этот механизм используется. В частности, установлена его ведущая роль на морфогенетической фазе цикла развития миксомицет *D. discoideum* (гл. III).

Второй путь предполагает *взаимную координацию активности клеток* на основе межклеточных взаимодействий. Одним из вероятных каналов таких взаимодействий является диффузия сигнальных молекул (морфогенов). Для ее обеспечения плазматическая мембрана имеет специализированные структуры — шелевые контакты [38, 39]. Хотя в литературе давно высказываются предположения о том, что этот канал межклеточной связи важен для осуществления разметки структурообразования, прямых данных на этот счет нет.

Наиболее близко относящиеся сюда результаты получены в последнее время на млекопитающих [42, 43], личинках насекомых [45, 46] и моллюсках [44]. При исследовании межклеточной диффузии красителей обнаружилось существование "коммуникационных компартментов" [46]. В экспериментах флуоресцирующие молекулы свободно диффундировали в пределах определенных областей эпидермиса личинки, но не проникали за границы этих областей [42–46]. Важно, что обнаруженные коммуникационные компартменты анатомически совпадают с компартментами однородной детерминации клеток [45, 46]. На основании этих данных предполагается, что возникновение и поддержание дивергенции путей развития сопровождаются и нуждаются в установлении коммуникационных барьеров между соответствующими пространственными доменами зародыша.

Диффузия сигнальных молекул — не единственное средство переноса информации между клетками. Другим таким средством являются прямые контактные взаимодействия. Обсуждение роли этого канала межклеточной связи в пространственной организации развития мы отложим до гл. IV. Там этот вопрос является основным предметом анализа.

§ 1.2. Математические модели контроля детерминации

До построения полных адекватных математических моделей селективного контроля активности генов при дивергенции клеточных типов в развитии пока еще очень далеко. Сейчас в этой области более насущны чисто экспериментальные вопросы.

При менее глобальной постановке вопроса математические модели все же могут оказаться полезными. В частности, математическое моделирование помогает оценить достаточность той или иной гипотетической молекулярной схемы для интерпретации свойства компетенции эмбриональных клеток.

Как уже отмечалось, свойство компетенции допускает общую *динамическую* интерпретацию. Согласно этой интерпретации компетентная клетка обладает *множественными* состояниями динамического равновесия, т.е. в термодинамическом смысле неравновесных, но устойчивых стационарных состояний. Названная мультистационарность должна быть производным свойством функционирования системы регуляции биосинтетического аппарата. Именно этот факт позволяет обосновать и проанализировать математическое моделирование.

В работах [47, 48] строится математическая модель и проводится анализ динамических режимов перекрестной регуляции двух генетических подсистем. Кинетические уравнения строятся на основе молекулярной схемы контроля генной экспрессии Жакоба–Моно, достаточно полной и универсальной для прокариотических клеток.

При вариации параметра, имеющего смысл меры интенсивности общего метаболизма, единственное устойчивое стационарное состояние может расщепляться на два – бифуркация триггерного типа. В результате этой бифуркации моделируемая генетическая система приобретает способность к выбору режима гомеостатического равновесия, что трактуется в работе [47] как прообраз возникновения компетенции у клеток зародыша многоклеточного организма.

Неформальным источником возникновения бистабильности является заложенное в модель предположение о взаимной репрессии транскрипции генов низкомолекулярными продуктами их активности. Если уровень репрессии достаточно высок, то активирована может быть лишь одна из двух сцепленных генетических подсистем; при этом вторая репрессирует ее.

Лавенда рассмотрел иную молекулярную схему также на базе модели Жакоба–Моно [49]. В его модели присутствует лишь один ген. Авторегуляция, обеспечивающая гомеостатические режимы, является производной от цепи обратных связей: ген – белок-фермент – метаболизм – индукция транскрипции. Нелинейным звеном в этой цепи является связывание индуктора с репрессором, которое должно быть кооперативным. При достаточно высокой кооперативности появляется возможность бистабильного режима активности гена.

Иной – более феноменологический подход – применил Эдельштейн [50]. Он не пытается вывести авторегуляцию в системе биосинтеза, но постулирует ее. Общая принципиальная схема обратных связей в динамике биосинтеза подразумевается той же самой: активность генов – метаболизм – активность генов. Но конкретные уравнения не строятся индуктивным путем, а вводятся феноменологически. При этом используются данные экспериментов по индукции лактозного оперона бактерии *E. coli* [51]. Снова оказывается, что в фазовом пространстве так сформулированной динамической модели имеется две устойчивые особые точки.

Далее машинный анализ с привлечением числовых значений параметров, взятых из эксперимента [51], показал, что из любого начального состояния фазовая траектория быстро (в течение минут) оказывается вблизи выделенной линии на фазовой плоскости – одной из нуль-изоклин системы. Дальнейшая эволюция происходит вдоль этой линии, занимает существенно большее время (часы) и приводит систему к одному из устойчивых стационаров [50]. Таким образом, темп-лимитирующая стадия динамической системы регуляции активности гена сохраняет единственную универсальную эволюционирующую степень свободы [50].

Считается вполне вероятным, что основополагающие биохимические механизмы гомологичных режимов функционирования (например, селективной активации генов) сходны у одноклеточных и многоклеточных [16]. Даже если контроль работы генов у последних обеспечивается более сложным механизмом, общее представление о детерминации эмбриональных клеток как о состоянии гомеостатического равновесия от этого не должно измениться. Мы будем пользоваться этим представлением в основной части работы.

§ 1.3. Математические "механизмы" самоорганизации

Каким образом компетентные к выбору пути развития клетки зародыша выбирают правильное состояние детерминации и как при этом обеспечивается согласованное действие множества клеток? Большинство теоретических разработок в литературе представляет собой вариации общей темы "позиционной информации".

После Тьюринга основной, базовой, моделью формирования позиционной информации оказалась модель на основе "диффундирующих морфогенов". Тьюринг впервые указал "математические механизмы", по которым химические реакционные смеси могут самопроизвольно расслаиваться в макроскопических масштабах, порождая при этом пространственно регулярные структуры распределения концентраций реагентов [52]. По мысли Тьюринга пространственный контроль морфогенетической активности клеток осуществляется молекулярными агентами – морфогенами – так, что паттерны клеточной активности являются продуктом и отображением самоорганизующихся "химических препаттернов".

Работой [52] была стимулирована постановка широкого круга задач, имеющих в значительной степени формальный характер. Развитие исходной идеи Тьюринга о "химической основе морфогенеза" происходило так, что "математические механизмы" самоорганизации макроскопического порядка оказались исследованными самым тщательным образом, но практически никакого продвижения к фактическому обоснованию идеи сделано не было. И хотя сейчас, спустя более тридцати лет после работы Тьюринга, пока преждевременно обсуждать "химические основы морфогенеза", выдающееся значение этой работы остается бесспорным. Однако понимать это значение следует более широко – оценивая его не как "химическую", а скорее как "математическую основу морфогенеза". Продуктом развития математической стороны идеи Тьюринга стала современная теория "диссипативных структур" – одна из основных глав новой междисциплинарной области естествознания – синергетики. Некоторые положения этой теории представляются ниже.

Диффузионная неустойчивость и самоорганизация микроскопического порядка. Тьюринг ввел в рассмотрение новый формальный объект – системы "реакция–диффузия" (Р–Д-системы). В Р–Д-системе Тьюринга диффундируют и взаимодействуют посредством взаимных химических превращений два гипотетических агента – морфогена. Макроскопические уравнения, управляющие эволюцией распределений концентраций X и Y , выглядят следующим образом:

$$\partial X/\partial t = P(X, Y) + D_X \nabla^2 X, \quad \partial Y/\partial t = Q(X, Y) + D_Y \nabla^2 Y. \quad (1)$$

Существенным является предположение о наличии авто- и кросскаatalитических звеньев в превращениях X и Y , благодаря которым функции локальной динамики X и Y оказываются нелинейными.

Граничные условия предполагаются вполне симметричными, а все параметры системы пространственно однородными. В такой ситуации естественно ожидать в качестве асимптотического режима гомогенное распределение $\bar{X}, \bar{Y} \equiv \text{const}$, определяемое уравнениями

$$P(X, Y) = Q(X, Y) = 0. \quad (2)$$

В условиях термодинамического равновесия — в замкнутом по отношению к субстратам и продуктам реакций объеме — данный режим является единственным устойчивым [53]. В открытой системе потоки вещества через реакционный объем могут удерживать состояние на определенной "дистанции" от термодинамического равновесия [3, 4]. Это является необходимым условием возникновения принципиально нового поведения — спонтанного понижения симметрии макроскопического состояния [4].

В основе механизма данного явления лежит так называемая диффузионная неустойчивость. Малые возмущения δX , $\delta Y(\vec{r}, t)$ гомогенного состояния \bar{X} , \bar{Y} , обладающие определенной пространственной асимметрией, могут не затухать, как в привычной ситуации вблизи термодинамического равновесия, а напротив — усиливаться до макроскопических масштабов [3–5].

Такая неустойчивость содержит в себе предпосылки к самоорганизации. Процессы химического превращения и диффузии имеют статистическую природу — микроскопические возмущения возникают в них естественным образом в результате флуктуаций. Несмотря на априорную неорганизованность флуктуационных возмущений, способность к селективному усилению некоторой выделенной моды возмущений (диффузионная неустойчивость) должна приводить к развитию макроскопической организации. Таким образом, флуктуации и неустойчивость приводят к самопроизвольному становлению пространственного порядка — порядка через флуктуации [4].

Формальная модель (1), позволившая Тьюрингу установить принципиальную возможность описанного механизма самоупорядочения, особого значения не имеет. Она важна не более чем средство демонстрации сути достаточно общего механизма. Целый ряд физических и физико-химических систем обнаруживают поведение, в основе которого лежит этот механизм. Сюда относятся: расслоение в химической смеси Белоусова–Жаботинского, стратификация газового разряда, установление ячеистых структур Бенара в слое неравномерно прогретой жидкости и др. (см. более обстоятельный разбор этих явлений в монографиях и обзорах [3–5, 54]).

Хакен, занимавшийся теорией генерации когерентного излучения в лазерах, одним из первых обратил внимание на общую суть явлений зарождения макроскопической упорядоченности в разнородных по природе объектах [55].

Макроскопически неоднородные состояния, зарождающиеся вдали от термодинамического равновесия в результате спонтанного нарушения симметрии, принято называть "диссипативными структурами".

Два режима генерации диссипативных структур.

а) "Мягкий" режим. При мягком режиме нарушение однородности и формирование диссипативной структуры происходят за порогом асимптотической неустойчивости гомогенного состояния. В этом случае никаких специальных десимметризирующих факторов — ни внешних, ни начальных — не требуется. Переход может индуцироваться естественными микроскопическими флуктуациями. В данном режиме генерации амплитуда структуры (т.е. амплитуда отклонений от исходного гомогенного состояния) мала в меру близости к порогу ее зарождения, а характер пространственной

организации определяется конфигурацией неустойчивых мод. Таким образом, можно предсказывать геометрические характеристики структур на основе линейного анализа динамики малых возмущений.

б) "Жесткий" режим. Переход в макроскопически неоднородное состояние в этом режиме подобен равновесному фазовому переходу первого рода тем, что состояние при нем меняется скачком (в отличие от непрерывного изменения при "мягком" переходе).

В данном случае существование диссипативных структур как асимптотического режима соответствующей кинетической системы не находится в связи с потерей асимптотической устойчивости однородного состояния. Переход может быть осуществлен до порога неустойчивости исходного состояния, но микроскопические возмущения для этого уже недостаточны. Такой переход требует внешнего стимула.

Формальное исследование диссипативных структур при двух названных режимах генерации проводится разными методами на основе различных приближений.

Рассмотрим формальные результаты по мягкому зарождению диссипативных структур. Главной особенностью перехода данного типа является наличие выделенной медленно релаксирующей степени свободы, какой является коллективная мода возмущения, нарушающего устойчивость однородного состояния. Этот факт позволяет провести полный анализ развития неустойчивости и стабилизации диссипативной структуры в окрестности порога ее генерации. Продвинуться удается благодаря возможности существенной редукции описания динамики.

Основой процедуры редукции служит общая идея Боголюбова [57]. Содержание ее, как известно, таково: если в системе со многими степенями свободы можно выделить ряд переменных (секулярные переменные), временные масштабы изменения которых велики по сравнению с временами релаксации прочих степеней свободы, то эти медленные изменения должны подчиняться замкнутому – "макроскопическому" – описанию. Вблизи порога диффузионной неустойчивости секулярным параметром является амплитуда коллективной неустойчивости моды [5].

Редукция динамического описания достигается путем перехода от локальных динамических переменных (концентраций X , Y в уравнениях (1)) к набору коллективных. Полный набор коллективных переменных составляют нормальные моды линеаризованных вблизи гомогенного состояния (\bar{X}, \bar{Y}) кинетических уравнений (1). Эти моды представляют собой собственные функции диффузионного оператора ∇^2 и хорошо известны для областей с относительно простой геометрией [58].

Общие методы получения редуцированных кинетических уравнений для коллективных переменных, базирующиеся на групповом подходе, разрабатывались Сэтинджером [59]. Иные, так называемые мультискейлинговые процедуры, успешно применялись для вывода макроскопического описания в работах [60, 61].

Для процедуры построения редуцированного описания мало существен вид исходной кинетической системы в локальных переменных. Реакционно-диффузионные модели типа (1) могут иметь при этом произвольное число таких переменных. Общая форма редуцированного описания от этого не зависит и имеет для размерности пространства единица вид обобщенно-

го уравнения Гинзбурга—Ландау [56]. Число параметров, полностью определяющих "макроскопическую" динамику, невелико. Так, для уравнения Гинзбурга—Ландау, их два. Эти два параметра являются известными комбинациями, вообще говоря, большого числа параметров исходной кинетической системы [56, 60]. Они содержат в себе всю существенную для становления макроскопического порядка информацию о реакционно-диффузионной модели.

Таким образом, для генерации пространственного порядка в режиме мягкого возбуждения удастся построить *универсальное* описание. Это описание дает полную информацию о макроскопической (крупномасштабной и медленной) динамике становления порядка, т.е. о геометрии формирующегося порядка, и о том, как во времени протекает этот процесс.

Наконец, вблизи порога мягкого зарождения малоамплитудные диссипативные структуры можно исследовать методами теории возмущений [4, 62]. Наличие малого параметра — амплитуды отклонения от исходного гомогенного состояния — позволяет аппроксимировать нелинейную задачу последовательными линейными приближениями [62].

Приведем анализ структур конечной амплитуды. Такие структуры, возникающие в *жестком* режиме генерации, не поддаются исследованию методами, пригодными для мягкого режима. Переход от локальных переменных к коллективным в данном случае неконструктивен, поскольку в негомогенные состояния с конечной амплитудой дают сопоставимый вклад гармонические моды широкого интервала значений волнового числа. Никаких универсальных методов теоретического анализа таких состояний не существует.

Однако при наличии малых внешних параметров в задаче (1) иногда удастся продвинуться, не прибегая к численному решению. Так, в работах [63—67] для Р-Д-модели (1) с резкой диспропорцией характерных диффузионных длин $r_{X,Y} \sim \sqrt{D_{X,Y} \tau_{X,Y}}$ удалось достаточно полно охарактеризовать многообразие возможных разновидностей диссипативных структур.

В данном случае структуры оказываются "контрастными" — в них относительно протяженные участки плавных изменений переменных X, Y ($\Delta r \sim r_X$) разделены узкими зонами резких изменений "короткодействующей компоненты" ($\Delta r \sim r_Y$). Конкретные профили распределений $\bar{X}, \bar{Y}(\bar{r})$ в контрастных структурах зависят от вида нелинейных функций P, Q в системе (1). В цитированных работах [64, 65] предлагается графический алгоритм построения контрастной структуры на основании вида нуль-изоклин на фазовой плоскости $\{X, Y\}$.

В работах [68, 69] предлагается: малому параметру — отношению характерных диффузионных длин — добавить еще один в реакционной части Р-Д-модели: постулируется существование иерархии характерных временных масштабов в точечной динамике. В этом случае появляется возможность редукции кинетической модели на базе теоремы Тихонова. Достаточно произвольная реакционно-диффузионная модель при наличии двух названных диспропорций масштабов сводится методом редукции по Тихонову к одной из двух "базовых" кинетических систем. Ими моделируются два характерных типа контрастных структур — пиковые и доменные [68, 69].

Механизм возникновения диффузионной неустойчивости. Формальный результат Тьюринга о возможности неустойчивости, нарушающей симметрию в двухкомпонентной динамической системе реакция – диффузия, можно объяснить качественно на конкретном примере такой системы.

Пусть "реакционная" часть представляет собой автокаталитическое воспроизводство одного реагента (активатора), его кросскаталитический эффект в динамике другого (ингибитора) и общее подавляющее действие последнего. Серия Р–Д-моделей такого типа была предложена, достаточно обстоятельно проанализирована численными методами и широко использована для интерпретации процессов формирования эмбриогенетических паттернов Гирером и Майнхардтом [70–74]. Один из конкретных вариантов кинетических уравнений модели "активатор – ингибитор" имеет вид

$$\begin{aligned} \frac{da}{dt} &= ca^2/h - \mu a + D_a \partial^2 a / \partial x^2, \\ \frac{dh}{dt} &= ca^2 - \nu h + D_h \partial^2 h / \partial x^2. \end{aligned} \quad (3)$$

Понижение пространственной симметрии поля концентраций a , h возникает по следующему механизму. При достаточно больших значениях параметров μ и ν однородное состояние, в котором автокатализ подавлен ингибитором, асимптотически устойчиво. Пусть каким-либо образом в начальный момент времени локально создан избыток активатора. При достаточной амплитуде этого возмущения нелинейное автокаталитическое воспроизводство a доминирует над ингибированием, так что активатор начинает с ускорением накапливаться. Параллельно – за счет кросскатализа – локально нарастает и количество ингибитора. Необходимо, чтобы последнее происходило без запаздывания, для чего кинетический коэффициент ν должен быть достаточно велик. Тогда ингибитор сможет остановить неограниченное локальное производство активатора.

Далее, для того чтобы активация не распространялась на весь реакционный объем, но удерживалась в ограниченных пределах, необходимо, чтобы ингибитор обладал большей диффузионной подвижностью, чем активатор: $D_h > D_a$. Тогда вне области активации образуется избыток ингибитора, препятствующий включению автокатализа.

Таким образом, очевидно, должно установиться пространственное расслоение – концентрации агентов a и h относительно велики в ограниченной области и малы в ее окрестности. Численное решение уравнений (3) качественно ничего не добавляет [72, 73].

Добавим, что по этому же механизму и в рамках тех же кинетических уравнений могут возникать и пространственно регулярные – периодические – диссипативные структуры [72]. Однако исходное гомогенное состояние при этом должно оказаться асимптотически неустойчивым.

Краткой словесной формулой описанного механизма возникновения макроскопически неоднородных состояний является "локальный автокатализ и латеральное ингибирование" [70]. В более широком смысле (не обязательно приписывая автокатализ одному выделенному агенту, а ингибирование – другому) данный механизм является уже не просто возможным, но универсальным. В этом мы убедимся в § II. 3.

§ 1.4. Модели формирования паттернов клеточной дифференцировки

Мы представим две таких модели из литературы. Обе модели относятся к раннему эмбриогенезу насекомых и интерпретируют процесс пространственной самоорганизации плана строения личинки на основе идеи о диффундирующих морфогенах как источнике позиционной информации.

Основной план строения личинки становится доступным для прямого наблюдения примерно на четвертый день развития — на стадии зародышевой полоски. Он устанавливается в виде линейной последовательности сегментов — двух головных, трех грудных и 7–10 брюшных [75]. Имеющиеся в большом количестве сведения по нарушениям организации зародышевой полоски, возникающим в контролируемых экспериментальных ситуациях [75], обеспечивают хороший тест для теоретических моделей.

Интересный период развития продолжается на протяжении формирования бластодермы. Именно в этот период клетки "получают инструкции" к выбору направления дальнейшей специализации и формируют первичные эмбриональные паттерны — паттерны детерминации основных личиночных структур [75, 76].

Майнхардт предлагает следующую модель самоорганизации осевой упорядоченности этих инструкций [77]. Постулируется, что позиционная информация, организующая паттерны клеточной детерминации, устанавливается в виде монотонного профиля концентрации некоторого морфогена с максимумом и минимумом соответственно на заднем и переднем полюсах яйца [77]. Формирование градиента концентрации морфогена приписывается механизму химической самоорганизации, представленному в предыдущем разделе. При этом, как и в любой модели, опирающейся на идею позиционной информации, считается, что клетки детерминируются в соответствии с *локальным* уровнем концентрации морфогена.

Характерный набор типов детерминации "транслируется" с единого монотонного профиля концентрации морфогена благодаря существованию "градиента порогов" включения различных программ развития. Наивысшим по концентрации морфогена порогом обладают терминальные сегменты брюшка, наинизшим — передние головные сегменты [77].

Концентрационный профиль $\bar{h}(x)$, полученный из численного решения математической модели (3), и разметка яйца на зоны презумптивных сегментов, полученная в опыте [78], дают градуировку шкалы концентрации морфогена h . Далее она используется при интерпретации экспериментально индуцированных аномалий в сегментарной организации зародыша.

Такие воздействия, как лигатура, ультрафиолетовое облучение, прокол яйца, как предполагается в [77], не затрагивают порогов детерминации, но искажают задающий позиционную информацию профиль $\bar{h}(x)$. Это искажение предсказывается расчетным путем из модели (3). Затем на основании уже имеющейся градуировки шкалы концентрации морфогена восстанавливается индуцированная аномальная последовательность сегментов.

Таким образом Майнхардту [77] удалось количественно описать эффект лигатуры, состоящий в уменьшении числа сегментов в каждом

из изолированных фрагментов яйца [75]. Модель дает также довольно естественное объяснение развитию симметричных, двубрюхих личинок при УФ-облучении и аналогичному эффекту прокола [79, 80].

Вместе с тем гипотеза о монотонном градиенте порогов детерминации вызывает серьезные возражения [11, 81]. В частности, к ее недостаткам относится пренебрежение обширной и содержательной информацией о компартментационном пути развития личинки [7, 8]. Игнорируются также данные о спонтанной трансдетерминации клеток зародыша [19], позволяющие установить кодовую таблицу детерминации независимо от предположений о природе и характере позиционной информации. Более того, можно указать на противоречие предсказаний из данной модели упомянутым выше экспериментальным данным. Из последних следует, что структуры личинки, прелокализованные на противоположных полюсах бластодермы, — гениталии и антенны — имеют близкие программы развития, т.е. не имеют промежуточных типов детерминации [11]. Это обстоятельство никак не укладывается в гипотезу о монотонном градиенте порогов детерминации. Согласно последней, анатомически удаленные структуры личинки должны быть разделены относительно большим числом промежуточных типов детерминации.

Модель формирования эмбриональных паттернов на основе комбинаторного кода детерминации [11, 82]. Данная модель предложена Кауфманом и отличается используемой кодовой таблицей детерминации.

На основании обширного экспериментального материала [7–9] считается, что процесс сегрегации линий по-разному детерминированных клеток является не одноактным событием, а дискретной последовательностью детерминационных шагов [82]. Каждый шаг независим от других и состоит в реализации бинарного генетического выбора (включение — исключение соответствующего гена — гена-селектора) в одной из нескольких генетических подсистем. Сделанный выбор запоминается клетками в их последующем развитии. Типы детерминации, соответствующие различным личиночным структурам, определяются комбинациями состояний реализации выбора в задействованных генетических подсистемах [7–9].

В данной модели пространственные области зародыша с различной детерминацией также определяются на основе концентрационных профилей морфогена. Однако в отличие от предыдущей модели, здесь это не единый химический градиент. Последовательные детерминационные шаги в развитии клеток зародыша, по Кауфману [82], определяются закономерной сменой профиля концентрации морфогена. В качестве вероятной причины этой смены Кауфман указывает на падение латеральной диффузионной подвижности морфогена, которое должно сопровождать формирование клеточного монослоя бластодермы.

Каждый акт реорганизации концентрационного профиля морфогена управляет очередным детерминационным шагом для всех клеток бластодермы. При этом для всех клеток включается или не включается один и тот же ген-селектор в зависимости от локального уровня концентрации морфогена. В данной модели на весь интервал изменения концентрации морфогена приходится лишь один порог переключения детерминационного триггера.

В окрестности диффузионной неустойчивости падение коэффициентов диффузии должно вызывать переход ко все более коротковолновым диссипативным структурам. Этим обстоятельством в модели Кауфмана объясняется прогрессивная регионализация развития зародыша.

Ряд фактов, в объяснении которых модель единого монотонного градиента [77] испытывает трудности (данные по трансдетерминации [19] и гомеозисным мутациям [8, 9]), модель на основе комбинаторного кода детерминации хорошо объясняет. В то же время при интерпретации экспериментально индуцируемых аббераций эмбриональных паттернов последняя модель явно уступает первой. Попытка преодолеть это затруднение, не отказываясь от идеи о комбинаторном коде детерминации, но на основе иной посылки относительно пространственного контроля детерминации была предпринята нами в работе [83].

Безотносительно к вопросу о механизме регионализации развития зародыша идея о комбинаторном коде детерминации кажется очень реалистичной. Сейчас ее можно аргументировать не только на основе данных по трансдетерминациям, являющихся предпосылкой исходной формуловки.

Проявление так называемых гомеозисных генов в раннем развитии и фенотипические эффекты мутаций по ним позволяют рассматривать эти гены кандидатами на роль генов-селекторов [7, 8]. В последнее время удалось существенно продвинуться в понимании работы этих генов [84–86]. Прямо показано появление их транскриптов на ранних стадиях развития в тех областях зародыша, где прелокализованы соответствующие структуры личинки. Еще более значительным является открытие факта гомологии гомеозисных генов плодовой мушки с генетическим материалом очень многих видов животных, в том числе и человека [86]. На этом основании высказываются предположения о существовании некоторого универсального механизма, управляющего пространственной организацией развития [86].

Сейчас, когда поиск ведется не только в рамках теоретического моделирования, но благодаря развитию новых мощных экспериментальных методов приобретает хорошую фактическую основу, можно ожидать, что темпы развития данной области существенно ускорятся.

Новые модели и механизмы самоорганизации развития. Тезис о позиционной информации дает очень общее объяснение того, каким путем в коллективах эмбриональных клеток регулируется пространственная упорядоченность развития. Более конкретный механизм, в котором за пространственную разметку отвечает химическая диссипативная структура, имеет существенный дефект. Этот механизм оказывается практически недоступным прямой экспериментальной проверке [74].

Пока лишь для одного организма – пресноводной гидры – удалось установить вещества с активностью гипотетических морфогенов [87–89] и показать наличие их градиента вдоль оси морфологической полярности [90]. Однако считать этот градиент первичным источником, а не откликом на позиционную информацию, пока нет оснований.

В целом модели формирования эмбриональных паттернов на основе химических градиентов, хотя и продемонстрировали достаточную описа-

тельную силу, так и не получили надежного экспериментального подтверждения (см. обсуждение данного обстоятельства в монографии [74]).

В последнее время положение дел с фактическим обоснованием теоретических моделей самоорганизации эмбриональных паттернов стало улучшаться. Однако в основе этих новых моделей лежат уже иные физические механизмы. Ведущая роль в них отводится механической активности клеток.

Многие эмбриональные клетки, помещенные на упругий субстрат, способны вызывать в нем значительные натяжения [91, 92]. Так, фибробласты, посеянные на тонкую резиновую пленку, прикрепляются к ней; при этом поверхность пленки сминается под клеткой и одновременно натягивается вокруг нее [91]. Натяжения ощутимы на расстояниях порядка сантиметров от генерирующей их клетки.

Если культура фибробластов гомогенно диспергирована в матриксе коллагенового геля и сжатию геля как целого препятствует прикрепление его границ, то исходно однородная смесь клетки — матрикса разбивается со временем на сгустки клеток и сжатого ими матрикса [93]. В промежутках между такими сгустками обнаруживают ориентированные тяжи коллагеновых волокон. Объемные структуры, генерируемые такой механической неустойчивостью, варьируют в зависимости от плотности клеточной популяции [93]. В частности, обнаруживаются и пространственно регулярные картины.

По всей видимости, механизм неустойчивости, который в описанном эксперименте приводит к расслоению популяции фибробластов, работает и в естественном эмбриогенезе [94]. В частности, при формировании конечностей ему может быть приписана конденсация хондроцитов (хрящевых клеток) и закладка костей в растущей почке конечности [94].

В экспериментах с культурами клеток на подложке выявляется набор элементарных реакций взаимодействия между активной клеткой и пассивной поверхностью. Среди этих реакций: прикрепление клетки к подложке, сопровождающееся деформацией клетки и натяжением подложки, перемещение клетки вдоль поверхности, представляющее собой случайное блуждание, когда поверхность однородна, а при наличии градиента адгезивности (неоднородного распределения плотности мест связывания) — направленное по этому градиенту [95].

Названные реакции не представляют труда выразить формальным образом. В работе [96] была предложена математическая модель популяции активных клеток на упруго деформируемом субстрате. Несмотря на громоздкость (десять безразмерных параметров), ее удалось аналитически исследовать на возможность неустойчивости тьюрингова типа. Вывод такой: элементарные реакции взаимодействия механически активных клеток с эластичным субстратом являются достаточной предпосылкой самопроизвольной организации клеток в пространстве [96].

Не только упорядоченное размещение, но и дифференцировка клеток может контролироваться тем же механизмом. Известно, что дифференцировка хондробластов в хрящевые клетки индуцируется конденсацией клеток и внеклеточного матрикса [97]. Тем самым роль гипотетического морфогена при формировании хряща, по-видимому, исполняется взаимодействием клеток с эластичным матриксом. Механическая неустойчи-

вость, предпосылки которой заложены в этих взаимодействиях, может нести морфогенетические функции, обычно приписываемые химической неустойчивости Тьюринга и реакционно-диффузионным системам [96].

В целом, можно считать, что математические подходы к теории пространственного контроля развития уже достаточно основательно разработаны. Однако самой теории по существу нет. Имеющиеся математические модели способны неплохо имитировать наблюдаемые явления при формировании морфогенетических структур. Но это не более чем формальная имитация, которая нисколько не проясняет вопроса о реальных движущих силах и механизмах, лежащих в основе этого процесса. Из большинства математических моделей не следует ни постановка нового эксперимента, ни указание на существенные параметры эмбрионального материала или факторы внешних условий, которые контролируются в эксперименте и контролируемо влияют на формирование эмбриональных паттернов. Задачей настоящего исследования является попытка приблизиться к формулировке теории формирования эмбриональных паттернов, базирующейся на постулатах, взятых из эксперимента, и имеющей дело с параметрами, контролируемыми в эксперименте.

Г Л А В А П

ФОРМАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ПЕРВИЧНОГО УПОРЯДОЧЕНИЯ В МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОМ ПОЛЕ

Элементарным звеном в общем процессе становления пространственной организации зародыша является акт упорядочения на уровне морфогенетического поля. Клетки поля исходно идентичны и обладают однородной компетенцией. Результирующим состоянием является пространственное расслоение — определенная область поля детерминирована по пути развития зачатка в соответствии с компетенцией поля, остальные клетки развиваются по программе альтернативного выбора (§ I.1).

Наши ближайшие задачи: а) формальное представление существенных элементарных свойств поля и постановка вопроса о нарушении симметрии исходного состояния, б) анализ условий появления расслоения и его устойчивости.

§ П.1. Формальное представление элементарных свойств поля

а) Д и н а м и ч е с к а я м о д е л ь к о м п е т е н ц и и. Фундаментальной чертой компетенции эмбриональных клеток, о которой можно говорить, отвлекаясь от конкретной природы поля (типа формирующегося в нем зачатка), является потенциальная множественность режимов динамического равновесия (§ I.1). При динамическом описании это свойство представляется следующим образом.

Состояние клетки задается вектором a в некотором фазовом пространстве. Среди компонент этого вектора могут быть концентрации активных молекул (см. § I.2), параметры, характеризующие физическое состоя-

ние клеток, например их морфологическую поляризацию (см. § IV.2), и др. Фактически мы не располагаем информацией о детальной структуре этого вектора, поэтому в конкретных задачах будем опираться на чисто феноменологическое описание.

Самая общая форма уравнений движения для компонент a_i вектора состояния имеет вид

$$da_i/dt = \tau_i^{-1} F_i(\{a_i\}). \quad (1)$$

Множитель τ_i в правой части задает масштаб времени эволюции соответствующей компоненты.

В некотором выделенном масштабе, определяемом масштабом времени интересующих нас процессов, существенно динамической, как правило, оказывается лишь небольшая часть параметров a_j . Остальные меняются на временах, либо существенно больших, либо существенно меньших τ_j [20].

Интересующий нас масштаб времени – порядка часа (характерное время формирования структуры в морфогенетическом поле) [31, 98]. В такой временной шкале протекают морфологические перестройки клеток и активируются биосинтезы белков на уровне трансляции [99]. Такие преобразования в ходе развития, как смена компетенции эмбриональных клеток, попадают в более медленную шкалу времени ($\tau \sim 10$ ч) [99].

С помощью стандартной процедуры редукции по методу квазистационарных концентраций [20] порядок кинетической системы (1) понижается до числа параметров с характерным временем динамики, близким к τ_j . Минимальное число существенных динамических степеней свободы в векторе состояния определяется характером рассматриваемого процесса. Так, ритмические процессы требуют для описания не меньше двух таких степеней свободы. Более сложное – нерегулярное во времени – поведение нуждается для описания по крайней мере в трех кинетических параметрах [5]. Ни тот, ни другой тип поведения нас сейчас не интересует.

Для формального представления свойства компетентности эмбриональных клеток достаточно одной динамической переменной. Такая "минимальная" модель и принимается ниже. Эта модель идейно близка феноменологической трактовке равновесных критических явлений в терминах параметра порядка [100].

Итак, считаем, что темп-лимитирующим в эволюции вектора состояния a_i является движение лишь *по одной степени свободы* $a_j \equiv a$ (§ I.2). Условно будем называть его эффективным параметром детерминации (ЭПД). Поскольку параметр a считается темп-лимитирующим, его кинетика автоматически должна быть подчинена замкнутому описанию уравнением вида

$$da/dt = f(a) + p. \quad (2)$$

Характер нелинейной функции $f(a)$ определен постулируемым свойством *бистабильности* (§ I.2). Соответствующий И-образный вид кривой $f(a)$ показан на рис. 3. Данный вид зависимости обеспечивает существование двух устойчивых в малом стационарных состояний $a_{cT} = a_1$ и $a_{cT} = a_2$, которые ассоциируются с двумя типами клеточной детерминации.

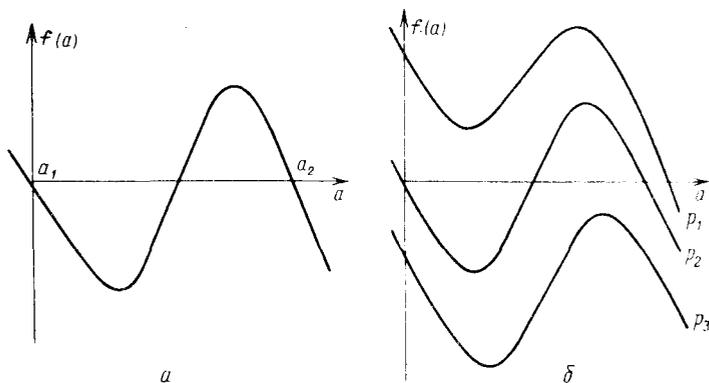


Рис. 3. Характерный вид функции локального контроля динамики ЭПД (а) и изменение этого вида при вариации управляющего параметра p (б); $p_1 < p_2 < p_3$; a_1 и a_2 — устойчивые стационарные состояния

Отдельно стоящее слагаемое p в уравнении (2) несет функцию управления детерминацией. В динамической модели (2) рост p приводит к относительной стабилизации правой особой точки (вплоть до исчезновения левой как стационарного состояния). Соответственно можно говорить о реализации выбора из состояния компетенции в пользу типа детерминации a_2 . При обратном движении параметра p осуществляется "альтернативный выбор".

б) Описание межклеточных связей. При описании морфогенетического поля межклеточные связи несут двойную нагрузку. Во-первых, они обуславливают кооперативность — множества клеток с однотипной детерминацией формируют компактные области. Во-вторых, они же должны препятствовать распространению однородной детерминации на все поле, т.е. обуславливают пониженную симметрию его конечного состояния по сравнению с исходным.

В уравнении движения ЭПД для одиночной клетки (2) параметр p исполняет функцию внешнего контроля детерминации. Связи, координирующие активность клеток в поле, должны быть включены именно в этот параметр. В соответствии с выделенными выше функциями этих связей можно предложить следующую, достаточно общую форму представления параметра p :

$$\begin{aligned}
 p^k = & \sum_j \varphi(a^k, a^j) + \sum_m \sum_q F_m(\bar{x}^k - \bar{x}^q) b_m(a^q) - \\
 & - \sum_n \sum_q \Phi_n(\bar{x}^k - \bar{x}^q) c_n(a^q).
 \end{aligned} \quad (3)$$

Здесь индексы k, q, j соответствуют какой-либо, определенной заранее, нумерации клеток в поле. Первое слагаемое в выражении (3) учитывает контактные взаимодействия k -й клетки с ближайшими соседями. Второе и третье слагаемые соответствуют дистантным взаимодействиям, вообще говоря, со всеми остальными клетками поля. Таким взаимодействием является и диффузионный обмен сигнальными молекулами. В этом случае

ядра F , Φ имеют вид

$$F_n, \Phi_m \sim \exp \left[-\frac{|\bar{x}^k - \bar{x}^q|}{R_{n,m}} \right]. \quad (4)$$

Функции b_m, c_n определяют уровень секреции сигнальных веществ M, N .

Разные знаки перед двумя последними суммами в выражении (3) отражают две антагонистические нагрузки на межклеточные взаимодействия в поле (компактность областей однотипной детерминации — с одной стороны, и расслоение поля на области с разнотипной детерминацией — с другой).

Далее мы не будем иметь дело с общим выражением (3), а примем следующие, упрощающие его допущения. 1. Поле одномерно. 2. Функции b, c линейны и $m = n = 1$. 3. Распределения a^i — достаточно "гладкие", так что $|a^i - a^{i \pm 1}| \ll a^i$.

Последнее ограничение позволяет перейти к непрерывному описанию, при котором роль номера клетки исполняется ее координатой. Далее, в силу этого же ограничения мы можем оставить в разложении функции φ по степеням малой разности $(a^i - a^{i \pm 1})$ только линейный член $\sim (a^i - a^{i \pm 1}) *$.

Перейдя к непрерывному представлению, получим вместо (3)

$$p(x) = D \frac{\partial^2 a}{\partial x^2} + \int F(|x - x'|) a(x') dx' - \int \Phi(|x - x'|) a(x') dx'. \quad (5)$$

В соответствующих местах работы (§ III.5, IV.2), где мы будем иметь дело с конкретными моделями межклеточных взаимодействий, частные формы выражения (5) будут выведены из более элементарных посылок.

С выражением (5) уравнение движения для теперь уже распределенно (по ансамблю клеток) ЭПД приобретает вид

$$\frac{\partial a}{\partial t} = f(a) + D \frac{\partial^2 a}{\partial x^2} + \int F(|x - x'|) a(x', t) dx' - \int \Phi(|x - x'|) a(x', t) dx'. \quad (6)$$

в) Две постановки вопроса. Спонтанное нарушение симметрии и упорядочение поля "источниками" и "стоками". В начале предыдущего пункта мы выделили два характерных коллективных эффекта, присущие морфогенетическому полю. Относя эти эффекты только на счет межклеточных связей, мы подразумевали полную автономность поля в процессе его самоупорядочения. Это соответствует постановке вопроса об истинной самоорганизации, т.е. *спонтанном нарушении симметрии макроскопического состояния при полностью симметричных начальных и внешних условиях*.

Однако условие отсутствия внешних стимулов к расслоению вовсе не является универсальным для проблемы структурообразования в эмбрио-

*) Принято во внимание то обстоятельство, что по смыслу выделения p как параметра внешнего управления в уравнении (2) должно быть $\varphi(0) = 0$.

генезе. Напротив, для реальных морфогенетических полей, как правило, можно указать предсуществующую в той или иной форме внешнюю пространственную асимметрию. Так, в большинстве случаев эмбриогенеза уже яйцеклетка обладает такой асимметрией (ооплазматическая сегрегация [17]). Это не означает, однако, что каждой клетке зародыша в дальнейшем развитии изначально или извне предписана жесткая судьба (т.е. мозаичности развития). Вопрос об усложнении пространственной организации зародыша в развитии остается, поскольку степень асимметрии начального состояния ниже таковой у зрелого зародыша. Нужно лишь подразумевать наличие внешнего управления коллективным поведением клеток морфогенетического поля.

Данное управление отражено в постановке задачи об организации морфогенетического поля в присутствии так называемых "источников" и "стоков" [31, 98]. В этой постановке вопрос о спонтанном нарушении симметрии не стоит. Асимметрия заложена в граничных условиях: источник помещается на одной границе одномерного поля, сток — на другой. Вопрос состоит в выяснении характера расслоения поля в этом случае.

При наличии внешней асимметрии нет оснований постулировать "дальнодействие" в межклеточных коммуникациях. "Минимальная" динамическая модель в этом случае имеет вид уравнения [101]

$$\frac{\partial a}{\partial t} = f(a) + D \frac{\partial^2 a}{\partial x^2} \quad (7)$$

с граничными условиями

$$(D \frac{\partial a}{\partial x} = -\alpha_0(A_0 - a))_0, \quad (D \frac{\partial a}{\partial x} = \alpha_L(A_L - a))_L. \quad (8)$$

Выражение межклеточных связей в форме "диффузионного" оператора получается в приближении быстроубывающих ядер F, Φ , когда соответствующий радиус убывания мал по сравнению с полным размером поля. Знак эффективного коэффициента диффузии D должен быть положительным, ибо в противном случае любое макроскопическое состояние окажется неустойчивым.

Дальнейшее содержание настоящей главы посвящено формальному исследованию означенных выше вопросов. В ней будут решаться в основном технические проблемы. Вопросам с биологическим содержанием посвящены две последующие главы.

§ II.2. Организация поля "источником" и "стоком"

То, что внешняя асимметрия, задаваемая перепадом значений параметра A в источнике на одной границе поля $x = L$ и стоке на другой $x = 0$, должна приводить к неоднородности распределения ЭПД в поле, очевидно. Однако вовсе неочевидно существование и устойчивость стационарных состояний типа доменных стенок, т.е. таких, в которых сосуществуют протяженные квазиоднородные области значений a , близких к альтернативным стабильным состояниям локальной динамики a_1 и a_2 . Действительно, подобные состояния существуют и устойчивы лишь при определенных условиях. Их мы и намерены выяснить. Нашей ближайшей задачей будет общий анализ устойчивости стационарных состояний в модели (7), (8).

Построение критерия устойчивости [102]. Форма стационарного профиля $\bar{a}(x)$ должна удовлетворять уравнению

$$D d^2 \bar{a}/dx^2 + f(\bar{a}) = 0. \quad (9)$$

Предлагаемый ниже метод исследования асимптотической устойчивости конструктивен для монотонных профилей $\bar{a}(x)$. Но, как мы убедимся позднее, немонотонные распределения (типа нескольких доменных стенок) неустойчивы всегда.

Вопрос об асимптотической устойчивости решается в линейном приближении. Уравнение, описывающее эволюцию малых отклонений от стационарного распределения $\psi(x, t) = a(x, t) - \bar{a}$, имеет вид

$$\frac{\partial \psi}{\partial t} = \omega(x) \psi + D \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2}; \quad \omega(x) \equiv \frac{df(\bar{a}(x))}{da}. \quad (10)$$

Граничные условия для отклонений оказываются однородными:

$$D\psi_x(0, t) = \alpha_0 \psi(0, t), \quad D\psi_x(L, t) = -\alpha_L \psi(L, t). \quad (11)$$

Общее решение линейной краевой задачи (10)–(11) представляется в виде суперпозиции:

$$\psi(x, t) = \sum c_\lambda e^{\lambda t} \Psi_\lambda(x), \quad (12)$$

где Ψ_λ и λ — собственные функции и собственные значения линейного оператора H :

$$\hat{H} = \omega + D \frac{d^2}{dx^2}. \quad (13)$$

Вопрос об устойчивости решается знаком максимального из λ . Если этот знак положителен: $\lambda_0 > 0$, то возмущение $\psi(x, t)$, имеющее в начальный момент времени форму собственной функции Ψ_0 , нарастает со временем. Если же максимальное из λ отрицательно, то в соответствии с (12) любое начальное возмущение релаксирует.

Названное условие устойчивости удобно выразить в интегральной форме. Для асимптотической устойчивости стационарного профиля \bar{a} необходимо и достаточно, чтобы для любой функции $\varphi(x)$, удовлетворяющей на границах $0, L$ условиям (11), выполнялось неравенство

$$(\varphi, \hat{H}\varphi) < 0. \quad (14)$$

Интегральный критерий устойчивости (14) немедленно следует из равенств

$$\varphi = \sum a_\lambda \Psi_\lambda; \quad (\varphi, \hat{H}\varphi) = \sum |a_\lambda|^2 |\Psi_\lambda|^2 \lambda. \quad (15)$$

(Использована полнота и ортогональность набора собственных функций эрмитова оператора \hat{H} .)

На основании граничных условий (11) получим

$$(\varphi, \hat{H}\varphi) = \int_0^L [\omega \varphi^2 - D \varphi_x^2] dx - [\alpha_0 (\varphi(0))^2 + \alpha_L (\varphi(L))^2]. \quad (15)$$

Далее воспользуемся следующим искусственным приемом [102]. По произвольной данной функции $\varphi(x)$ построим другую $\chi(x)$, которая от-

ляется от φ только в малой окрестности границ $(0, \nu)$; $(L - \nu, L)$. В приграничной же области деформируем исходную функцию φ так, чтобы удовлетворить на самих границах условиям

$$\chi_x(0, L) = (\bar{a}_{xx}/\bar{a}_x) \chi(0, L). \quad (16)$$

Новые граничные условия "подогнаны" под пробную функцию φ_0 , соответствующую возмущению малого сдвига стационарного профиля:

$$\varphi_0 \sim \bar{a}_x(x). \quad (17)$$

Для χ имеем вместо (15)

$$(\chi, \hat{H}\chi) = \int_0^L [\omega\chi^2 - D\chi_x^2] dx + D\Delta \frac{\bar{a}_{xx}}{\bar{a}_x} \chi^2. \quad (18)$$

Легко видеть, что возмущение (17) является собственной функцией оператора \hat{H} , причем соответствующее собственное значение равно нулю. Важно, что для монотонного профиля $\bar{a}(x)$ это собственное значение является максимальным, поскольку в этом случае производная \bar{a}_x не имеет узлов в интервале $(0, L)$ [103] (осцилляционная теорема).

Далее, как и для функции φ , интеграл $(\chi, \hat{H}\chi)$ можно представить в виде

$$(\chi, \hat{H}\chi) = \sum \lambda |b_\lambda \Psi_\lambda|^2, \quad (19)$$

и в силу сказанного выше

$$(\chi, \hat{H}\chi) \leq 0. \quad (20)$$

Уточняя дополнительно граничные значения функции χ : $\chi(0, L) = \varphi(0, L)$, получим из (15), (18) и (20)

$$\begin{aligned} (\varphi, \hat{H}\varphi) \leq & \varphi_0^2 \left(D \frac{\bar{a}_{xx}(0)}{\bar{a}_x(0)} - \alpha_0 \right) + \varphi_L^2 \left(-D \frac{\bar{a}_{xx}(L)}{\bar{a}_x(L)} - \alpha_L \right) + \\ & + \int_0^L [\omega(\varphi^2 - \chi^2) - D(\varphi_x^2 - \chi_x^2)] dx. \end{aligned} \quad (21)$$

Построение функции $\chi(x)$ подразумевает, что интеграл в правой части неравенства (21) является величиной порядка ν . Поэтому для достаточно малых ν знак правой части (21) определяется первыми двумя членами. Возвращаясь к достаточному условию устойчивости в форме (14) и используя для производных стационарного профиля в (21) уравнение (9), приходим к достаточному критерию устойчивости в форме [102]

$$\frac{f(\bar{a}(0))}{A_0 - \bar{a}(0)} < \frac{\alpha_0^2}{D}; \quad \frac{f(\bar{a}(L))}{A_L - \bar{a}(L)} < \frac{\alpha_L^2}{D}. \quad (22)$$

Для неустойчивости профиля $\bar{a}(x)$, вообще говоря, недостаточно нарушения одного из неравенств (22). Проводя рассуждения в точности по той же схеме, как это делалось выше, приходим к условию асимптотической неустойчивости в форме пары неравенств, обратных (22),

$$\frac{f(\bar{a}(0))}{A_0 - \bar{a}(0)} > \frac{\alpha_0^2}{D}; \quad \frac{f(\bar{a}(L))}{A_L - \bar{a}(L)} > \frac{\alpha_L^2}{D}. \quad (23)$$

В результате мы получили возможность для полного суждения об устойчивости стационарного распределения в модели (7), (8) на основании только краевых значений параметра в этом распределении. Определение этих значений – отдельная задача. Ей посвящен следующий раздел.

Стационарные профили. Бифуркационный анализ [104]. Изменение характера устойчивости стационарного состояния нелинейной динамической задачи, как известно, сопровождается его бифуркацией [105]. В этом разделе вопросы об устойчивости и бифуркациях будут рассматриваться совокупно, что потребует определенных упрощающих предположений.

Будем аппроксимировать главное свойство функции локальной динамики $f(a)$ – ее "бистабильный" характер – кусочно-линейной зависимостью, типа показанной на рис. 4 [104]. Кроме того, сама функция $f(a)$ и краевые условия задачи будут приниматься симметричными в следующем смысле:

$$f(a) = \begin{cases} 1 - a, & a > 0; \\ -1 - a, & a < 0; \end{cases} \quad A_0 = A, \quad A_L = -A.$$

После перехода к безразмерным переменным $\tilde{x} = x/\sqrt{D}$, $\tilde{\alpha} = \alpha/\sqrt{D}$ и параметрам $\tilde{L} = L/\sqrt{D}$ краевая задача о стационарных состояниях (7), (8) принимает вид

$$\frac{d^2 a}{dx^2} = -f(a), \quad (24)$$

$$\left. \frac{da}{dx} \right|_L = \alpha(A - a(L)), \quad \left. \frac{da}{dx} \right|_0 = \alpha(A + a(0)). \quad (25)$$

По-прежнему будем интересоваться лишь монотонными профилями распределения $a(x)$. Полное множество решений (24), (25) этого класса включает в себя два квазиоднородных состояния и три состояния типа доменной стенки [104]. Графическое представление о них дает рис. 5.

В аналитической форме симметричное расслоение (A на рис. 5) выражается в виде

$$a_{x \geq L/2}^A(x) = \pm \left[1 - \operatorname{ch}\left(x - \frac{L}{2}\right) \right] \frac{\alpha(A - 1) + \alpha \operatorname{ch}(L/2) + \operatorname{sh}(L/2)}{\alpha \operatorname{sh}(L/2) - \operatorname{ch}(L/2)}. \quad (26)$$

Выражения для пары асимметричных расслоений (B на рис. 5) выглядят следующим образом:

$$a^B(x) = \begin{cases} 1 - (1 - a(L)) \operatorname{ch}(L - x) - \alpha(A - a(L)) \operatorname{sh}(L - x), & x \geq l; \\ -1 + (1 + a(0)) \operatorname{ch}(x) + \alpha(A + a(0)) \operatorname{sh} x, & x < l. \end{cases} \quad (27)$$

Параметр l этого выражения (узловая точка распределения $a(x)$) определяется из условия непрерывности $a'(l - 0) = a'(l + 0)$, которое для симметричного расслоения приводит к выражению

$$\operatorname{ch} l = \frac{\alpha}{1 - \alpha^2} (A - 1) (\operatorname{sh} L + \alpha \operatorname{ch} L). \quad (28)$$

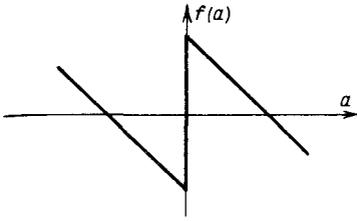
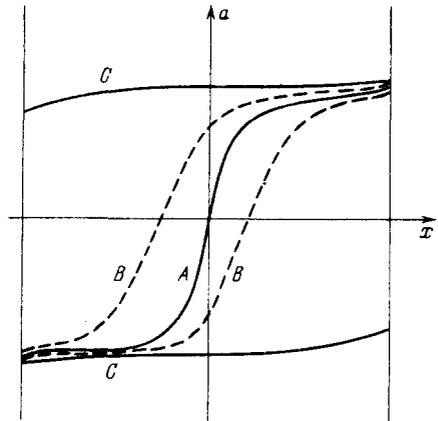


Рис. 4. Используемая при бифуркационном анализе кусочно-линейная аппроксимация функции $f(a)$

Рис. 5. Совокупность решений задачи (24), (25). Профили, представленные сплошными линиями, соответствуют асимптотически устойчивым состояниям, штрихованными — неустойчивым



На плоскости $\{\alpha, A\}$ область существования асимметричных расслоений ограничена двумя кривыми (рис. 6):

$$\begin{aligned} \Phi_1(\alpha, A) &= \alpha(A - 1)(\text{sh } L + \alpha \text{ ch } L) + \alpha^2 - 1 = 0, \\ \Phi_2(\alpha, A) &= \alpha(A - 1)(\text{sh } L + \alpha \text{ ch } L) + (\alpha^2 - 1) \text{ch } L = 0. \end{aligned} \quad (29)$$

Эти кривые пересекаются в точке $(1, 1)$.

Область существования квазиоднородных распределений (C на рис. 5) определяется неравенством

$$\Phi_2(\alpha, A) \leq 0.$$

Зарождение пары асимметричных фронтов (B) на границе $\Phi_1(\alpha, A) = 0$ происходит в результате бифуркации симметричного профиля (A). Согласно общей теореме, упомянутой в начале этого раздела, граница зарождения новых стационарных решений должна совпадать с порогом смены устойчивости исходного состояния. Здесь мы в этом убеждаемся непосредственно.

Для симметричных фронтов $a(x)$ вместо четырех неравенств (22), (23) условие асимптотической устойчивости (достаточное и необходимое) выражается одним:

$$\Phi_1(\alpha, A)/(A - a(0)) > 0.$$

Кроме того, в силу монотонности $a(x)$, должно быть $A > a(0)$. Получаем, что порог линейной устойчивости симметричного фронта достигается в точке $\Phi_1(\alpha, A) > 0$, т.е. как раз в той, где зарождается пара асимметричных распределений $a^B(x)$.

Наиболее емкой формой представления результатов исследования типа, проведенного выше, является бифуркационная диаграмма. На ней для выделенного внешнего параметра определены интервалы гладкого изменения стационарных состояний без изменения их числа и критические точки на границах таких интервалов (точки, в которых скачком меняется число стационарных режимов). Это точки бифуркаций, или в более общем случае — точки структурной неустойчивости. Далее в настоящей работе бифур-

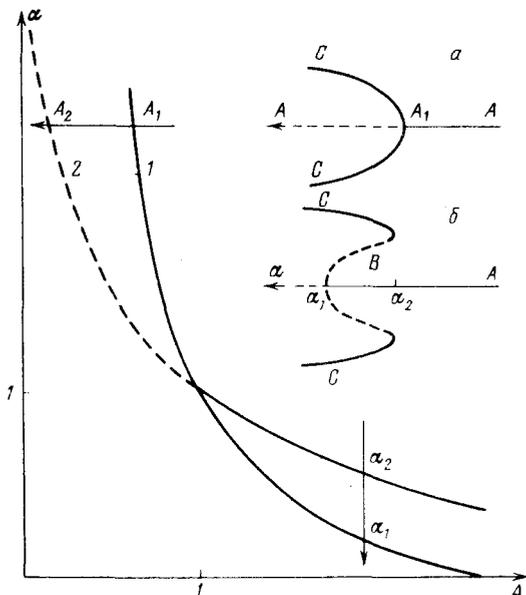


Рис. 6. Разделение плоскости параметров задачи (24), (25) на области, соответствующие различным решениям, представленным на рис. 4. Кривые 1 и 2 определены уравнениями $\Phi_1(\alpha, A) = 0$ и $\Phi_2(\alpha, A) = 0$ соответственно

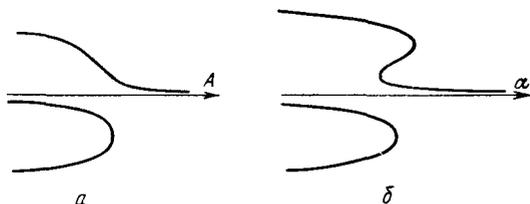
Рис. 7. а – Бифуркационные диаграммы задачи (24), (25) – зависимость величины $\bar{a}(0)$ от параметра A (стрелка A_1, A_2 на рис. 6); б – зависимость от параметра α (стрелка α_2, α_1 на рис. 6). Сплошные линии – ветви устойчивых, а штриховые – неустойчивых решений соответствующего (24) кинетического уравнения. Буквы А, В, С соответствуют обозначениям профилей на рис. 5

кационные диаграммы будут использоваться как основное средство связи между формальным исследованием математической модели и поведением моделируемого объекта.

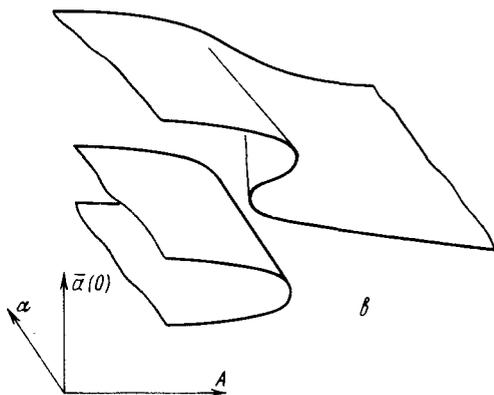
На рис. 7 показаны две возможные формы бифуркационной диаграммы для задачи (24), (25) [104]. Их различный вид обусловлен различным выбором бифуркационного параметра. На рис. 7а бифуркация симметричного профиля расслоения (точка A_1) сопровождается "мягким" рождением пары устойчивых асимметричных профилей. Бифуркационным параметром для данной диаграммы является степень асимметрии внешних условий, измеряемая значением A .

Если при неизменной степени внешней асимметрии (постоянном перепаде $2A$ между источником и стоком) понижать степень связности поля с внешними условиями (параметр α), то бифуркация симметричного расслоения приобретает иной характер: на фоне еще устойчивого (локально) профиля $a^A(x)$ скачком зарождается пара квазиоднородных распределений $a^C(x)$. В этом случае бифуркация "жесткая". При дальнейшем понижении α квазиоднородные состояния гладко деформируются, оставаясь асимптотически устойчивыми. Напротив, для симметричного расслоения при достаточно малых α достигается критическая точка (α_1 на рис. 7б) потери асимптотической устойчивости.

Рис. 8. Устойчивые к малым "шевелениям" параметров формы бифуркационных диаграмм рис. 7 (а, б) и вид двумерных "поверхностей поведения" для задачи (8), (9) в случае общего положения (в)



Существенное замечание. Представленные диаграммы не могут быть полностью адекватны какой-либо экспериментальной ситуации. Дело в том, что они не удовлетворяют важному условию "грубости", т.е. устойчивости к малым "шевелениям" внутренних и внешних параметров [105]. Допущения о симметрии, принятые при постановке задачи, приводят



к вырожденности бифуркаций. С другой стороны, предполагаемая симметрия не может сохраняться при произвольных шевелениях параметров.

Известны канонические – устойчивые – типы критического поведения, которые только и могут сохраниться в случае так называемого общего положения [105]. В этом случае диаграммы стационарных состояний деформируются так, как показано на рис. 8а, б.

Вместо одномерных кривых, изображающих зависимость выбранной характеристики стационарного профиля (как было у нас – $a(0)$) от единственного внешнего параметра (A или α), можно представить более общую картину в виде двумерных поверхностей в трехмерном пространстве $\{a(L/2), \alpha, A\}$ [104]. Эта картина приведена на рис. 8в.

Выводы. Формально проанализирован вопрос о возможности локального управления глобальным поведением коллектива клеток в пределах единого морфогенетического поля.

Свойство компетентности эмбриональных клеток как таковое было представлено динамической бистабильностью локального равновесия. Межклеточные связи сведены к близкодействующим – диффузионного типа. Внешнее управление считалось сосредоточенным в точках на границах поля и вводилось в динамическую модель в виде локальных источников неравной интенсивности. Данный тип управления известен в эмбриологической литературе под названием "модели источников и стоков".

Аналитически исследованы переходы между дискретными состояниями глобального равновесия, индуцируемые изменением интенсивности локальных источников и степени "проницаемости" границ поля по отношению к сигналам от источников. Выявлена возможность двух механизмов зарождения расслоения: 1) путем гладкой деформации макроскопически одно-

родных состояний, 2) скачком конечной амплитуды из однородного состояния.

Локальное управление глобальным поведением клеточного ансамбля обуславливается: а) активностью отдельных клеток — их способностью к переключениям между двумя дискретными состояниями и б) близкодействующими межклеточными связями.

Названных факторов оказывается достаточно для передачи управляющего действия от границ к внутренним областям поля. Но автономное поведение в этом случае неинтересно. Стабильными могут быть лишь однородные в пространстве состояния [102, 106]. Переходя далее к исследованию вопроса о спонтанном нарушении симметрии в поле, мы уже не можем ограничиться только близкодействующими модами межклеточных взаимодействий.

В следующем параграфе мы будем интересоваться автономным поведением поля. Общий вопрос, который будет исследоваться в несколько этапов, — самоорганизация макроскопического порядка.

§ II.3. Самоорганизация макроскопического порядка.

Зарождение, стабилизация и трансформация диссипативных структур

а) Неустойчивость, нарушающая симметрию. Коротковолновая коллективная мода. Как ясно из предыдущих выводов, здесь нам следует вернуться к общей нелокальной версии (6) уравнения движения для ЭПД. Но прежде попытаемся уточнить на формальном языке, какую функцию должны исполнить нелокальные взаимодействия.

Принципиальным звеном интересующего нас механизма самопроизвольного понижения симметрии макросостояния является коротковолновая коллективная мода, порождаемая неустойчивостью тьюрингова типа. Анализ условий возникновения такой неустойчивости начинается с исследования эволюции малоамплитудных мод возмущения гомогенного состояния в линейном приближении.

Выясним прежде всего, чего не хватает для тьюринговой неустойчивости полю с близкодействием. В этом случае линеаризованная форма уравнения движения имеет вид

$$\partial \delta a / \partial t = \omega(x) \delta a + D \partial^2 \delta a / \partial x^2. \quad (30)$$

Произвольное решение этого уравнения в ограниченной области представляется в виде суперпозиции:

$$\delta a(x, t) = \sum_{l=0}^{\infty} C_l e^{ik_l x + \lambda_l t}. \quad (31)$$

Здесь k_l — последовательность разрешенных значений волнового числа чистых гармонических составляющих отклонения от однородного распределения определяется из краевых условий, λ_l — экспоненциальный показатель временной эволюции гармоники $e^{ik_l x}$. Связь λ с соответствующим k_l немедленно находится после подстановки (31) в (30):

$$\lambda_l = \omega - Dk_l^2.$$

В силу очевидной монотонной зависимости $\lambda(k^2)$ неустойчивость может возникнуть только в результате прохождения параметра ω через нулевое значение. Но при этом нарастающей модой возмущения всегда является однородная ($k=0$). Нарушения симметрии в результате такой неустойчивости не возникает. Для того чтобы это произошло, максимум дисперсионной кривой $\lambda(k^2)$ должен быть смещен от нулевого k . Именно этого удастся добиться, вводя в рассмотрение нелокальность.

В качестве примера для демонстрации происхождения нелокального эффекта и его роли рассмотрим один конкретный вариант чистой реакционно-диффузионной схемы [107]:

$$Ta_t = f(a) - h + R_a^2 a_{xx}, \quad \tau h_t = -h + a + R_h^2 h_{xx}. \quad (32)$$

Здесь два диффундирующих реагента, концентрации которых a и h взаимодействуют по типу активатора и ингибитора в модели Гирера и Майнхардта (см. § 1.3). Если характерные масштабы времен T и τ относятся друг к другу так, что $T \gg \tau$, то на временах $t \sim T$ для ингибитора можно принять приближение квазистационарных концентраций. Соответствующее распределение $\bar{h}(x)$ выражается в виде

$$\bar{h}(x) = \frac{1}{2R_h} \int \exp\left\{-\frac{|x-x'|}{R_h}\right\} a(x', t) dx'. \quad (33)$$

После подстановки в уравнение для $a(x, t)$ это дает:

$$Ta_t = f(a) + R_a^2 a_{xx} - \frac{1}{2R_h} \int \exp\left\{-\frac{|x-x'|}{R_h}\right\} a(x', t) dx'. \quad (34)$$

По форме это уравнение совпадает с (6). Мы получили его стандартным методом редукции на основе иерархии времен. Здесь важно наличие нелокальной связи и знак ее. Этот знак соответствует передаче на расстояние самоподавляющего действия. Именно это, вместе с противоположным по знаку эффектом близкодействующей моды связи (диффузионный член в уравнении (34)), создает предпосылку спонтанного расслоения.

Линеаризуя последнее уравнение для малоамплитудных возмущений δa , получаем дисперсионную зависимость в виде

$$T\lambda(k) = \omega - \frac{1}{1 + R_h^2 k^2} - R_a^2 k^2. \quad (35)$$

Кривая $\lambda(k)$ имеет максимум в точке k_0 :

$$k_0^2 R_h^2 = R_h/R_a - 1,$$

при условии $R_h > R_a$. Пока вершина этой кривой не превышает нулевой уровень, однородное состояние, для возмущений около которого получено соотношение (35), асимптотически устойчиво. Но при $\omega > \omega_{кр} = 2R_a/R_h - (R_a/R_h)^2$ это условие нарушается. Гомогенное состояние перестанет быть устойчивым, когда в интервал волновых чисел, в котором значения показателя λ положительны, попадает хотя бы одно из разрешенных краевой задачей, т.е. из последовательности k_l . При достаточно больших размерах это произойдет при значениях критического параметра ω , близких к порогу $\omega_{кр}$.

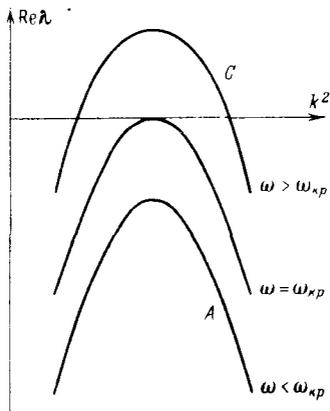


Рис. 9. Общий вид дисперсионной зависимости $\text{Re } \lambda(k^2)$ вблизи порога неустойчивости тьюрингова типа. Бифуркационный параметр ω ; $\omega = \omega_{кр}$ соответствует критической точке; кривая A соответствует ситуации до порога неустойчивости, C — за порогом

В результате имеем неустойчивость тьюрингова типа. Возмущения, нарушающие устойчивость симметричного однородного состояния, пространственно неоднородны, т.е. обладают пониженной пространственной симметрией. Вблизи порога данной неустойчивости лишь одна выделенная гармоническая мода произвольного малого возмущения приобретает положительный инкремент нарастания. Все прочие моды, включая и

пространственно однородную, имеют в соответствии с ходом кривой $\lambda(k)$ отрицательный показатель временной эволюции λ . Система, обладающая дисперсионной кривой типа, показанной на рис. 9 (кривая C), работает как селективный усилитель — она способна выделять и усиливать до макроскопических значений амплитуду вполне определенной гармонике белого шума. Данное свойство, очевидно, содержит предпосылку к спонтанному нарушению симметрии макросостояния.

Мы можем теперь уточнить, как сложилась эта предпосылка. Ее формальной основой является немонотонный характер дисперсионной кривой. Две ветви этой кривой — растущая и падающая — могут быть соотнесены с двумя модами межклеточных связей. За падающий участок ответственны близкодействующие взаимодействия, гомогенизирующие состояние. Простая диффузионная связь точек поля вполне пригодна для этой роли. Напротив, участок подъема кривой $\lambda(k^2)$ предполагает нелокальные взаимодействия, передающие эффект самоподвладения.

Заметим, что как предпосылка самопроизвольной дегомогенизации, нелокальные связи необходимы лишь при описании посредством "однокомпонентного параметра порядка". В нередуцированном описании реальных объектов, при котором степеней свободы множество, нелокальности может не быть. Она и не требуется для возникновения тьюринговой неустойчивости. В стандартных двухкомпонентных системах реакционно-диффузионного типа пространственные связи полностью обеспечиваются "локальной" диффузией. Это, как известно, не мешает возникновению в них требуемой неустойчивости.

Однако аналитическое исследование пространственной самоорганизации уже в таких системах значительно осложнено по сравнению с предложенной нами однокомпонентной моделью (уравнение движения (6)). Дело в том, что спектр коллективного поведения в двухкомпонентной динамике потенциально шире и многообразнее такового в однокомпонентной. Помимо пространственного расслоения здесь возможно зарождение осцилляторных режимов во времени и пространственно-временное упорядочение в виде автоволн [4]. С другой стороны, *вблизи порога именно пространственной самоорганизации* произвольная двухкомпонентная реакционно-

диффузионная система всегда может быть редуцирована в описании до однокомпонентной динамики. При этом уравнение движения необходимо принимает форму (34). Мы показали это в работе [107]. Таким образом, при постановке вопроса о спонтанном упорядочении в пространстве форма уравнения движения (6) может считаться общей, с одной стороны, и "минимальной" (исключающей иные моды коллективного поведения) – с другой.

б) Состояния за порогом неустойчивости, нарушающей симметрию [107–109]. При переходе в закритическую область гомогенное состояние уже нестабильно. Из линейного приближения мы получаем информацию о тех выделенных степенях свободы, возбуждение которых приводит к нарушению устойчивости исходного состояния. Если нет специального вырождения спектра инкрементов λ , то в непосредственной окрестности порога неустойчивости исследуемого типа такая выделенная степень свободы одна. Ею является та собственная мода возмущений Ψ_0 , для которой в критической точке $\omega_{кр} \lambda(k_0) = 0$.

Линейное приближение дает для этой моды очень медленную релаксацию в близкой докритической области и усиление с малым инкрементом в близкой закритической области. Для всех остальных собственных мод Ψ_l возмущения $\delta a(x, t)$ характеристические числа λ_l остаются конечными, что означает быструю по сравнению с Ψ_0 релаксацию.

Как видно, здесь складывается ситуация такая же, как вблизи равновесного фазового перехода второго рода, где медленно релаксирующую степень свободы выделяют как параметр порядка [100]. Хакен предложил опереться на указанную медленность критической динамики для построения уже нелинейных уравнений движения вблизи порога самоорганизации [56]. Близкая идея была реализована в ряде работ [60, 61].

В отличие от названных работ мы везде далее анализируем поведение в окрестности порога самоорганизации в случае *дискретного спектра* λ_l . Это соответствует возникновению неустойчивости, нарушающей симметрию, в ограниченной области. Наша цель – не только построить редуцированное описание для коллективных мод вблизи порога их зарождения, но и, по возможности полно, исследовать возникающие диссипативные структуры.

Для определенности примем в качестве граничных условий отсутствие потоков параметра a :

$$a_x(0, L) = 0. \quad (36)$$

Тем самым будет рассматриваться вполне автономное поведение поля. В компактной записи уравнение (6) имеет вид

$$a_t = -\hat{\Lambda}a + N(a). \quad (37)$$

Здесь $\hat{\Lambda}$ – линейный оператор:

$$\hat{\Lambda}a = -(\mu + \omega_{кр})a - \int F(|x - x'|)a \, dx' + \int \Phi(|x - x'|)a \, dx' + Da_{xx}.$$

В исходном однородном состоянии принимается $a \equiv 0$. Бифуркационным параметром считаем для определенности коэффициент ω при линейном члене разложения функции $f(a)$; $\omega_{кр}$ – критическое значение этого параметра, а μ – отклонение от него такое, что $\mu > 0$ соответствует закритической ситуации, а $\mu < 0$ – докритической.

Здесь мы ограничимся рассмотрением только состояний, возникающих в результате мягкой бифуркации. Это предполагает малость амплитуды отклонения параметра a в исследуемой структуре $a(x)$ от гомогенного распределения $a \equiv 0$ и возможность ограничиться лишь низшими порядками нелинейности $N(a) = f(\hat{a}) - \omega a$ [108, 109].

Для стабилизации состояний в закритической области оказывается достаточным учет членов не старше a^3 . Поэтому примем для $N(a)$:

$$N(a) \approx -\gamma a^3. \quad (38)$$

Опущенный квадратичный член, при отсутствии вырождения декрементов в линейной задаче, приводит лишь к формальным усложнениям, не меняя ничего принципиально. Тем самым окажется, что мы отошли от исходного И-образного вида в локальной динамике ЭПД. Но мы вернемся к нему в дальнейшем при рассмотрении вопросов о самоупорядочении в конкретных биологических задачах в следующих двух главах.

Далее воспользуемся разложением по полному набору нормальных мод Ψ_l (собственных функций оператора $\hat{\Lambda}$) в виде

$$a(x, t) = \sum_l C_l \Psi_l(x). \quad (39)$$

Для граничных условий (36) совокупность $\{\Psi_l\}$ представляет собой:

$$\Psi_l = \cos(k_l x); \quad k_l = l\pi/L; \quad l = 1, 2, \dots,$$

$$\Psi_0 = 1/\sqrt{2},$$

а соответствующие собственные значения оператора $\hat{\Lambda}$ (спектр его фурье-преобразования) таковы:

$$\Lambda^c(k_{l_c}) \equiv \Lambda^c = 0 \quad (\mu = 0); \quad \Lambda^c(k_l) > 0; \quad l \neq l_c. \quad (40)$$

Индекс c обозначает критическую моду — нейтрально устойчивую на пороге $\mu = 0$.

При переходе к базису из нормальных мод кинетическое уравнение (37) преобразуется к бесконечной системе обыкновенных дифференциальных уравнений относительно амплитуд $C_l(t)$ [107]. Различая амплитуду критической моды c и всех остальных C_l , представим эту систему в виде

$$\dot{c}_t = \mu c - \frac{3}{4}\gamma c^3 - \frac{3}{4}\beta c^2 C_{3l_c} + O(c \cdot C \cdot C) + O(C \cdot C \cdot C), \quad (41)$$

$$\dot{C}_l = (\mu - \Lambda_l^c) C_l - \frac{\gamma c^3}{4} \delta_{l, 3l_c} - \frac{3\gamma}{2} c^2 C_l - \frac{3\gamma}{4} c^2 \times$$

$$\times (C_{|l+2l_c|} + C_{|l-2l_c|}) + O(c \cdot C \cdot C) + O(C \cdot C \cdot C).$$

Условие близости к порогу неустойчивости

$$|\mu| \ll |\Lambda_{l \neq l_c}^c| \quad (42)$$

разрешает рассматривать все моды помимо критической быстро релаксирующими и использовать для амплитуд C_l в динамической системе (41) приближение квазистационарности на временах $t \sim 1/\mu$

$$\dot{C}_l = 0.$$

Далее делается предположение $|C_l| \ll |c|$, в самосогласованности которого нужно будет убедиться.

Опираясь на сказанное, систему (41) можно редуцировать:

$$c = \mu c - \frac{3}{4}\gamma c^3 + \frac{1}{16}(\gamma^2/\Lambda_{3l_c}^c)c^5, \quad (43)$$

$$C_{3l_c} = (\gamma/4\Lambda_{3l_c}^c)c^3, \quad C_l = O(c^5); \quad l \neq l_c \neq 3l_c.$$

При малых μ приближенное стационарное решение \bar{c} имеет вид $\bar{c}^2 \approx 4\mu/3\gamma$.

При $\gamma < 0$ оно существует до достижения порога неустойчивости тривиального решения $c = 0$, соответствующего исходному состоянию. Непосредственно из (43) убеждаемся, что в этом случае стационарное решение \bar{c} неустойчиво. Таким образом, при докритической бифуркации гомогенного состояния не получается стабильных негомогенных состояний. Напомним и подчеркнем, что этот вывод обоснован при невырожденной неустойчивости и кубической нелинейности.

При $\gamma > 0$ в точке $\mu = 0$ от тривиального решения $\bar{c} = 0$ непрерывным образом ответвляется пара новых нетривиальных

$$\bar{c} = \pm \sqrt{4\mu/3\gamma}$$

теперь уже в результате закритической бифуркации. Обе новых ветви стационарных решений в этом случае стабильны [107]. Вид пространственного распределения $\vec{a}(x)$, сменяющего гомогенное состояние, определяется выражением

$$\pm \vec{a}(x) = \bar{c} \left(1 + \frac{\mu}{3\Lambda_{3l_c}^c} \right) \Psi_c - \frac{\gamma}{4\Lambda_{3l_c}^c} \bar{c}^3 \Psi_{3l_c} \quad (44)$$

Вблизи порога возникновения (малые значения μ) неоднородное состояние имеет форму синусоидальной волны Ψ_c . С увеличением μ эта форма плавно искажается, становясь более прямоугольной из-за вклада нечетных гармоник Ψ_{3l_c} , Ψ_{5l_c} и т.д. (рис. 10).

При $\mu > 0$ ставшее неустойчивым исходное состояние испытывает серию последовательных бифуркаций при $\mu = \Lambda_l^c$. Однако ответвляющиеся при этом новые стационарные решения вблизи соответствующих точек зарождения асимптотически неустойчивы. Вместе с тем это не означает, что единственным стабильным состоянием в закритической области является первая ветвь (44). Новые стабильные структуры возникают вследствие вторичных бифуркаций неоднородных стационарных решений. Соответствующий анализ представлен в следующем разделе.

в) В т о р и ч н ы е б и ф у р к а ц и и [107, 110]. Для исследования вторичных бифуркаций необходимо принять в расчет влияние мод, отличных от Ψ_c .

Пусть $\Psi_{l'}$ — мода, которая первая вслед за критической Ψ_c приобретает положительный инкремент с ростом μ . Это происходит при $\mu = \Lambda_{l'}^c$. Положим, что для всех остальных мод $l \neq l_c \neq l'$ порог возбуждения еще не достигнут, т.е. $\mu < \Lambda_{l'}^c$. В этом случае линейный анализ предсказывает релаксацию гармоник с $l \neq l_c \neq l'$, тогда как обе последние могут усиливаться.

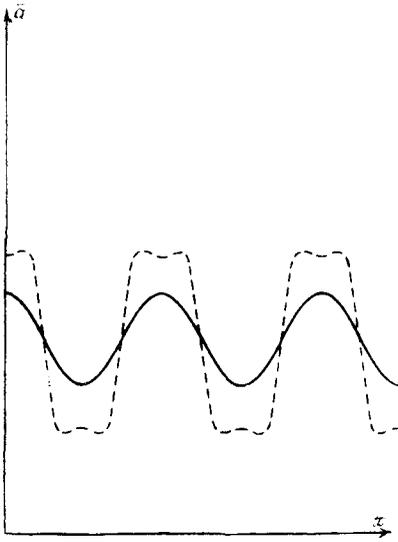
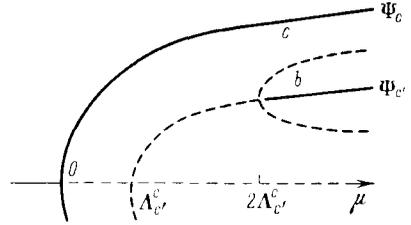


Рис. 10. Вид профиля $\bar{a}(x)$ в соответствии с выражением (44) вблизи порога возникновения (сплошная линия) и на некотором удалении от него (штриховая линия)

Рис. 11. Диаграмма ветвления стационарных решений (46) – зависимость амплитуд составляющих гармоник от бифуркационного параметра μ . Сплошные ветви соответствуют асимптотически устойчивым решениям, штриховые – неустойчивым



Что дают нелинейные члены в предположении $\mu \sim \Lambda_{c'}^c \ll \Lambda_l^c$? Уравнения движения для двух немалых амплитуд c, b получаются таким же образом, как в предыдущем разделе, и имеют вид

$$\begin{aligned} \dot{c} &= \mu c - \frac{3\gamma}{4} c^3 - \frac{3\gamma}{2} c b^2 + O\left(\left(\frac{\mu}{|\Lambda_l^c|}\right)^{3/2}\right), \\ \dot{b} &= (\mu - \Lambda_{c'}^c) b - \frac{3\gamma}{4} b^3 - \frac{3\gamma c^2 b}{2} + O\left(\left(\frac{\mu}{|\Lambda_l^c|}\right)^{3/2}\right), \\ \dot{c}_l &= O\left(\left(\frac{\mu}{|\Lambda_l^c|}\right)^{3/2}\right). \end{aligned} \quad (45)$$

Теперь нетривиальные стационарные решения – пары амплитуд c, b – перечислены ниже [107]:

$$\begin{aligned} c &= \pm (4\mu/3\gamma)^{1/2}, & b &= 0, \\ b &= \pm 2/3 [(\mu - \Lambda_{c'}^c)/\gamma]^{1/2}, & c &= 0, \\ c &= \pm 2/3 [(\mu - 2\Lambda_{c'}^c)/\gamma]^{1/2}, & b &= \pm 2/3 [(\mu + \Lambda_{c'}^c)/\gamma]^{1/2}. \end{aligned} \quad (46)$$

Первое из них соответствует решению, рассмотренному выше. Два следующих возникают в точках $\mu = \Lambda_{c'}^c$ и $\mu = 2\Lambda_{c'}^c$ соответственно.

Вопрос о стабильности всех решений (46) выясняется, как обычно, путем линеаризации кинетической системы (45) вблизи соответствующих особых точек (46). Общий результат исследования (45) представлен в виде бифуркационной диаграммы на рис. 11.

Как видно, первая (устойчивая) бифуркационная ветвь Ψ_c не испытывает вторичных бифуркаций. Ее устойчивость не нарушается с ростом бифуркационного параметра μ . Вторая бифуркационная ветвь $\Psi_{c'}$ возникает асимптотически неустойчивой, но при $\mu = 2\Lambda_{c'}^c$ разветвляется, порождая

пару новых стационарных решений. Вместе с этим соответствующий негомогенный профиль приобретает устойчивость. Таким образом, в области параметров $\mu > 2\Lambda_c^c$ мы сталкиваемся с фактом неоднозначности устойчивых решений задачи (37). Два стабильных, макроскопически различных состояния Ψ_c и Ψ_c' не получаются одно из другого в результате потери устойчивости, но могут оба проявляться при одних и тех же условиях. Если система, эволюционируя от гомогенного состояния, оказалась в одном из них, то попасть в другое она может лишь в результате жесткого возбуждения извне.

Не меньший интерес представляет смена макроскопического режима, проходящая спонтанно, без внешнего возбуждения. Чтобы это произошло, стабильная — первая бифуркационная ветвь — должна сама испытать бифуркацию. Достаточные (а возможно, и необходимые) условия для такой бифуркации формируются, когда первичная бифуркация оказывается в определенном смысле вырожденной [110].

Более определенно, рассмотрим случай, когда критическая мода представляет собой гармоническую полуволну, т.е. $l_c = 1$. Положим далее, что две соседние моды с $l = 0$ и $l = 2$ имеют близкие декременты Λ_0^c, Λ_2^c , тогда как все прочие — существенно большие:

$$\mu \sim \Lambda_2^c \leq \Lambda_0^c \ll \Lambda_{l \geq 3}^c. \quad (47)$$

При $\mu > \Lambda_0^c$ положительный инкремент по линейному приближению имеют моды Ψ_1, Ψ_0, Ψ_2 . Эти моды могут быть возбуждены и должны приниматься в расчет. Остальные, имеющие большой декремент затухания, подавлены.

Три доминантные гармоники Ψ_0, Ψ_1, Ψ_2 представлены в разложении отклонения $a(x)$ с весами a, b, c :

$$a(x, t) = a\Psi_0 + b\Psi_1 + c\Psi_2 + \sum_{l \geq 3} C_l \Psi_l. \quad (48)$$

Таким же образом, как это было сделано выше — при получении (43), придем к системе уравнений эволюции амплитуд *):

$$\begin{aligned} \dot{a} &= (\mu - \Lambda_0^c)a - \gamma \left[\frac{1}{2}a^3 + \frac{3}{2}a(b^2 + c^2) + \frac{3}{2\sqrt{2}}b^2c \right], \\ \dot{b} &= \mu b - \gamma \left[\frac{3}{4}b^3 + \frac{3}{2}b(a^2 + c^2) + \frac{3}{\sqrt{2}}abc \right], \\ \dot{c} &= (\mu - \Lambda_2^c)c - \gamma \left[\frac{3}{4}c^3 + \frac{3}{2}c(a^2 + b^2) + \frac{3}{2\sqrt{2}}ab^2 \right]. \end{aligned} \quad (49)$$

Три "простых" стационарных решения этой системы: $(0, b, 0)$; $(0, 0, c)$; $(a, 0, 0)$, соответствующих чистым гармоникам Ψ_1, Ψ_2, Ψ_0 , зарождаются путем последовательных ответвлений от тривиального решения $(0, 0, 0)$. С ростом μ каждая из соответствующих ветвей испытывает вторичные бифуркации. При этом новые ветви состояний соответствуют суперпозициям чистых гармоник Ψ_1, Ψ_2, Ψ_0 (рис. 12).

*) Ниже мы пренебрегаем вкладами кратных гармоник Ψ_3, Ψ_4 и т.д., которые имеют место в силу нелинейных эффектов, но малы.

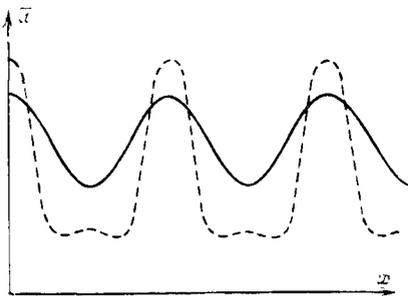
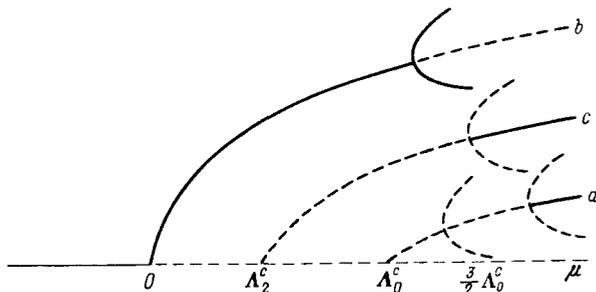


Рис. 12. Изменение вида стационарного профиля $\bar{a}(x)$ при вторичной неустойчивости первой бифуркационной ветви. Сплошная линия — решение $\bar{a}(x)$ до порога вторичной неустойчивости, штриховая — после него

Рис. 13. Диаграмма ветвления стационарных решений системы (49). Сплошные ветви соответствуют устойчивым решениям, штриховые — асимптотически неустойчивым



Вторичные бифуркации можно проанализировать в рамках линеаризованных уравнений (49) в окрестностях особых точек $(0, b, 0)$; $(0, 0, c)$; $(a, 0, 0)$. Для примера приведем характеристическое уравнение, отвечающее состоянию $(a, 0, 0)$:

$$\text{Det} \begin{pmatrix} -2\mu + 2\Lambda_0^c - \lambda & 0 & 0 \\ 0 & -2\mu + 3\Lambda_0^c - \lambda & 0 \\ 0 & 0 & -2\mu + 3\Lambda_0^c - \Lambda_2^c - \lambda \end{pmatrix} = 0. \quad (50)$$

Его корни $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ задают временные декременты малых отклонений от стационарного состояния.

При $\Lambda_0^c > 2\Lambda_2^c$ эти корни, расположенные в порядке возрастания, таковы [107]:

$$\lambda_1 = 2\Lambda_0^c - 2\mu, \quad \lambda_2 = 3\Lambda_0^c - \Lambda_2^c - 2\mu, \quad \lambda_3 = 3\Lambda_0^c - 2\mu.$$

Последовательное прохождение через 0 значений λ_i соответствует трем точкам бифуркации ветви $(a, 0, 0)$. Первая, $\mu = \Lambda_0^c$, соответствует зарождению неустойчивой чистой гармоникой Ψ_0 . Ее неустойчивость определяется двумя нерелаксирующими собственными модами Ψ_1 и Ψ_2 . При $\mu > \frac{3}{2}\Lambda_0^c - \frac{1}{2}\Lambda_2^c$ мода Ψ_2 становится затухающей. Наконец, при $\mu > \frac{3}{2}\Lambda_0^c$ решение $(a, 0, 0)$ уже асимптотически устойчиво. За бифуркациями остальных ветвей — $(0, 0, c)$ и $(0, b, 0)$ — удастся проследить таким же способом. Полная бифуркационная диаграмма кинетической системы (49) приведена на рис. 13 [107]. Обращаем внимание на новый элемент здесь по сравнению с диаграммой рис. 11. На некотором удалении от точки первого ветвления исходного состояния $\mu = 0$ устойчивая первая бифуркационная ветвь Ψ_1 претерпевает вторичную бифуркацию (точка B на рис. 13). Существенной

предпосылкой для этого является предполагавшаяся вырожденность спектра Λ_γ (условие (47)): близость инкрементов мод с кратными волновыми числами $k_2 = 2k_1$ и $k_0 = 0$ [110].

Смена пространственного распределения, сопровождающая данную бифуркацию, происходит мягко и выглядит так, как показано на рис. 12. Как можно видеть, гармоническая диссипативная структура деформируется в результате вторичной неустойчивости, приобретая черты "контрастных" структур. Этого можно было ожидать, поскольку предполагающееся вырождение спектра Λ_γ означает по существу резкую диспропорцию масштабов R_+ и R_- для функций пространственной связи в операторе $\hat{\Lambda}$. Данная диспропорция отражается на профиле диссипативной структуры так, что пологие и крутые участки изменения должны чередоваться [64].

г) Э ф ф е к т в н е ш н и х ф л у к т у а ц и й [107]. Мы убедились, что за порогом спонтанной десимметризации может стабилизироваться не уникальная диссипативная структура, но в принципе – целый спектр таковых. В рамках чисто динамического описания реализация того или иного из различных макроскопических состояний определяется только начальными условиями.

В реальных системах, всегда подверженных флуктуациям внешних параметров, начальные условия не играют роли. Случайные перебросы системы из состояния в состояние позволяют говорить теперь лишь об определенных вероятностях нахождения системы в каждом из них.

Будем учитывать флуктуации внешних параметров, вводя в уравнение движения (37) случайный ланжевенковский источник ξ [112]. Соответствующее стохастическое уравнение движения ЭПД имеет вид

$$\partial a / \partial t = -\hat{\Lambda}^c a + \mu a - \gamma a^3 + \xi(x, t). \quad (51)$$

Здесь $\xi(x, t)$ – поле случайных возмущений, которое в простейшем случае можно считать гауссовым и дельта-коррелированным во времени и пространстве – "белым" шумом [112]:

$$\begin{aligned} \langle \xi(x, t) \rangle &= 0, \\ \langle \xi(x, t) \xi(x', t') \rangle &= \epsilon^2 \delta(x - x') \delta(t - t'). \end{aligned} \quad (52)$$

В представлении Фурье уравнение (51) имеет вид

$$\begin{aligned} A_l &= f_l(\{A\}) + \eta_l(t); \\ \eta_l(t) &= \int \xi(x, t) \Psi_l(x) dx. \end{aligned} \quad (53)$$

Здесь случайная сила $\eta_l(t)$ также является гауссовым белым шумом. Как и ξ , она обладает нулевым средним и коррелятором вида

$$\langle \eta_i(t) \eta_j(t') \rangle = 2\sigma^2 \delta_{ij} \delta(t - t'); \quad \sigma^2 = (1/2L)\epsilon^2. \quad (54)$$

Вектор дрейфа f_l в стохастической системе (53) представляет собой правую часть соответствующей детерминистической постановки задачи.

Плотность распределения вероятностей для стохастической системы (53), (54) подчинена уравнению Фоккера – Планка:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial A_l} (f_l(\{A\})P) + \sigma^2 \frac{\partial^2 P}{\partial A_l^2}. \quad (55)$$

Далее, убедимся, что вектор сноса в этом уравнении $f_i(\{A\})$ представим в виде градиента некоторого скалярного "потенциала":

$$f_i(\{A\}) = -\partial\Phi/\partial A_i. \quad (56)$$

Для этого достаточно установить, что $\partial f_i/\partial A_m = \partial f_m/\partial A_i$.

Компоненту f_i можно представить в виде

$$f_i = \Lambda_i A_i + N_i(\{A\}).$$

Здесь A_i — коэффициент Фурье-разложения функции $a(x)$. Первое слагаемое является амплитудой преобразования Фурье линейного оператора в уравнении движения (37), а $N_i(\{A\})$ — то же для нелинейной функции $N(a)$ в этом уравнении. Развернутое выражение для N_i имеет вид

$$N_i = \int e^{ik_l x} N(\sum A_j e^{ik_j x}) dx.$$

Тогда для производной $\partial f_i/\partial A_m$ получим

$$\frac{\partial f_i}{\partial A_m} = \Lambda_i \delta_{im} + \int e^{ik_l x} \frac{\partial N}{\partial a}(\dot{a}) e^{ik_m x} dx.$$

Последнее выражение, очевидно, симметрично относительно перестановки индексов, что и доказывает справедливость (56).

Потенциал Φ имеет наглядный смысл, ибо различные устойчивые стационарные решения исследованных в предыдущем разделе детерминистических систем (45), (49) являются точками локального минимума функции $\Phi(\{A\})$.

Известно, что существование потенциальной функции для вектора сноса в уравнении Фоккера — Планка достаточно для того, чтобы стационарное распределение $P(\{A\})$ удовлетворяло принципу детального баланса [113]:

$$J_i = -\sigma^2 \frac{\partial P}{\partial A_i} + f_i(\{A\})P = 0. \quad (57)$$

Последнее уравнение имеет решение:

$$P = n \exp \left[-\frac{\Phi(\{A\})}{\sigma^2} \right]. \quad (58)$$

Отсюда следует, что стабильные состояния детерминистических уравнений движения соответствуют локальным максимумам стационарного распределения вероятностей в стохастической постановке задачи.

При невырожденной бифуркации в критической точке $\mu = 0$ максимум распределения $P(\{A\})$ расщепляется на два в точках $A_c = \pm (4\mu/3\gamma)^{1/2}$. Как было показано при детерминистическом анализе, при $\mu = \Lambda_c^2$ к паре устойчивых состояний, зародившихся при первой бифуркации, добавляется еще пара, порожденная вторичной неустойчивостью. Соответственно на распределении вероятностей $P(\{A\})$ появляется два новых максимума. Но вероятности наблюдения соответствующих состояний согласно (58) экспоненциально малы. С ростом бифуркационного параметра μ растут и эти вероятности.

Опираясь на выражение (58), мы можем указать относительные веса различных макросостояний за порогом неустойчивости исходного.

ВЫВОДЫ

В рамках формального описания морфогенетического поля математической моделью (6) исследуется вопрос о самопроизвольном понижении симметрии макроскопического состояния.

Формальной основой спонтанной десимметризации (через возбуждение коллективной коротковолновой моды по механизму тьюрингова типа) является немонотонный характер дисперсионной кривой. Существенная причина заключена в межклеточных взаимодействиях типа: близкостоящих, гомогенизирующих состояние (например, диффузионных), и нелокальных, передающих эффект самоподавления (например, относительно быстрая диффузия ингибитора).

Исследованы стационарные состояния за порогом спонтанной десимметризации. Установлено нарастание их количества по мере удаления от порога. Пополнение множества стабильных макросостояний обеспечивается последовательными бифуркациями исходного симметричного состояния. При отсутствии вырождения в спектре инкрементов собственных мод малоамплитудных возмущений этого состояния структуры в закритической области сохраняют устойчивость.

При наличии такого вырождения для мод с кратными волновыми числами за порогом спонтанной десимметризации возникает вторичная неустойчивость. При этом структура, соответствующая первой бифуркационной ветви, деформируется от квазигармонической к структуре контрастного типа.

Учет флуктуаций (шума внешних параметров) позволяет ввести меру "относительной стабильности" для различных асимптотически устойчивых макросостояний за порогом спонтанной десимметризации. Она может быть определена как отношение глубин соответствующих провалов потенциальной поверхности в пространстве амплитуд собственных мод.

ГЛАВА III

КОЛЛЕКТИВНЫЕ ЯВЛЕНИЯ НА МНОГОКЛЕТОЧНОЙ ФАЗЕ РАЗВИТИЯ МИКСОМИЦЕТ *Dictyostelium Discoideum*

§ III.1. Жизненный цикл. Коллективные процессы в развитии псевдоплазмодия. Химическая сигнализация, хемотаксис, клеточная дифференцировка

D. discoideum — очень удобная экспериментальная модель для биологии развития. Она обладает преимуществами микроорганизмов (короткий жизненный цикл, протекающий в контролируемых экспериментальных условиях) и вместе с тем — типичными чертами онтогенеза многоклеточных (клеточная дифференцировка и морфогенез), которые представлены здесь в предельно простой форме. Благодаря этому и в результате интенсивных экспериментальных исследований этот объект стал сейчас наиболее полно изученной экспериментальной моделью биологии развития. На ней

мы попытаемся под разными углами осветить главный вопрос настоящей работы: *как формируются групповые свойства в клеточных коллективах?*

Амебы *D. discoideum* (*Dd*) — эукариотический микроорганизм, обитающий в естественных условиях в лесной почве и питающийся почвенными бактериями [114]. Клетки *Dd* живут и размножаются делением как одиночные, невзаимодействующие амебы, пока пища находится в достатке. Истощение ее включает программу развития, главной чертой которой является коллективность [115].

Для экспериментов *D. discoideum* выращивают на плоской поверхности агара в чашке Петри. После определенного периода голодания, зависящего от внешних условий (температура, влажность) — интерфазы [116], — уже неделящиеся амебы приобретают способность к агрегации [117]. Агрегация начинается синхронно на территориях порядка 1 см² и осуществляется путем направленного коллективного движения клеток к выделенным агрегационным центрам. В результате формируются округлые многоклеточные массы, содержащие в нормальных условиях порядка 10⁵ клеток [115]. Далее агрегат трансформируется в вытянутый гильзоподобный псевдоплазмодий и в таком виде способен более или менее долго (в зависимости от различных факторов внешних условий: *T*, pH) мигрировать как целое.

Мигрирующий псевдоплазмодий — слизевик — обладает рядом характерных черт поведения, отсутствовавших у одиночных клеток. Это дифференцировка и пространственное расслоение двух клеточных типов, направленное движение к источникам света и тепла [115].

За фазой миграции слизевика наступает завершающее цикл развития *D. discoideum* образование плодового тела. Начальная дифференциация двух сортов клеток, проявляющаяся на стадии мигрирующего псевдоплазмодия, в плодном теле завершается терминальной дифференцировкой генеративных клеток — спор (примерно 60% общего числа клеток) и соматических — стебель (30%) [115]. В благоприятных условиях споры дают начало новому жизненному циклу. Общая схема многоклеточного развития *Dd* представлена на рис. 14.

Далее приводится сводка основных экспериментальных результатов по многоклеточной фазе развития *D. discoideum*. При этом мы акцентируем внимание на формах коллективного поведения клеток и на обуславливающих их формах активности индивидуальных клеток.

Агрегация амеб. Первым макроскопическим событием в популяции голодающих клеток является ассоциация их в небольшие кластеры. Это происходит на четвертом часу от начала голодания (здесь и ниже все приводимые сроки отсчитываются от начала голодания). Кластеры удалены друг от друга в среднем на 100 мкм [118, 119]. Эта ранняя агрегация амеб неустойчива — кластеры диспергируются, восстанавливая гомогенность клеточной популяции [118].

Движение клеток при агрегации суть хемотаксис [120, 121]. Аттрактантом для клеток интерфазы является циклический нуклеотид 3–5 цАМФ [122–124]. Последний, как будет показано, является универсальным биохимическим интермедиатом клеточных коммуникаций на протяжении всего многоклеточного развития *Dd*.

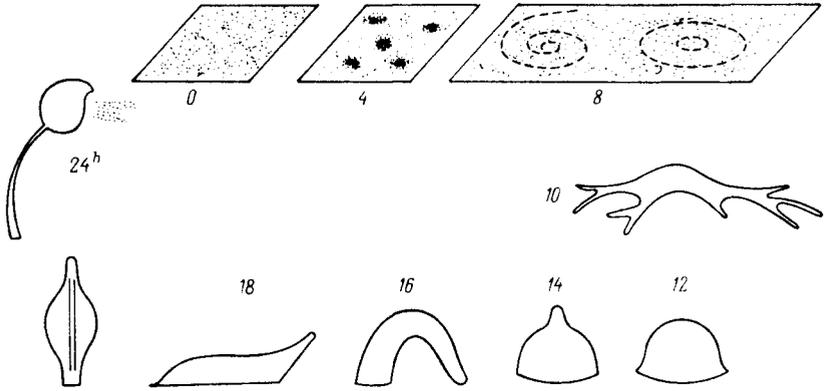


Рис. 14. Схема коллективной фазы жизненного цикла *Dictyostelium discoideum*. Числа соответствуют времени развития (в часах) от момента истощения пищи; 0 – гомогенное клеточное поле, 4 – мелкомасштабная кластеризация амёб, 8 – фронты движущихся центростремительно клеток при волновой агрегации, 10 – завершение агрегации, 12–18 – этапы формообразования мигрирующего псевдоплазмодия, 24 – плодовое тело

Спонтанная, непрерывная секреция цАМФ клетками *Dd* наблюдается с самого начала интерфазы [118, 125]. В первые два часа уровень секреции низок и составляет порядка 10^{-9} М [118, 125]. Этот уровень существенно возрастает (примерно в 40 раз), начиная со второго часа вследствие активации ключевого фермента синтеза цАМФ-аденилат циклазы [126].

При хемотаксисе амёбы реагируют на пространственный градиент цАМФ [127]. Порог разрешения составляет $2 \cdot 10^{-8}$ М/мм [128]. Связывая цАМФ рецепторами плазматической мембраны, клетка вытягивает псевдоподию в направлении возрастания концентрации аттрактанта [129]. Внутриклеточным интермедиатом хемотактической реакции является циклический ГМФ [130]. Локальная активация движения – одностороннее вытягивание псевдоподии – возникает вследствие локального входящего потока ионов Ca^{++} , индуцированного связанными с цАМФ рецепторами [131].

Если исходная плотность клеточной популяции выше пороговой ($7 \cdot 10^{-4}$ кл./см²), то на восьмом–десятом часу (раньше в более плотной популяции) начинается коллективная агрегация амёб [118, 132]. Ранее хаотические, движения клеток на этой фазе организованы распространяющимися волнами аттрактанта (рис. 15). Волны цАМФ генерируются авто-

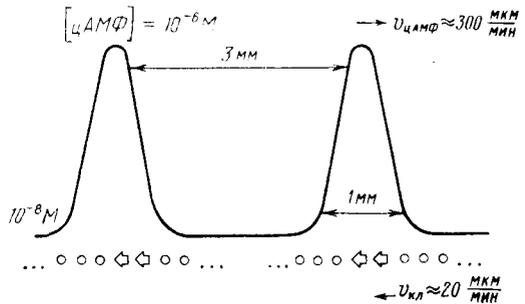


Рис. 15. Агрегационные волны в популяции амёб *D. discoideum*. Стрелки – движущиеся клетки на переднем фронте волны цАМФ, кружки – покоящиеся клетки

номно, ритмически секретирующими клетками [118]. Кинематические характеристики волн аттрактанта и движения клеток приведены на рис. 15.

Масштаб территории, контролируемой одним агрегационным центром, существенно превышает масштаб диффузионного распространения цАМФ (сантиметры по сравнению с 100 мкм [118]). Объяснение этого факта дается свойствами возбудимой среды [133], которыми обладает популяция агрегационно-компетентных клеток *Dd*. Далекое распространение хемотактического сигнала осуществляется по эстафетному механизму, благодаря способности к индуцированной секреции (ИС) цАМФ [134, 135]. В ответ на стимул внешним цАМФ клетки *Dd* синтезируют и испускают во внешнюю среду стандартный импульс цАМФ (10^7 молекул) [135]. Направленность распространения волн аттрактанта обеспечивается рефрактерным периодом — 8–10-минутной фазой невосприимчивости к внешнему стимулу после отклика на предыдущий.

Индукцированная секреция — результат активации аденилатциклазы комплексом рецептор-цАМФ [136–138]. В инактивированном состоянии аденилатциклазы клетка неспособна синтезировать цАМФ, что и определяет ее рефрактерность.

Только восстановления способности к активации аденилатциклазы системы недостаточно для повторного распространения волны аттрактанта. Необходимо также поддерживать на уровне не ниже определенного критического отношение сигнал/фон [139]. Очевидно, этому должно препятствовать накопление во внешней среде в ходе агрегации цАМФ. Фоновый уровень аттрактанта удерживается низким за счет активности гидролизующего фермента — фосфодиэстеразы [140–142]. Синтез и выделение во внеклеточное пространство фосфодиэстеразы является еще одним, помимо двигательного и ИС, откликом клетки на связывание внешнего цАМФ [143]. Рост активности этого фермента всегда предшествует и является необходимой предпосылкой начала крупномасштабной волновой агрегации амёб [144].

Волны аттрактанта, распространяющиеся в компетентном к ИС агрегационном поле *Dictyostelium*, генерируются в центре каждой агрегационной территории автономно, ритмически сигнализирующими клетками (АСК) [145]. Доля АСК по отношению к полной численности популяции растет в ходе агрегации от $2 \cdot 10^{-7}$ в начале до 10^{-2} в конце интерфазы [118, 146]. Период пульсирующей секреции цАМФ падает от 10 мин в начале волновой агрегации до двух минут при ее завершении [147]. Ритмичность испускания аттрактанта связана с осцилляторной активностью аденилатциклазы [138].

В ходе волновой агрегации меняется геометрия агрегационных движений. На ранней стадии клетки движутся к агрегационным центрам спиральными или круговыми фронтами; к концу волновой агрегации центростремительное движение амёб организуется в радиальные струи [115]. В струях клетки образуют плотные, стабильные контакты [148]. Соответствующая способность вырабатывается в ходе волновой агрегации под влиянием ритмических импульсов цАМФ [149].

Резюмируем приведенные сведения по первому этапу коллективного развития *D. discoideum*. За время интерфазы популяция амёб проходит путь развития от однородного, диспергированного состояния изолирован-

ных клеток до клеточных агрегатов. События на этом этапе можно отнести к двум временным шкалам с типичными масштабами часы и минуты.

Более медленная шкала характеризует последовательность смены макроскопической картины агрегационного поля: 1 -- однородное распределение, 2 -- мелкомасштабная кластеризация, 3 -- крупномасштабная волновая агрегация, 4 -- струйная центростремительная агрегация.

Эта последовательность отражает эволюцию форм активности индивидуальных клеток: 1 -- спонтанная непрерывная секреция цАМФ в относительно малых количествах, связывание цАМФ и хемотаксис по его градиенту, 2 -- повышение уровня секреции цАМФ, 3 -- способность к индуцированной секреции цАМФ и автономная ритмическая сигнализация, 4 -- способность к формированию межклеточных контактов.

Заметим, что названная последовательность для одиночных клеток наблюдается и в суспензии -- в условиях отсутствия какой-либо макроскопической организации [150].

Развитие событий в медленной шкале времени управляется на внутриклеточном уровне. Соответствующие биохимические предпосылки, определяющие эволюцию форм активности индивидуальных клеток, таковы: активация аденилатциклазной системы, активация фосфодиэстеразы, осцилляторный режим функционирования аденилатциклазы.

Более быстрые процессы -- с временным масштабом порядка минут -- связаны с синтезом и гидролизом цАМФ, т.е. с индуцированной секрецией и автономными пульсациями, его диффузией во внеклеточном пространстве и хемотактическим движением клеток.

Задачей феноменологической теории является увязать данные по "микроскопическому" уровню, т.е. перечисленные потенциалы клеток, с событиями "макроскопического" уровня -- коллективным поведением агрегирующих клеток. Этому мы посвятим § 3, 4 настоящей главы.

Развитие на стадии псевдоплазмодия. В преагрегационных амебах *Dd* экспрессируется не более пятой части генома [151]. В период интерфазы к белкам вегетативной фазы добавляется незначительная часть новых. Кардинальное изменение спектра синтезируемых белков, связанное с многоклеточным существованием, происходит в постагрегационный период и обусловлено формированием плотных контактов на завершающих этапах агрегации [152, 153]. Контактные межклеточные взаимодействия в *Dd* индуцируют белковый синтез, контролируя транскрипцию около 3000 соответствующих поздних мРНК [152].

Каким путем передается сигнал от клеточной поверхности к генам, неизвестно. Однако установлено, что и здесь цАМФ играет определенную роль, а именно: стабилизирует относительно короткоживущую постагрегационную мРНК [154]. Есть данные о дифференцировке *изолированных* клеток *Dd*, характерной для постагрегационной стадии развития [155--157]. Это удается наблюдать без клеточной агрегации, но в достаточно плотных популяциях при добавлении в миллимолярных концентрациях экзогенного цАМФ.

Существенным качественным приобретением объединения в агрегаты для клеток *Dd* является дивергенция клеточных типов. Масса клеток, до объединения функционально однородная, в агрегате расслаивается на презумптивно споровые (ПСР) и стеблевые (ПСТ). Названные клетки

отличаются друг от друга морфологией, степенью вакуолизации, антигенными детерминантами поверхности, биохимическим составом цитоплазмы [115].

Существует целый ряд способов выборочно метить каждый из двух типов клеток псевдоплазмодия. Это дало возможность установить следующее. Дивергенция ПСТ и ПСП типов складывается уже на стадии раннего агрегата [158]. Сначала она не сопряжена с какой-либо пространственной упорядоченностью; обе разновидности клеток распределены диффузно по всему объему агрегата [159]. Начиная с этой стадии пропорция ПСТ/ПСП заметно не изменяется; меняется лишь картина пространственного распределения клеток. Это изменение сопряжено с элонгацией агрегата при формообразовании мигрирующего слизевика и состоит в бинарном расслоении клеток [160] (рис. 16).

В ходе сортировки престолевые клетки собираются в компактное скопление, которое в конечном итоге оказывается во фронтальной области мигрирующего слизевика. Таким образом, здесь мы обнаруживаем простейший вариант макроскопической организации многоклеточного организма. Таким же простейшим и вместе с тем типичным для развития многоклеточных представляется и сопряженный процесс формообразования — от полусферической формы раннего агрегата к вытянутой, гильзоподобной форме мигрирующего псевдоплазмодия.

Что из опыта известно о механизмах, управляющих названными преобразованиями?

1. Движения клеток при сортировке. Движущей силой здесь, как и при агрегации, является хемотаксис по градиенту цАМФ [161, 162]. В работах [163, 164] зарегистрирован мономерный градиент последнего с максимумом на фронтальном полюсе слизевика. Если в поле дисагрегированных клеток псевдоплазмодия поместить источник экзогенного цАМФ, клетки собираются к нему [162], причем в ходе собирания престолевые клетки оттесняют преспоровые. Это указывает на большую хемотактическую активность ПСТ-клеток. Пипетка с цАМФ, вводимая непосредственно в агрегат, также собирает ПСТ-клетки [165].

2. Молекулярные факторы дифференцировки (морфогены). цАМФ, хотя и включен в систему регуляции активности постагрегационных генов (см. выше), не способен контролировать выбор клетками направления специализации. Специфичности его влияния на преспоровую или престолевую дифференцировку не обнаружено [156].

Такой специфичностью обладает выделенный не так давно агент, получивший название ДИФ (differentiation inducing factor) [166]. ДИФ — гидрофобный, низкомолекулярный фактор (молекулярная масса 500 Да), индуцирующий включение престолевой специализации клеток *Dd*. В опытах с клеточными культурами показано, что ДИФ способен переориентировать клетки с ПСП- на ПСТ-детерминацию [166].

ДИФ способен диффундировать во внеклеточной среде. Однако он производится ПСТ-клетками в малых количествах и поэтому обладает эффектом только при достаточно высоких плотностях клеточной культуры ($\sim 10^4$ кл./см²) [156]. Концентрация, в которой ДИФ эффективно индуцирует ПСТ-детерминацию, порядка 10^{-10} М [166].

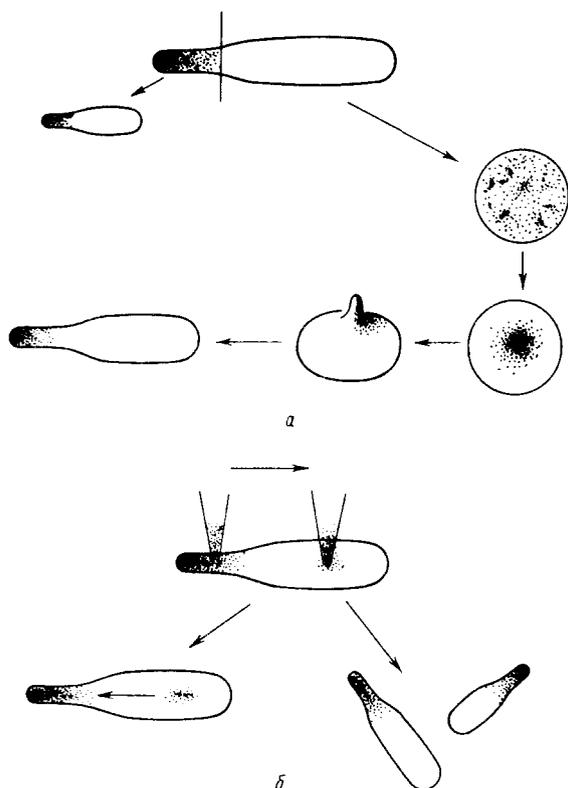


Рис. 16. Схема экспериментов по регенерации (а) и трансплантации (б). Несмотря на изменение "позиционных значений" при трансплантации для ПСТ-клеток, изменения типа детерминации последних не происходит [182]. Паттерн ПСТ/ПСП-детерминации в псевдоплазмодии организуется без участия "позиционной информации"

Стопроцентной ориентации клеток агрегата на путь престолебовой детерминации препятствует наличие агента, антагонистического по действию ДИФ. Таковым является аммиак. Аммиак присутствует в клетках *Dd* в существенных количествах, являясь продуктом деградации белков вегетативной фазы [167, 168].

Аммиак влияет на биохимические процессы, диффундируя в клетку, протонируясь и тем самым повышая внутриклеточный рН. Повышение рН, как было показано, подавляет эффект ДИФ, ингибируя ПСТ и индуцируя ПСП-детерминацию [169]. Низкий рН дает обратный эффект.

Совместное действие ДИФ и NH_3 в клетках *Dd* нацелено именно на управление внутриклеточным рН, который уже сдвигает в том или ином направлении тип детерминации [169]. Напомним при этом, что ДИФ эффективен при очень низких концентрациях и, следовательно, действует не просто как слабая кислота. Вероятнее всего, он ингибирует экспорт протонов из клетки. Его действие на выбор специализации клетками *Dd* полностью имитируется ингибиторами H^+ -АТФ-азы, т.е. протонного насоса плазматической мембраны [169].

Таким образом, ДИФ и NH_3 может быть приписана роль *морфогенов* – молекулярных факторов, контролирующих выбор пути развития клетками *Dd*. Остается лишь прояснить, каким образом формируется макроскопический порядок – порядок размещения ПСТ- и ПСП-клеток в теле псевдоплазмодия? Этому вопросу будут посвящены § III.5, III.6.

3. Морфологическая поляризация. Ранний агрегат как морфогенетическое поле. В гл. I мы выделили в качестве универсального, элементарного акта развития многоклеточных процесс самоорганизации морфогенетического поля. Все характерные для морфогенетического поля черты группового поведения клеток присущи и клеточному агрегату *D. discoideum*. Напомним, что в качестве таких черт были названы: а) однородная компетенция всех клеток поля, б) отношения доминирования, подавления между частями поля и в) морфалакسيس – регуляция пропорций пространственной организации поля.

Самоорганизация поля в агрегате *Dd* представлена в виде расслоения престолевых и преспоровых клеток и последующей морфологической поляризации.

В эксперименте при изоляции части тела псевдоплазмодия в ней происходит трансдетерминация клеток ПСТ в ПСП или наоборот, в зависимости от отношения ПСТ/ПСП в изолированной части [160] (рис. 16). Следовательно, даже детерминированные клетки псевдоплазмодия сохраняют способность к переключению в альтернативный тип детерминации, что и свидетельствует об *однородной компетенции*.

Трансдетерминация продолжается до тех пор, пока не восстановится “правильная” структура поля, т.е. исходное отношение ПСТ/ПСП и исходный тип пространственной организации – бинарное расслоение [170, 171]. Эта структура оказывается неизменной при вариации количества материала в изоляте в очень широких пределах – от 10 до 10^5 клеток [160]. Таким способом для морфогенетического поля псевдоплазмодия представлена способность к *регуляции пропорций строения*.

Наконец, наличие отношений типа доминирования в данном поле хорошо демонстрируется в серии трансплантационных экспериментов [172], которые более детально будут проанализированы в § III.7.

“Организатором” оси развития агрегата *D. discoideum*, т.е. оси морфологической поляризации и расслоения ПСТ- и ПСП-клеток, является группа ПСТ-клеток (примерно треть полного их числа), занимающая фронтальную область псевдоплазмодия [173]. Свойства этой группы клеток как шлемановского “организатора”*) демонстрируются экспериментами по регенерации и трансплантации [173].

По-видимому, единственным отличием клеток данной группы от остальных ПСТ-клеток является повышенный уровень синтеза и секреции цАМФ [173].

*) По Шлеману “организатор” – это группа клеток в зародыше, которая контролирует фиксацию оси развития и ведет себя автономно в опытах по пересадкам.

§ III.2. Теоретические модели

Формальное описание мод индивидуальной активности клеток. а) Хемотаксис. Феноменологическое описание хемотаксиса амёб во внешнем, неизменном поле градиента аттрактанта может быть получено на основании макроскопического уравнения непрерывности [174]. Считая, что скорость направленного перемещения клеток пропорциональна градиенту концентрации c аттрактанта $v = \mu \nabla c$, и учитывая ненаправленную диффузионную компоненту движения, выражение для потока клеток можно представить в виде

$$J_b = \mu b \nabla c - D_b \nabla b. \quad (1)$$

Здесь b и c — средние концентрации клеток и аттрактанта ($1/\text{см}^2$), μ — коэффициент хемотактической подвижности, D_b — коэффициент диффузии клеток. Отсюда и из уравнения непрерывности получается кинетическое уравнение для плотности клеток:

$$\partial b / \partial t = -\nabla(\mu b \nabla c) + D_b \nabla^2 b. \quad (2)$$

В работе [175] к этому уравнению было добавлено уравнение для аттрактанта. В нем учтена монотонная секреция, распад под действием гидролизующего фермента и диффузия в среде.

Гомогенное распределение клеток и аттрактанта было проанализировано на устойчивость по отношению к малым возмущениям плотности. С повышением коэффициента хемотактической подвижности и темпа секреции аттрактанта гомогенное распределение перестает быть устойчивым к неоднородным в пространстве возмущениям. Однако остался открытым вопрос, что ждет данную систему за порогом разрушения однородного состояния. Нужны ли дополнительные нелинейные механизмы для стабилизации нового? Эти вопросы важны при рассмотрении ранней, мелкомасштабной кластеризации амёб. Их исследованию посвящен § III.3.

б) Генерация цАМФ. Известны основные биохимические компоненты, участвующие в управлении синтезом цАМФ (АТФ, аденилатциклаза, фосфодиэстераза, рецепторы плазматической мембраны, кальций) [16]. Но для построения полной и адекватной теоретической модели системы регуляции цАМФ данных пока недостаточно. Поэтому формулировка математических моделей в литературе имеет феноменологический характер — некоторые участники метаболизма цАМФ обходятся вниманием, относительно других принимаются нужные допущения с ориентацией на получение наблюдаемых режимов генерации цАМФ. Мы представим одну модель такого рода.

Общим для всех моделей, на основе которых имитируются такие режимы, как индуцированный импульсный отклик (возбудимость) и автоколебания, является существование двух петель обратной связи — положительной и отрицательной. В цепи синтеза цАМФ первая включает в себя аденилатциклазу, фосфодиэстеразу, АТФ-пирофосфогидролазу [16]. Отрицательная обратная связь опосредуется ингибиторами, угнетающими активность аденилатциклазы. На их роль в модели [176] выделяются низкомолекулярные катаболиты (глюкоза, аминокислоты и др.). Участие цАМФ в отрицательной обратной связи обуславливается его способностью

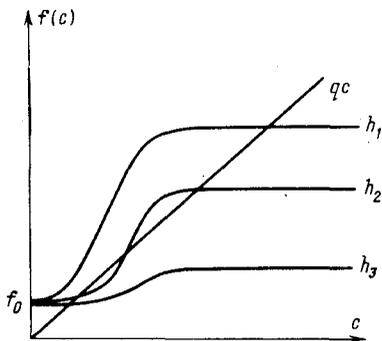
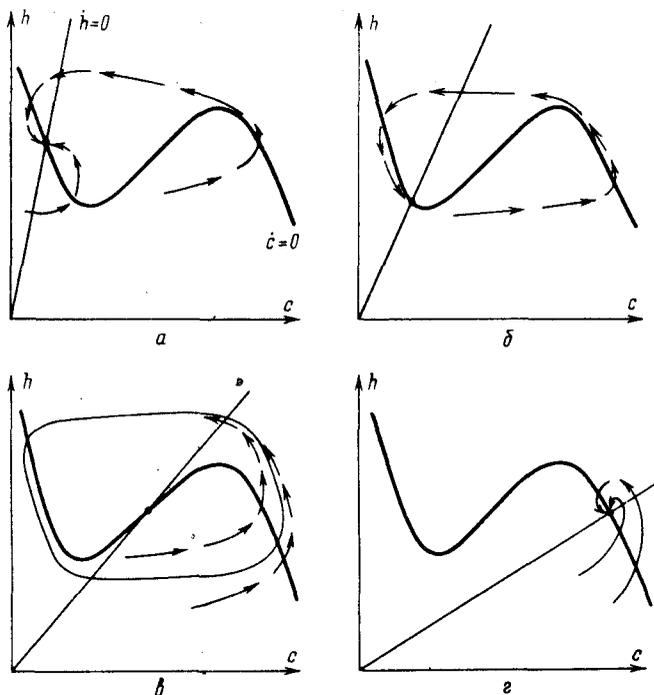


Рис. 17. Предполагаемый в работе [176] качественный вид функции автокаталитического производства цАМФ при трех уровнях ингибитора h ($h_1 < h_2 < h_3$)

Рис. 18. Фазовый портрет динамической системы регуляции синтеза цАМФ, построенный для кинетической системы (3) при четырех значениях контрольного параметра S . Соответствующие режимы: a – гомеостатическое равновесие с низким уровнем цАМФ, b – ждущий режим (релейная активность), v – режим автономной ритмической секреции, z – гомеостатическое равновесие с относительно высоким уровнем цАМФ



активировать катаболизм запасенных клеткой резервов (например, гликогена) [16].

Все эти детали в математическую модель работы [176] не включаются, но качественно отражены в ней. В масштабе времени относительно быстрых изменений (τ порядка минут) выделяются две динамические переменные – концентрации цАМФ и ингибитора его синтеза, c и h соответственно. Кинетические уравнения для них записываются в виде

$$\frac{\partial c}{\partial t} = f(c, h) - qc, \quad (3a)$$

$$\frac{\partial h}{\partial t} = nSc - ph. \quad (3б)$$

Здесь функция производства цАМФ $f(c, h)$ имеет вид в зависимости от c и h , как показано на рис. 17. Ее S-образный характер отражает положительную, кооперативную петлю обратной связи и насыщение, соответствующее максимальной активности аденилатциклазы. Низкий базальный уровень синтеза f_0 считается малочувствительным к ингибитору.

Член линейного распада в уравнении (3а) имитирует отток цАМФ во внеклеточное пространство и его гидролиз фосфодиэстеразой.

В уравнении для ингибитора отражена активация его производства действием цАМФ, составляющая первое звено отрицательной обратной связи. Параметр S в этом уравнении имеет смысл запасенного резерва предшественника ингибитора [176]. Принимается, что медленный расход этих резервов в ходе голодания клеток Dd задает последовательную смену режимов генерации цАМФ в медленной шкале времени многоклеточного развития. В рамках формальной модели (3) хорошо демонстрируется возможность такой регуляции развития.

Наглядную качественную картину поведения в быстрой шкале времени дает анализ фазового портрета системы (3) на плоскости $\{c, h\}$. В зависимости от значения параметра S меняется характер пересечения нуль-изоклин $\dot{c} = 0$ и $\dot{h} = 0$, а с ним и динамический режим системы. При монотонном убывании S складывается четыре характерных взаимных расположения изоклин, показанных на рис. 18.

Смена ситуации на фазовой плоскости рис. 18 вызывает следующие преобразования: а) гомеостатическая регуляция с низким уровнем c (1); б) состояние возбудимости, т.е. способность к синтезу стандартного импульса цАМФ в ответ на достаточно произвольный внешний стимул (2); в) самоподдерживающиеся осцилляции синтеза цАМФ (3); г) стационарное производство цАМФ на относительно высоком уровне концентрации (4).

Таким образом, во временном масштабе изменения параметра в динамической модели (3) чередуются режимы генерации цАМФ, характерные для развития Dd от популяции изолированных амёб до многоклеточного агрегата.

Математическое описание развития на уровне индивидуальных клеток становится замкнутым, если к динамической системе в быстрой шкале (3) добавить медленную эволюцию управляющего параметра S . Соответствующее его смыслу (резерв запасенных на вегетативной фазе высокомолекулярных предшественников, расход которого катализируется цАМФ [176]) кинетическое уравнение имеет вид

$$\dot{S} = -\epsilon S c. \quad (4)$$

Очевидно, для количественного сопоставления с опытными данными приведенная модель слишком груба. Однако она, по-видимому, правильно отражает такие качественные черты, как нелинейный автокатализ при синтезе цАМФ, ингибирование аденилатциклазы, снимающееся по мере развития, наличие отрицательной обратной связи в системе регуляции синтеза цАМФ. Адекватно и выражение этих черт в виде топологических особенностей фазового портрета динамической модели.

Коллективное поведение амёб при волновой агрегации. После того как установлено наличие главных свойств ак-

тивной среды — возбудимости и рефрактерности [177] — в системе производства аттрактанта, возникновение волновых режимов распространения хемотактического сигнала уже не порождает новых проблем. При наличии в такой среде локального источника периодического возбуждения и механизма его изотропной передачи источник становится "ведущим центром" — центром расходящихся круговых фронтов возбуждения. Более того, локальные неоднородности в среде могут вызывать разрывы кольцевых фронтов и зарождение волнового режима, отличного от ведущего центра. Это режим вращающихся с частотой, равной периоду рефрактерности, спиральных волн — так называемый ревербератор [177].

Частота ревербератора должна быть выше частоты ведущего центра [177]. Измерения в волновом поле агрегирующих амёб *Dd* оказываются в соответствии с этим теоретическим ожиданием — спиральные волны в этом поле имеют более короткий период, чем кольцевые [178].

В принципе возможен (и в литературе обсуждался [179]) иной механизм генерации спиральных волн в агрегационном поле *Dd*. Этот механизм предполагает, что среда находится не в ждущем режиме, как в предыдущем механизме, а в режиме автоколебаний. Авторы работы [179] предполагают, что в течение преагрегационного развития все клетки агрегационного поля сдвигаются за порог колебательной неустойчивости.

В этих условиях на масштабах, превышающих характерный размер диффузионного перемешивания для цАМФ (~100 мкм), макроскопическая однородность должна нарушаться. Из гомогенных колебаний, как показано [179], рождаются именно спиральные волны, вращающиеся вокруг выделенного центра.

Нам кажется, что последний механизм маловероятен. Мы уже цитировали данные [118, 146], согласно которым автономной сигнальной активностью на фазе волновой агрегации обладает незначительная доля клеток. Это обстоятельство противоречит заложенному в обсуждаемый механизм предположению об одновременной ритмической активности у всех клеток агрегационного поля. Мы не находим качественных различий между волнами химической сигнализации, управляющими движением клеток *Dd*, и химическими волнами в реакторе Белоусова — Жаботинского — Заикина [180]. Последним в литературе уделялось достаточное внимание — как с экспериментальной, так и с теоретической точек зрения (см. ссылки в [177]).

Начало волновой агрегации амёб приходится на однородную популяцию клеток. На более поздней струйной стадии агрегационное поле уже неоднородно. К этому периоду существенно возрастает доля автономно секретирующих клеток, формируются ядра из таких клеток в центрах агрегационных территорий [118]. Для этой стадии характерны свои особые черты макроскопической организации поля. В литературе, посвященной агрегации *D. discoideum*, им уделено недостаточно внимания. Между тем, наблюдаемая в опыте (рис. 19) структура агрегационных ядер нуждается в объяснении. Мы попытаемся заполнить существующий пробел в § III.4.

Формообразовательные процессы в агрегате. Теория формообразования мигрирующего псевдоплазмодия отсутствует. "Движущие силы" для отдельных клеток агрегата известны: это, как и на стадии агрегации, хемотаксис по градиенту цАМФ. Но как эти "внутрен-

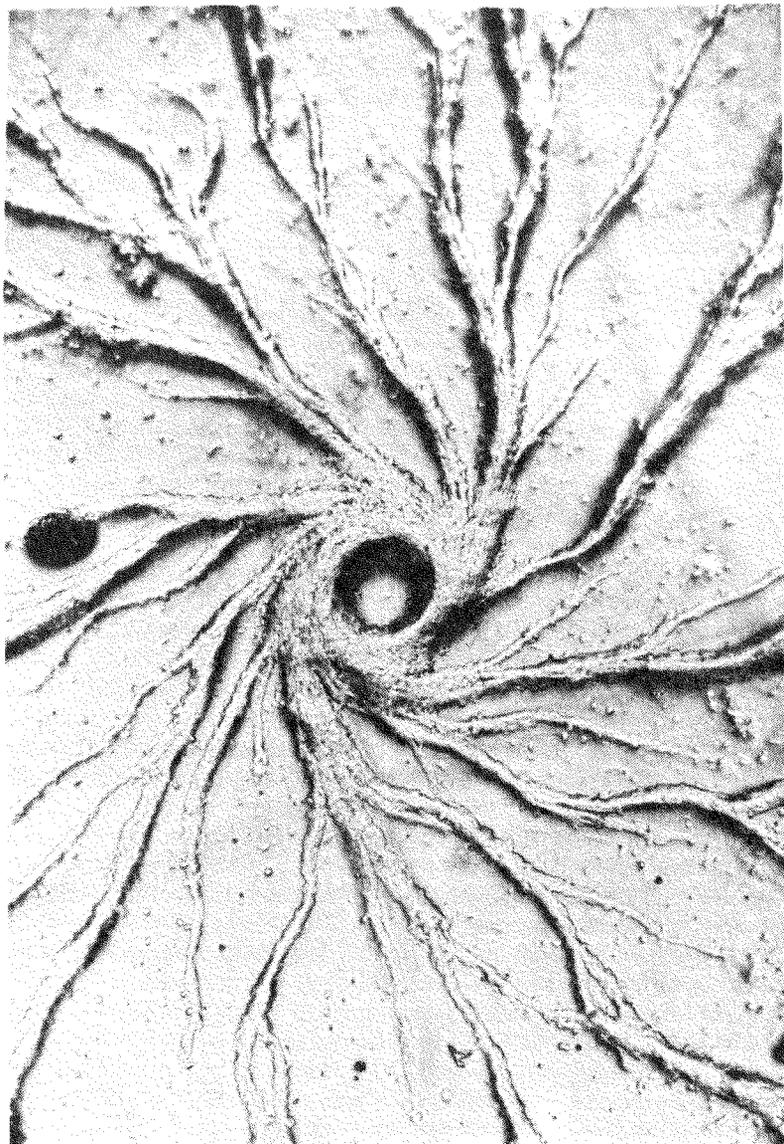


Рис. 19. Вид агрегационного поля *D. discoideum* на сталии струйной агрегации. Тяжи сформированы контактирующими клетками. Размеры поля 0,7 × 1 мм. Фото О. Потоповой и С.И. Бейлиной (ИБФ АН СССР)

ние силы” вызывают преобразования формы агрегата в целом — остается неясным.

Нам известна лишь одна теоретическая работа, в которой предпринята попытка выделить существенные физические факторы, управляющие формообразованием агрегата. В работе [181] клеточная масса рассматривается как вязкая сплошная среда, характеризующаяся такими физическими параметрами, как гидростатическое давление и поверхностное натяжение.

К названным физическим факторам добавлен механико-химический — хемотактическое движение клеток в поле концентрации аттрактанта. Предлагается следующее выражение для соответствующей объемной силы:

$$F_{ch} = \eta \nabla c. \quad (5)$$

Здесь c — локальная концентрация аттрактанта

В качестве исходной посылки анализа в работе [181] вводится форма слизики из эксперимента. Эта форма считается механически равновесной. Соответствующее условие отсутствия внутренних перемещений выражается равенством нулю суммарной объемной силы — хемотактической (5) и гидростатической (пропорциональной градиенту давления). Отсюда удается получить информацию о распределении концентрации аттрактанта.

В данной постановке задачи обходится вопрос о становлении пространственной формы слизики. Этим вопросом мы будем заниматься в § III.6.

Выводы и неразрешенные вопросы. Из предыдущей сводки экспериментальных результатов и из цитированной литературы можно заключить, что проблема организации многоклеточного развития для *Dictyostelium discoideum* имеет хорошую фактическую основу. Для данного объекта можно назвать конкретные молекулярные агенты, которые обеспечивают межклеточные коммуникации, управляют движением клеток и их дифференцировкой.

Если не полное понимание, то по крайней мере достаточно полное феноменологическое описание различных форм индивидуальной активности клеток на последовательных стадиях развития *Dd* имеется. Для целей настоящего исследования этого достаточно.

Свою задачу мы видим в том, чтобы описать и обосновать, исходя из более элементарных свойств, наблюдаемые режимы группового поведения клеток. Такими “более элементарными свойствами” являются различные формы индивидуальной активности клеток.

Более конкретно, нас будет интересовать:

1. *Довольноя, мелкомасштабная кластеризация клеток.* Будет проведен анализ модели спонтанного нарушения однородности в популяции клеток, обладающих монотонной секреторной и хемотактической активностями.

2. *Крупномасштабная агрегация на фазе струеобразования.* Здесь необходимо обосновать теоретически наблюдаемые режимы сигнализации и структуру ядра агрегационной территории.

3. *Дивергенция клеточных типов в агрегате.* Вопрос состоит в исследовании механизмов глобального контроля долей дифференцированных клеток и их пространственного расслоения.

4. *Формообразование агрегата.* Вопрос состоит в выяснении движущих сил преобразования формы раннего агрегата.

§ 3.3. Мелкомасштабная кластеризация клеток

Первым после начала голодания достижением амёб *Dd* является способность к рещции внешнего цАМФ и использование его в качестве хемотактического сигнала. Доля хемотактически активных клеток, чувствительных к цАМФ, нарастает до единицы в интервале от второго до четвертого часа интерфазы. К четвертому часу существенно повышается также уровень спонтанной, монотонной секреции цАМФ. Активность фосфодиэстеразы вплоть до начала крупномасштабной волновой агрегации примерно постоянна.

Эти фактические сведения, более подробно обсуждавшиеся в § 3.1, положены в основу формулировки кинетической модели

$$\partial c / \partial t = f_0 b - qc + D_c \nabla^2 c, \quad (6)$$

$$\partial b / \partial t = -\nabla(\mu b \nabla c) + D_b \nabla^2 b - \omega(b - b_0). \quad (7)$$

Здесь c и b — концентрации аттрактанта и клеток (на единицу поверхности), способных к восприятию и хемотактическому отклику на цАМФ. Параметр f_0 задает темп производства цАМФ на единицу поверхностной концентрации клеток; q — константа скорости распада цАМФ в результате гидролизующей активности фосфодиэстеразы.

Количественные оценки для этих параметров на основании литературных данных составляют $q \sim 10^{-1} \text{ с}^{-1}$, $f_0 \sim 10^{-13} \text{ М/(кл.}\cdot\text{с)}$ до подъема аденилатциклазной активности и 10^{-12} — после него. D_c — коэффициент поверхностной диффузии цАМФ, равный по порядку величины $10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$; μ и $D_b \sim 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$ — коэффициенты соответственно направленной хемотактической и ненаправленной диффузионной подвижностей клеток *Dd*; b_0 — средняя концентрация активных клеток ([183], § 3.1).

Макроскопическое событие, которое мы хотим описать, опираясь на уравнения (6), (7), состоит в спонтанном нарушении однородности. Предполагаемой причиной этого события является потеря стабильности однородного распределения клеток. Качественная предпосылка для неустойчивости такова. Допустим, в некоторой области произошло флуктуационное скопление клеток. Тогда здесь же оказывается повышенным уровень синтеза аттрактанта. Из-за его диффузии в окрестности скопления возникает градиент концентрации c , направленный к точке наибольшей плотности клеток. Этот градиент вызывает хемотактический поток клеток к образовавшемуся скоплению из его окрестностей. В результате флуктуационно возникшее расслоение должно нарастать. Очевидно, диффузия клеток препятствует их аккумуляции; поэтому для усиления расслоения необходим достаточный темп производства аттрактанта. Действительно, спонтанная дегомогенизация в поле амёб на четвертом часу развития сопряжена во времени со значительным повышением активности аденилатциклазы (см. § 3.1).

Рассмотрим теперь этот вопрос с более строгих позиций [184]. Кинетическая система (6), (7) при любых значениях параметров допускает однородное стационарное состояние:

$$\bar{b} = b_0, \quad \bar{c} = (f_0/q)b_0. \quad (8)$$

Иследуем его устойчивость к возмущениям малой амплитуды.

Линеаризованные уравнения движения для малоамплитудных отклонений $\delta b = b(x, t) - b_0$, $\delta c = c - \bar{c}$ имеют вид

$$\begin{aligned} \partial \delta b / \partial t &= -\omega \delta b + D_b \nabla^2 \delta b - \mu b_0 \nabla^2 \delta c, \\ \partial \delta c / \partial t &= f_0 \delta b - q \delta c + D_c \nabla^2 \delta c. \end{aligned} \quad (9)$$

Следуя стандартной схеме анализа (гл. II), выясним направление эволюции нормальных – гармонических мод:

$$\delta b, \delta c \sim \exp[\lambda(k)t + i\bar{k}r]. \quad (10)$$

После подстановки отклонений δb , δc в форме (10) в линеаризованные уравнения (9) получаем характеристическое уравнение, которое связывает временной показатель λ с волновым числом k :

$$\text{Det} \begin{pmatrix} -q - D_c k^2 - \lambda & f_0 \\ \mu b_0 k^2 & -\omega - D_b k^2 - \lambda \end{pmatrix} = 0. \quad (11)$$

Верхняя из пары ветвей $\lambda(k)$ – решений уравнения (11) – оказывается немонотонной, имея максимум при значении волнового числа $k_{\text{кр}}$:

$$k_{\text{кр}}^2 = [f_0 \mu b_0 - (\omega D_c + q D_b)] / (2 D_c D_b). \quad (12)$$

Именно это обстоятельство, как отмечалось в гл. II, является формальной предпосылкой неустойчивости, нарушающей макроскопическую однородность.

В качестве бифуркационного параметра в рассматриваемой задаче можно считать коэффициент f_0 , характеризующий степень активности аденилатциклазы. Как уже отмечалось, его значительное увеличение, зарегистрированное к четвертому часу интерфазы, коррелирует с кластеризацией клеток. Характеристическое уравнение (11) позволяет убедиться, что данный параметр действительно управляет стабильностью гомогенного состояния. По мере роста f_0 максимум на дисперсионной кривой $\lambda(k)$ растет, переходя в область положительных значений λ при

$$f_0 > (\sqrt{D_c \omega} + \sqrt{D_b q})^2 / (\mu b_0) = f_0^{\text{кр}}. \quad (13)$$

Точка $f_0^{\text{кр}}$ является критической точкой потери устойчивости однородного распределения b_0 , \bar{c} .

В области значений $k_{\text{кр}}$ складывается ситуация, аналогичная тьюринговой неустойчивости, а именно: выделенная гармоническая мода возмущения плотности с волновым числом $k_{\text{кр}}$ усиливается со временем, тогда как все остальные релаксируют.

Дальнейший вопрос состоит в том, какое состояние приходит на смену неустойчивому однородному. Благодаря возможности выделить ведущие степени свободы, этот вопрос можно проанализировать, воспользовавшись методом теории возмущений [184].

Принципиальная схема исследования стационарных состояний за порогом неустойчивости исходного гомогенного – такая же, как для системы "реакция – диффузия" (гл. II). Однако, в отличие от последней, в данном случае стабилизирующих нелинейных членов реакционного типа нет. Нелинейность в динамической модели (6), (7) вся заключена в члене, описывающем хемотаксис. Эта нелинейность квадратична и содержит пространственные производные.

Исследование нелинейной стационарной задачи

$$\begin{aligned} f_0 \bar{b} - q \bar{c} + D_c \bar{c}_{xx} &= 0, \\ -\omega(\bar{b} - b_0) + D_b \bar{b}_{xx} - \mu(\bar{b} \bar{c}_x)_x &= 0 \end{aligned} \quad (14)$$

удобно проводить, сведя ее к одному уравнению более высокого — четвертого — порядка. Последнее, как легко убедиться, можно записать следующим образом:

$$\hat{L} \bar{c} - \mu \left[\frac{1}{f_0} (\bar{c} q - D_c \bar{c}_{xx}) \bar{c}_x \right]_x = \hat{L} \bar{c} - \hat{N} \bar{c} = 0, \quad (15)$$

где линейный оператор \hat{L} имеет вид

$$\hat{L} \bar{c} = \omega \left(b_0 - \frac{q}{f_0} \bar{c} + \frac{D_c}{f_0} \bar{c}_{xx} \right) + D_b \frac{q}{f_0} (\bar{c}_{xx} - \bar{c}_x^2). \quad (16)$$

Теория возмущений пригодна для "мягко" зарождающихся неоднородных состояний $\bar{c}(x)$ вблизи порога зарождения. Малым параметром является отклонение от критического значения

$$\eta = f_0 - f_0^{kp} = f_0 - (\sqrt{q D_b} + \sqrt{D_c \omega})^2 / (\mu b_0) = \epsilon^2 \beta. \quad (17)$$

Далее решение уравнения (15) ищется в виде ряда по степеням ϵ :

$$\bar{c}(x) = f_0^{kp} b_0 / q + \epsilon c_1(x) + \epsilon^2 c_2(x) + \dots$$

После подстановки (18) в уравнение (15) находим решение в первом порядке по ϵ в виде критической моды с неопределенной амплитудой

$$c_1 = w \sin(k_{kp} x). \quad (18)$$

Далее во втором порядке по ϵ находим

$$c_2 = a_2 w^2 \cos(2k_{kp} x), \quad a_2 = \frac{\mu}{D_c \lambda(2k_{kp})} \left(\sqrt{\frac{\omega}{q} \frac{D_c}{D_b}} + \frac{\omega}{q} \frac{D_c}{D_b} \right). \quad (19)$$

Здесь $\lambda(2k_{kp})$ — собственное число оператора \hat{L} , которое в критической точке f_0^{kp} отрицательно. Выражение для c_2 получено как прямое следствие условия разрешимости*) линейного неоднородного уравнения

$$\hat{L} c_2 = \hat{N}(f_0^{kp}) c_1,$$

получающегося во втором порядке теории возмущений. Амплитуда w ведущей моды стационарного решения остается неопределенной в этом порядке теории возмущений. Уравнение для нее получается в третьем порядке, снова как условие разрешимости. Оно имеет вид [184]

$$\beta w + a_2 \left(2 \sqrt{\frac{\omega}{q} \frac{D_c}{D_b}} - 1 \right) w^3 = 0. \quad (20)$$

Решение уравнения (20) задает амплитуду главной гармоники в стационарном профиле распределения $\bar{c}(x)$. С ростом дистанции от порога

*) Как известно, это условие состоит в ортогональности решения однородного уравнения $\hat{L} c_1 = 0$ к свободному члену.

f_0^{KP} амплитуда w растет по "корневому" закону:

$$w = \pm \sqrt{\beta / [a_2 (2\sqrt{\omega D_c / q D_b} - 1)]}. \quad (21)$$

Вместе с тем профиль $\bar{c}(x)$ деформируется за счет увеличения относительно вклада второй гармоники. В отличие от w величина w^2 растет по линейному закону.

Мягкое ветвление неоднородных распределений $\bar{c}(x)$, $\bar{b}(x)$, для которого справедливо проведенное рассмотрение, имеет место при $2\sqrt{\omega D_c / (q D_b)} - 1 > 0$. Отдельный анализ устойчивости новых — уже неоднородных — состояний в этом случае не требуется. По известной теореме Лерея — Шаудера [185] состояния, рождающиеся в результате за критического мягкого ветвления при потере устойчивости некоторого исходного, всегда устойчивы.

Итак, в рассмотренной математической модели для ранней стадии коллективного развития *D. discoideum* контролируемой характеристикой макроскопического состояния поля клеток является распределение их плотности. На данном этапе развития эволюция макроскопического состояния обеспечивается следующими формами активности индивидуальных клеток: монотонная секреция аттрактанта и его диффузия во внеклеточном пространстве, хемотактическое и диффузионное перемещение клеток. Эти факторы учтены в модели.

Показано, что с повышением уровня секреции аттрактанта гомогенная популяция должна испытывать спонтанное расслоение, в результате которого клетки концентрируются в сгустки пространственно регулярным образом с определенным периодом.

Сопоставление с экспериментальными данными. Имеется возможность сопоставить некоторые качественные выводы и анализа модели с фактическими данными.

Согласно выражению (19) пространственный период скопления клеток должен задаваться волновым числом гармонической моды возмущений,

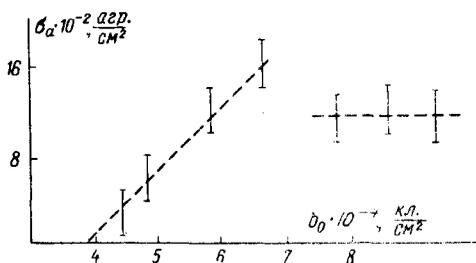


Рис. 20. Зависимость поверхностной плотности агрегатов σ_a от средней концентрации клеток *D. discoideum* [119]. Порог $7 \cdot 10^4$ кл./см² соответствует включению механизма волновой агрегации

нарушающих устойчивость гомогенного распределения. Отсюда можно оценить плотность скоплений на единицу поверхности. Она должна быть пропорциональна квадрату волнового числа k_{KP}^2 . Беря выражение для k_{KP} из (12), получаем

$$\sigma_a \sim f_0 \mu b_0 - (\omega D_c + q D_b).$$

Обращаем внимание на линейную зависимость плотности клеточных кластеров от исходной плотности клеток в однородной популяции.

Экспериментальные результаты [119] на этот счет приведены на рис. 20. Как видно, экспериментальная кривая имеет два участка, разделенных резким скачком. В области значений плотности клеток выше порога $7 \cdot 10^4$ кл./см² плотность агрегатов постоянна, т.е. площадь агрегационной территории одного центра аккумуляции клеток не зависит от плотности клеток. В этой области, как известно, агрегация управляется хемотактическими волнами. Их мы не касались в предыдущем анализе. Интересный для нас интервал плотности приходится на более низкие значения $b_0 < 7 \cdot 10^4$ кл./см², при которых волновой агрегации не наблюдается.

Здесь плотность агрегатов линейно растет с плотностью клеток. Этот результат означает, что с увеличением плотности клеток площадь агрегационной территории для одного кластера падает. Для нас этот результат не был очевиден заранее; анализ модели, как уже сказано, позволяет его объяснить.

З а м е ч а н и е. Как уже отмечалось, если плотность популяции голодающих амёб порядка 10^5 кл./см² и выше, агрегация не останавливается на ранней кластеризации (§ III.1). Напротив, сформировавшиеся на четвертом часу интерфазы сгустки клеток со временем диспергируют. Насколько нам известно, причина диссоциации кластеров не установлена.

Нам кажется естественной и вероятной причиной повышение активности внеклеточной фосфодиэстеразы, которое зарегистрировано перед началом волновой агрегации (см. § III.1). Данное повышение, с одной стороны, необходимо для возможности повторяющейся эстафетной передачи импульсов цАМФ при волновой агрегации, а с другой — стабилизирует однородное распределение клеток по отношению к мелкомасштабной агрегации. Последнее обстоятельство объясняется в рамках модели повышением порога неустойчивости f_0^{KP} с ростом параметра q , характеризующего степень активности фосфодиэстеразы.

§ III.4. Агрегация на фазе струеобразования

З а м е ч а н и е. В § III.1 мы отмечали, что ранней формой крупномасштабной организации агрегационного поля *Dictyostelium* являются хемотактические волны. Эта фаза интересна для теории возбудимых сред, поскольку агрегационное поле на ней представляет собой естественную модель такой среды (см. § III.2). Однако эффективность собственно агрегации клеток на этой стадии низка в силу двух обстоятельств.

1. Эффективным для собирания клеток в центре агрегационной территории является лишь передний фронт распространяющейся волны аттрактанта. На задний фронт клетки, по-видимому, вообще не реагируют [186], иначе симметричные импульсы цАМФ не вызывали бы направленных перемещений.

Но доля промежутка времени между последовательными импульсами, приходящаяся на прохождение переднего фронта, невелика и составляет не более 1/6, т.е. 1–1,5 мин [128]. При скорости направленного хемотактического движения 20 мкм/мин [128] понадобилось бы около 150 импульсов цАМФ, чтобы собрать клетки в центр с территории 1 см². При периоде повторной сигнализации 8 мин на это ушло бы около 20 часов, что на порядок превышает реальное время агрегации.

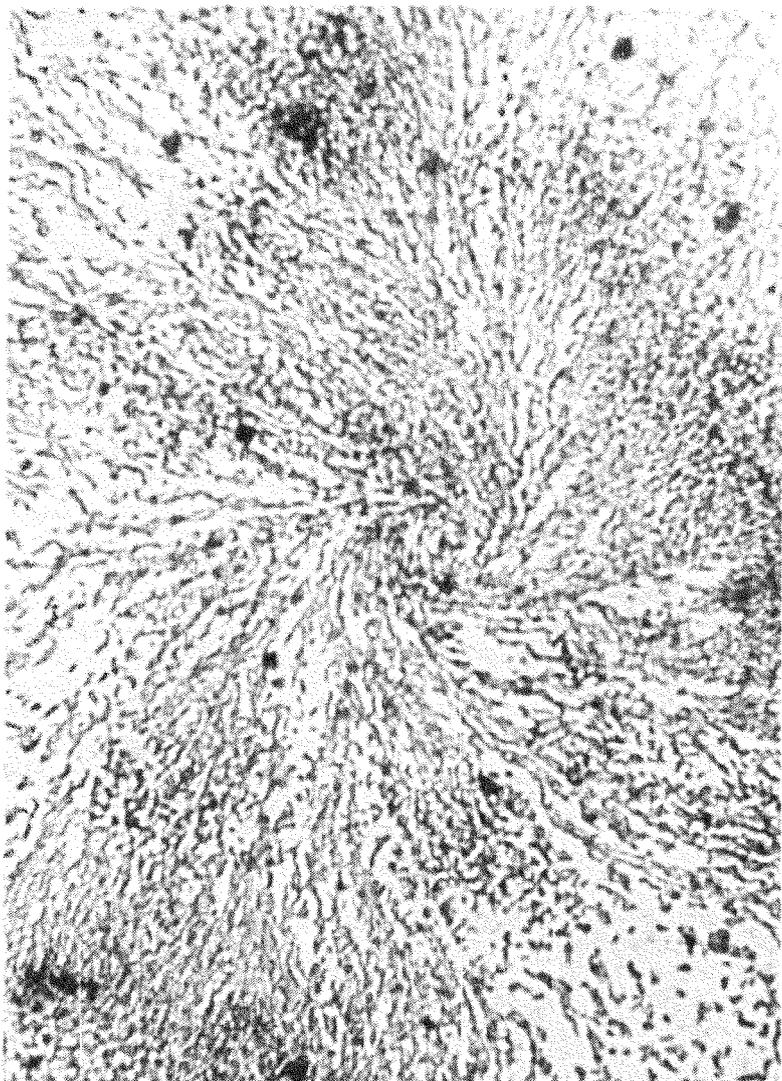


Рис. 21. Вид агрегационного поля *D. discoideum* на стадии струйных потоков до формирования плотных клеточных тяжей. В ядре агрегационной территории еще не сформировалась область, свободная от клеток. Фото О. Погатовой и С.И. Бейлиной (ИБФ АН СССР)

2. В промежуток времени между последовательными хемотактическими шагами (между двумя импульсами цАМФ) амебы сохраняют спонтанную двигательную активность. Она реализуется в диффузионном, ненаправленном блуждании клеток.

Характерная скорость диффузионного движения клеток сопоставима со скоростью направленного хемотактического движения и составляет около 10 мкм/мин [183]. С учетом того, что на промежуточный между хемотактическими шагами интервал приходится основная доля периода сигнализации, понятно, что фактор диффузии существенно "вредит" аккумуляции клеток.

Оба названных обстоятельства устраняются на стадии струйной агрегации благодаря новой компетенции агрегирующих клеток — их способности формировать стабильные межклеточные контакты. Свойства клеточной поверхности, необходимые для этого, являются продуктом предшествующего развития, а именно: импульсной, ритмической сигнализации [149]. Контакты клеток дают два эффекта: падение периода ритмических пульсаций цАМФ до двух минут [147] и устранение диффузионной подвижности при сохранении хемотактической.

В настоящем параграфе рассматривается вопрос о зарождении и геометрии центростремительных струйных потоков агрегирующих клеток.

На рис. 19 и 21 приведены фотографии агрегационного поля, полученные О. Потаповой и С. Бейлиной в Институте биофизики АН СССР. Мы фиксируем внимание а) на двух типах геометрии струй — лучевой, радиальной и спиральной (рис. 22), б) на эволюции структуры ядра (в случае спиральной геометрии) — от сплошного кругового пятна к баранке (ср. рис. 21 и 19).

Динамическая модель ядра агрегационной территории [187, 188]. Ядром мы называем область автономно, ритмически секретирующих цАМФ клеток в центре агрегационной территории (§ III.1). Остальная (подавляющая) часть клеток находится в ждущем режиме — эти клетки самопроизвольно цАМФ не секретируют, но способны к индуцированной секреции (§ III.1).

Нас будут интересовать динамические режимы автономной сигнализации ядра. Для определенности считаем его круглым пятном заданного радиуса R . Автономную сигнальную активность клеток ядра моделируем ре-

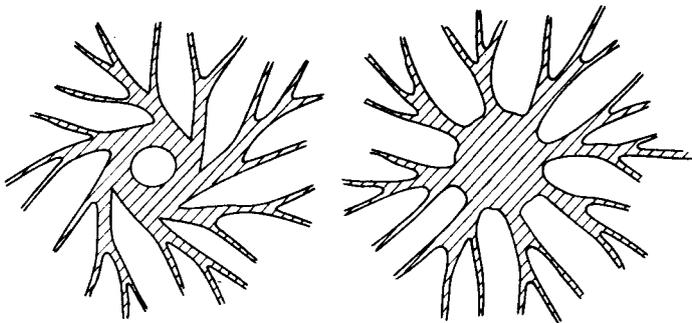


Рис. 22. Два типа геометрии картины струйной агрегации *D. discoideum*. Заштрихованы скопления клеток

жимом квазигармонических автоколебаний. В качестве источника этого режима подразумевается система динамических взаимоотношений двух компонент, C и H , обеспечивающих две петли обратной связи по схеме



Здесь автокаталитической компонентой C является цАМФ, а H — ингибитор активности аденилатциклазы (см. § III.1).

Мы проанализируем следующий, наиболее простой вариант реализации этой схемы [187]:

$$\begin{aligned} \frac{\partial c}{\partial t} &= \alpha c - \beta h - \gamma c^3 + D_c \nabla^2 c, \\ \frac{\partial h}{\partial t} &= \nu S c - \rho h. \end{aligned} \quad (22)$$

Здесь величины c и h имеют смысл отклонений C и H от их значений в стационарной точке (C_0, H_0) . Последняя соответствует режиму производства цАМФ до зарождения автономной ритмической секреции (состояние покоя, компетентное к индуцированному производству стандартной порции цАМФ, — § III.2).

Квазигармонические автоколебания в режиме автономной сигнальной активности зарождаются в результате бифуркации Хопфа, в окрестности которой мы и проводим дальнейшее рассмотрение. Для определенности бифуркационным параметром в модели (22) будем считать параметр S . В механизме регуляции синтеза цАМФ, связанном с катаболизмом внутренних резервов (см. § III.1), параметр S имеет смысл концентрации высокомолекулярного предшественника ингибитора.

Интересуясь далее автономными режимами сигнализации, примем в качестве граничных условий отсутствие потока цАМФ через границу круговой области:

$$J_c = -D_c \nabla_n C = 0. \quad (23)$$

В точечной системе, имитирующей одиночную клетку, при значении параметра S ниже порогового S_0 от стационарного состояния $(0, 0)$ в результате бифуркации Хопфа мягко ответвляется устойчивый предельный цикл, описывающий квазигармонические колебания. В круговой области малого размера R диффузия обеспечивает полное перемешивание, так что колебания должны быть пространственно синхронизированы. С ростом размера условие полного перемешивания нарушается; при этом следует ожидать определенной пространственной организации фазы колебаний. Следующий ниже анализ проясняет — какой именно организации.

Прежде чем иметь дело с полной моделью (22), исследуем поведение малых отклонений от стационарного состояния $(0, 0)$ в линейном приближении. Это исследование дает информацию о ведущих коллективных степенях свободы.

Пространственная зависимость коллективных мод определяется собственными функциями оператора Лапласа. В области с круговой границей ($r \leq R$) — это функции Бесселя $I_n(k_{nm}r)e^{in\varphi}$. Здесь k_{nm} — разрешенные значения волнового числа при заданных граничных условиях (23), m —

номер локального экстремума функции I_n . Зависимость от времени — экспоненциальная: $e^{\lambda(k_{nm})t}$.

Произвольное малое по амплитуде отклонение от стационарного состояния, удовлетворяющее кинетической системе (22) в линейном приближении, задается в виде суперпозиции нормальных мод:

$$\Psi_{nm} = e^{\lambda(k_{nm})t} I_n(k_{nm}r) e^{im\varphi}. \quad (24)$$

То, какие из набора мод Ψ_{nm} определяют поведение системы вблизи порога колебательной неустойчивости, диктуется видом дисперсионной зависимости $\lambda(k)$. Ее находим, как обычно, из характеристического уравнения после подстановки (24) в линеаризованную систему (22). Получится монотонная зависимость с максимумом при $k = 0$. При вариации параметра S кривая $\lambda(k)$ сдвигается как целое вдоль оси ординат, заходя в положительную область при

$$Q = \text{Sp } \hat{F} > 0; \quad \hat{F} = \begin{bmatrix} \alpha & -\beta \\ uS & -P \end{bmatrix}. \quad (25)$$

Данное неравенство, при дополнительном условии $\sigma = \text{Det } \hat{F} > 0$, достаточно для возбуждения синхронных колебаний c и h . Вопросом о стабилизации амплитуды этих колебаний мы займемся несколько позже.

При любом фиксированном закритическом значении бифуркационного параметра $Q > 0$ можно указать интервал значений волнового числа k , в котором инкремент положителен, $\lambda > 0$. Если в этот интервал попадают какие-либо из нетривиальных собственных значений волнового числа, то можно ожидать возбуждения соответствующих неоднородных колебательных мод.

При малых значениях размера R таких дополнительных мод нет. Однако с увеличением R величины k_{nm} убывают как $1/R$, заходя в интервал неустойчивости $k < k_0$ в следующем порядке: k_{00} , k_{11} , k_{02} , k_{12} . Соответственно моды Ψ_{00} , Ψ_{11} , Ψ_{02} , Ψ_{12} последовательно приобретают положительный инкремент.

Другой способ возбуждения той же последовательности состоит в уменьшении бифуркационного параметра S . При этом порог k_0 сдвигается в область больших k .

Нелинейный анализ. Стабилизация амплитуды колебаний. По мере роста числа нерелаксирующих мод анализ уравнений движения (22) сильно усложняется. Поэтому мы ограничимся рассмотрением малой окрестности порога (25), так что возбужденными оказываются лишь две, возбудившиеся первыми моды Ψ_{00} и Ψ_{11} . Уже в этом приближении получаются множественные стабильные режимы сигнализации [187, 188].

Анализ нелинейной задачи упрощается, если перейти от системы уравнений (22) к эквивалентному уравнению второго порядка по t . Его легко получить, дифференцируя первое уравнение в (22) и подставляя h_t из второго уравнения:

$$c_{tt} - Qc_t + 3\gamma c_t c^2 - D_c \nabla^2 c_t + \sigma c + \gamma r c^3 - D_c r \nabla^2 c = 0. \quad (26)$$

Полная, действительная комбинация комплексных мод Ψ_{00} , Ψ_{11} содержит шесть независимых слагаемых:

$$c(r, \varphi, t) = U(t) \sin \Omega t + V(t) \cos \Omega t + X^{(1)}(t) I_1 \cos \Omega t \cos \varphi + \\ + X^{(2)}(t) I_1 \cos \Omega t \sin \varphi + X^{(3)}(t) I_1 \sin \Omega t \sin \varphi + \\ + X^{(4)}(t) I_1 \sin \Omega t \cos \varphi. \quad (27)$$

Шесть независимых амплитуд в этом выражении U , V , $X^{(1)}$, $X^{(2)}$, $X^{(3)}$, $X^{(4)}$ должны быть найдены после подстановки его в уравнение (26). Попутно следует учесть следующие соображения.

1. Предполагаемая близость к порогу колебательной неустойчивости обеспечивает медленность временной эволюции амплитуд U , V , $X^{(i)}$ по сравнению с осциллирующей частью $\sin \Omega t$. По этой причине можно отбросить члены, содержащие вторые производные по времени U_{tt}, \dots .

2. После подстановки выражения (27) в нелинейное уравнение (26) и разложения результата на простые гармоники возникают слагаемые с высшими гармониками типа $\sin n\varphi$, $\cos n\varphi$. Их мы должны отбросить, поскольку наша исходная комбинация (27) их не содержала. Необходимые разъяснения к подобной процедуре были даны в § II.3.

3. Для получения системы уравнений относительно амплитуд U , V , $X^{(i)}$ после подстановки (27) в (26) и разложения на простые гармоники следует воспользоваться свойствами ортогональности

$$\int_0^{2\pi} d\varphi \chi_i \chi_k = 0; \quad i, k = 0, 1, 2, \quad \chi_0 = 1, \quad \chi_1 = I_1 \sin \varphi, \quad \chi_2 = I_1 \cos \varphi.$$

Это дает возможность приравнять независимо члены, содержащие χ_0 , χ_1 , χ_2 . Кроме того, после процедуры усреднения по времени [20], можно приравнять отдельно члены, содержащие $\sin \Omega t$ и $\cos \Omega t$.

В результате получается система из шести обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка по времени относительно амплитуд $U(t)$, $V(t)$, $X^{(i)}(t)$. Каждое из них содержит по несколько десятков слагаемых, поэтому приводить эту систему здесь целиком не имеет смысла. Получить ее полностью удалось на ЭВМ при помощи программы "Полинал", разработанной А.Б. Константиновым в Институте теоретической физики им. Л.Д. Ландау. "Полинал" преобразует в аналитическом виде выражения, содержащие степени тригонометрических функций, разлагая их на простые гармоники.

Сообщим результат исследования этой системы [187]. Благодаря высокой симметричности системы довольно легко удается отыскать стационарные значения амплитуд. Приведем их:

$$U = V = (2Q/3\gamma)^{1/2}, \quad X^{(i)} = 0; \quad i = 1, \dots, 4. \quad (28)$$

Это нетривиальное решение первым отвечает от исходного тривиального U , V , $X^{(i)} = 0$ по мере уменьшения параметра S . При положительных значениях γ бифуркация закритическая, поэтому данное решение устойчиво. Из выражения (28) ясно, что данное решение соответствует гомогенным колебаниям в области $r \ll R$:

$$c = (2Q/3\gamma)^{1/2} \cos [\Omega(t + t_0)]; \quad \Omega^2 = \sigma + Q\rho.$$

Далее

$$\bar{X}_{(1)} = \frac{2}{\sqrt{3}} \left(\frac{\mu}{\gamma} \frac{\delta_1}{\delta_2} \right)^{1/2}, \quad \bar{X}_{(2)} = \frac{4}{3} \left(\frac{\mu}{\gamma} \frac{\delta_1}{\delta_2} \right)^{1/2},$$

$$\mu = Q - Q_1^c; \quad (29)$$

$$\delta_i = \int_0^R I_1^{2i} \frac{dr}{R}.$$

Эта пара стационарных решений отвечает одновременно также от тривиального решения, но в области бифуркационного параметра, где исходное состояние уже неустойчиво при $Q > Q_1^c = D_c k_{11}^2$. Соответствующие ненулевые стационарные амплитуды $X^{(1)}$ и $X^{(2)}$ задают бегущую

$$c(r, \varphi, t) = X^{(1)} I_1(k_{11} r) \cos(\Omega t + \varphi) \quad (30)$$

и стоячую

$$c(r, \varphi, t) = X^{(2)} I_1(k_{11} r) \cos \Omega t \cos \varphi \quad (31)$$

волны.

Здесь соображения, позволившие установить устойчивость синхронных автоколебаний, уже неприменимы. Этот вопрос должен рассматриваться специально.

Анализ устойчивости [187]. Для стоячей волны после подстановки вместо амплитуд $U, V, X^{(i)}$, $i = 1, \dots, 4$, их отклонений от решения (31) $u, v, x^{(i)}$ и линеаризации по этим отклонениям получим три независимых подсистемы относительно u и v ; $x^{(1)}$ и $x^{(2)}$; $x^{(3)}$ и $x^{(4)}$. Выпишем последнюю:

$$\begin{aligned} \mu(\Omega x^{(2)} - \omega x^{(3)} - x_t^{(3)}) - 2\Omega x_t^{(2)} + a(\omega x^{(3)} - x_t^{(3)} - 3\Omega x^{(2)}) &= 0, \\ -\mu(\omega x^{(2)} + \Omega x^{(3)} + x_t^{(2)}) + 2\Omega x_t^{(3)} + a(3x_t^{(2)} + \Omega x^{(3)} + 3\omega x^{(2)}) &= 0, \end{aligned} \quad (32)$$

где

$$a = \frac{3}{16} [X^{(2)}]^2 \gamma \frac{\delta_1}{\delta_2}.$$

Ее, как мы сейчас убедимся, оказывается достаточно для того, чтобы сделать вывод о характере устойчивости стоячей волны.

Разыскивая решение (32) в виде $x^{(2,3)} = x_0^{(2,3)} e^{\lambda t}$, приходим к следующему уравнению относительно инкремента:

$$\lambda(\lambda - \mu/3) = 0.$$

Отсюда получаем $\lambda_1 = 0$, $\lambda_2 = \mu/3$ при $\mu > 0$ ($p > p_1^c$). Это означает, что стоячая волна всюду неустойчива.

Если проделать то же самое для малых отклонений от решения (30), то получим две независимые подсистемы: одну из двух уравнений — относительно u и v , а другую — из четырех — относительно $x^{(i)}$. Уравнения последней оказываются линейно зависимыми. Это означает, что $\lambda = 0$ является одним из корней полного характеристического уравнения, т.е. существуют незволюционирующие отклонения от интересующего нас решения. Этот

факт был очевиден заранее; он означает инвариантность исходных уравнений движения относительно сдвига отсчета угловой переменной φ .

Для оставшейся линейно-независимой подсистемы характеристическое уравнение будет:

$$4(\mu^2 + 4\Omega^2)\lambda^3 + \mu(10\mu\omega + 3\mu^2 + 32\Omega^2)\lambda^2 + 3\mu^2(\omega^2 + \frac{9}{2}\mu\omega + 7\Omega^2)\lambda + \frac{9}{2}\mu^3\omega^2 = 0.$$

Из него нетрудно убедиться, что $\text{Re } \lambda < 0$ при $\mu > 0$. Следовательно, бегущая волна устойчива к возмущениям амплитуд $x^{(i)}$.

Остается выяснить ее устойчивость по отношению к пространственно-гомогенным возмущениям типа $u \sin \Omega t + v \cos \Omega t$. Система уравнений для амплитуд u и v имеет вид

$$0 = p\omega v + p\Omega u + 2\Omega u_t - p v_t + b(\omega v - \Omega u + v_t - \frac{1}{2}u_t),$$

$$0 = p\omega u + p\Omega v - 2\Omega v_t - p u_t + b(\omega u - \Omega v + u_t - \frac{1}{2}v_t),$$

где

$$b = \frac{3}{2} [X^{(1)}]^2 \gamma \delta_1.$$

Отсюда для инкремента λ получим

$$0 = (N^2 + 4\Omega^2)\lambda^2 + 2N(\omega N + \Omega^2)\lambda + \omega^2 N^2 + 4\Omega^2 N^2,$$

$$N = 2 \left(\frac{\delta_1}{\delta_2} \right)^2 \left(p \frac{p_1^c}{p_2^c} - p_1^c \right); \quad p_2^c = p_1^c \frac{2\delta_1^2}{2\delta_1^2 - \delta_2} > p_1^c.$$

Легко видеть, что при $N > 0$ ($p > p_2^c$) действительная часть обоих характеристических чисел становится отрицательной. Следовательно, при $p > p_2^c$ режим бегущей круговой волны в результате вторичной бифуркации становится асимптотически устойчивым. Попасть в этот режим система может лишь из состояния синхронных колебаний в результате жесткого возбуждения.

Итак, в ядре агрегационной территории могут устанавливаться два альтернативных автоколебательных режима: режим синхронной и синфазной секреции цАМФ и режим вихревой автоволны, в котором фаза ритмической секреции одинакова вдоль радиального луча, вращающегося с заданной частотой вокруг центра.

Далее, нетрудно представить себе характер сигнальной активности в масштабах всего агрегационного поля. Напомним, что основная масса клеток поля обладает свойствами возбудимых сред. Если в такую среду помещен периодический источник импульсов цАМФ, он вызывает периодическое распространение волн импульсной секреции цАМФ. При этом, если источником является целая область пространства — ядро агрегационной территории, пространственный режим сигнализации в ней может управлять геометрией волновых фронтов вне нее.

Синхронное испускание импульсов ядром, очевидно, порождает расходящиеся концентрические круговые волны. Альтернативный вихревой режим испускания внешняя возбудимая среда воспринимает как круговую петлю "пейсмекера". Хорошо известно, что такая петля генерирует распространение спиральных волновых фронтов, представляющих собой эволюенту генерирующей петли [177].

Струеобразовании. Распространение волн химической сигнализации и хемотактические перемещения навстречу этим волнам определяют главное, что происходит на стадии волновой агрегации — соби́рание клеток в центры, генерирующие волны цАМФ с относительно больших территорий. Однако наблюдаемая картина агрегационного поля на продвинутой стадии агрегации имеет особенность, которая не может быть объяснена лишь перемещениями клеток к центрам эмиссии аттрактанта. Как видно из фотографий на рис. 19, клетки в ходе центростремительного движения объединяются в скопления в виде системы ветвящихся тяжей и по ним, как по руслам, стекаются в центры. Такая картина, очевидно, свидетельствует о том, что в ходе агрегации имеют место коллективные движения клеток как по нормали к волновым фронтам сигнализации, так и по касательной к ним. Но эти последние движения не могут быть связаны с эстафетной передачей хемотактического сигнала, поскольку клетки вдоль касательной к фронту волны цАМФ находятся в одинаковой фазе цикла возбуждения. Поэтому в качестве механизма тангенциальной ассоциации амёб остается механизм диффузионно-хемотактической неустойчивости — тот самый, который вызвал малкомасштабную кластеризацию клеток на доволновой фазе агрегации (см. § III.3).

Характерный пространственный масштаб при расслоении клеточного поля по данному механизму приблизительно оценивается диффузионной длиной аттрактанта $r_c \sim 100$ мкм. Таков же, как видно из рис. 19, характерный масштаб неоднородности в картине ветвящихся струй. Последним обстоятельством подкрепляется предполагаемое качественное объяснение наблюдаемой картины струйной агрегации.

Более прямые аргументы должно дать исследование соответствующей математической модели.

В динамическом представлении две формы активности клеток агрегационного поля — рэлейная и хемотактическая — объединяются системой уравнений:

$$\partial_t c = bf(c, h) - qc + D_c \nabla^2 c. \quad (32a)$$

$$\partial_t h = b(Sc - mh), \quad (32б)$$

$$\partial_t b = -\nabla(\mu b \nabla c) + D_b \nabla^2 b. \quad (32в)$$

Здесь, как и выше в данной главе, c — концентрация аттрактанта, h — ингибитора его синтеза, b — клеток (все величины относятся к единице поверхности); S — управляющий параметр (см. § III.2).

Нелинейной функции автокаталитического воспроизводства $f(c, h)$ приписывается S-образная форма (рис. 17), благодаря которой нуль-изоклины на фазовой плоскости $\{c, h\}$ имеют вид, типичный для возбудимых сред (§ III.2, рис. 18). Конкретный вид функции и значения параметров, используемые при численном исследовании модели, приведены в подписи к рис. 23. Укажем лишь, что параметры подбирались такими, чтобы ситуация на фазовой плоскости соответствовала именно рэлейной активности клеток (рис. 18б).

Уравнения (32) в сеточной аппроксимации решались на ЭВМ по явной схеме. Задача ставилась в пределах прямоугольной области. На одной из ее линейных границ задавалось периодическое возмущение $c(t)$ с амплиту-

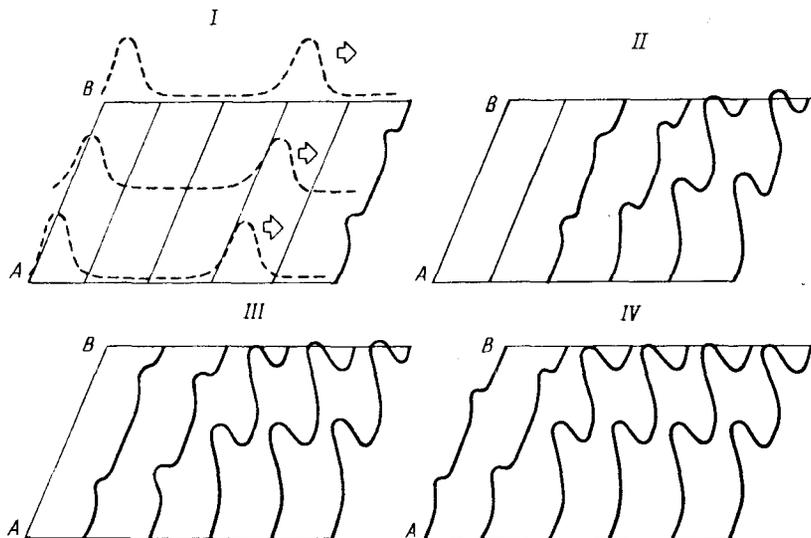


Рис. 23. Эволюция распределения клеточной плотности $b(r, t)$ в поле рэлейно и хемотактически активных клеток *D. discoideum*. Численное решение системы (32) с использованием в качестве $f(c, h)$ функции $0,15 + e^{-h^2} (3c)^2 / (e^{-h^2} + (3c)^2)$. Значения параметров в безразмерных единицах: $q = 0,2$; $D_c = 10^{-2}$; $S = 10^{-2}$; $m = 2 \cdot 10^{-2}$; $\mu = 1$; I–IV – картина в последовательные моменты времени. На границе AB задан автономный ритмический источник

дой, превышающей порог возбуждения отклика в системе (32a), (32б). Это возмущение, как и положено, становилось источником плоских автоволн химической сигнализации.

Далее, в определенный момент времени задавались тангенциальные (по отношению к волновым фронтам химической сигнализации) возмущения клеточной плотности в виде одного или двух локальных повышений величины b . Возмущения, оставаясь локальными в тангенциальном направлении, росли по амплитуде и растягивались в направлении, нормальном к направлению волновых фронтов (см. рис. 23). Таким образом формировались струйные потоки клеток, ориентированные в направлении к источнику волн аттрактанта. Если интервал между двумя локальными возмущениями клеточной плотности был мал (заметно уступал величине r_c , соответствующей диффузионному радиусу аттрактанта), то такие возмущения, сливаясь, формировали одну струю. Если же этот интервал в начальный момент превосходил величину r_c , то каждое из локальных возмущений порождало отдельную струю.

Итак, все основные особенности макроскопической структуры агрегационного поля *D. discoideum* укладываются в исследованную модель коллективных режимов химической сигнализации и хемотаксиса.

Два типа геометрии центростремительных потоков агрегирующих клеток – лучевая радиальная и спиральная – соответствуют двум описанным режимам автономной ритмической секреции цАМФ в центрах агрегационных территорий – синхронному и вихревому. Неожиданное, на первый

взгляд, событие в ядре спирального поля — опустошение его центральной части вследствие *центробежных* перемещений внутренних клеток — имеет естественное объяснение, прямо вытекающее из полученных результатов. Амплитуда вихревой волны в ядре, согласно (30), монотонно возрастает от центра к периферии. Поэтому вектор градиента концентрации аттрактанта имеет помимо нормальной фронту еще и радиальную составляющую, направленную от центра. Последняя и задает центробежную составляющую миграции клеток.

§ III.5. Дивергенция клеточных типов в слизи

Общая задача данного параграфа — попытаться вывести описанные в обзорной части черты морфогенетического поля в псевдоплазмодии из данных о факторах, контролирующих клеточную дифференцировку, и формах активности дифференцирующихся клеток.

Описание модели [189]. Для формального представления способности к выбору программы развития ПСТ/ПСП клетками агрегата мы берем за основу динамическую модель компетенции (II.2). Новая черта, которой не было в модели (II.2) и которая должна быть учтена здесь, — эффект клеточных перемещений. Учесть этот эффект, несколько огрубляя его, можно следующим образом.

Пусть Δa — перепад значений контрольного параметра a в двух альтернативных типах детерминации. Данный параметр в дальнейшем рассмотрении является основной динамической переменной. Такой прирост в локальном значении этого параметра возникает при замене в элементе объема агрегата одной преспоровой клетки на одну престеблевою. С учетом этого вклада в динамику параметра a уравнение для него примет вид

$$\tau_a \partial a / \partial t = f(a) - Q - \tau_a \Delta a \partial J_b / \partial x. \quad (33)$$

Здесь J_b — локальный поток ПСТ-клеток, функция $f(a)$ имеет прежний И-образный вид, а параметр Q — прежний смысл управления выбором ПСТ/ПСП. Особая точка на правой ниспадающей ветви функции $f(a) - Q$ ассоциируется с ПСТ-, на левой — с ПСП-детерминацией.

цАМФ не принимает участия в контроле детерминации, но обеспечивает компетенцию к дифференцировке (см. § III.1).

Участие ДИФ и NH_3 . Контроль выбора направления детерминации, осуществляемый двумя морфогенами — ДИФ и NH_3 , учитывается в положительном и отрицательном вкладах концентраций этих агентов d и n в значение управляющего параметра Q :

$$Q = \alpha n - \beta d. \quad (34)$$

ДИФ производится и выделяется во внеклеточную среду ПСТ-клетками (§ III.1). Судя по тому, что эффективность индукции престеблевой детерминации в клеточной культуре резко падает с уменьшением концентрации клеток [156], радиус диффузионного распространения ДИФ мал. Малый радиус может быть связан либо с малой диффузионной подвижностью, либо с быстрой инактивацией.

Производство, диффузия и инактивация ДИФ могут быть описаны уравнением

$$\tau_a d_t = \kappa_a a - d + R_d^2 d_{xx}. \quad (35)$$

Здесь d — концентрация ДИФ на единицу объема агрегата. Член производства принят прямо пропорциональным значению контрольного параметра детерминации a , поскольку большие значения последнего, как принято выше, ассоциируются с ПСТ-детерминацией. Пространственный масштаб, связанный с распространением ДИФ, далее будет считаться самым малым характерным размером в задаче. Характерное время динамики ДИФ τ_d принимается малым по сравнению с временем эволюции параметра a . Последний параметр, как уже отмечалось, является самым медленным в процессе дивергенции клеточных типов.

В силу сказанного в масштабе времени τ_a (порядка часа) для уравнения (35) можно использовать квазистационарное приближение $d_t = 0$. Это дает выражение для распределения $\bar{d}(x, t)$ следующего вида:

$$\bar{d}(x, t) = \frac{\kappa_d}{2R_d} \int e^{-|x-x'|/R_d} a(x', t) dx'. \quad (36)$$

В интеграле выражения (36) можно воспользоваться разложением функции $a(x', t)$ в ряд Тейлора вблизи точки x , оставив в нем лишь низшие степени $(x - x')$:

$$a(x') = a(x) + a_x(x - x') + \frac{a_{xx}}{2} (x - x')^2.$$

Более высокие порядки $(x - x')$ существенны с увеличением расстояния $(x - x')$, но они подавляются быстроспадающей экспонентой $\varphi = e^{-|x-x'|/R_d}$. При интегрировании с симметричной функцией $\varphi(|x - x'|)$ линейный по $(x - x')$ член дает нуль. Таким образом, получаем вместо (36)

$$\bar{d}(x, t) = \kappa_d a(x, t) + 2\kappa_d R_d^2 a_{xx}. \quad (37)$$

Исходное кинетическое уравнение для NH_3 в предлагаемой модели выглядит совершенно подобно (35):

$$\tau_n n_t = \kappa_n a - n + R_n^2 n_{xx}. \quad (38)$$

Здесь также можно использовать квазистационарное приближение $n_t = 0$. Однако, поскольку NH_3 — малая и, следовательно, подвижная молекула, диффузионный радиус для нее должен быть сравнительно велик. Мы будем считать, что этот радиус превышает линейные размеры агрегата. Это предположение, как будет показано, необходимо для поддержания инвариантным отношения $[\text{ПСТ}]/[\text{ПСР}]$ при изменении полного количества клеток в агрегате.

При $R_n > L$ квазистационарное распределение \bar{n} однородно, а значение n определяется средним по агрегату значением параметра a :

$$\bar{n} = \kappa_n \langle a \rangle. \quad (39)$$

Далее, подставляя полученные выражения для \bar{d} и \bar{n} в (34) и затем в (33), приходим к уравнению движения параметра a :

$$\tau_a \frac{\partial a}{\partial t} = \tilde{f}(a) - \beta \kappa_n \langle a \rangle + R_a^2 \frac{\partial^2 a}{\partial x^2} - \tau_a \frac{\partial J_b}{\partial x}, \quad (40)$$

где принято

$$\tilde{f}(a) = f(a) + \alpha \kappa_a a, \quad R_a^2 = 2\alpha \kappa_a R_a^2, \quad \Delta a = 1.$$

Задача пока незамкнута, поскольку не определено последнее слагаемое. Полная система уравнений должна включать эволюцию распределения дифференцирующихся клеток. Последняя определяется двумя факторами: дифференцировкой клеток и их пространственным перераспределением.

Пусть $b(x, t)$ — локальная концентрация ПСТ-клеток. Локальный прирост этой величины обусловлен ПСТ-детерминацией амeboидных клеток и ПСП-транседегерминацией при превышении локальным значением параметра a его порогового уровня a_0 , диффузионным и хемотактическим потоками. Обратное переключение ПСТ в ПСП происходит при значении a ниже того же порога a_0 и дает отрицательный вклад в динамику $b(x, t)$.

В смысле секреции цАМФ (аттрактанта) и таксиса ПСТ-клетки более активны, чем ПСП (§ III.1). Огрубляя, мы будем рассматривать последние как пассивную сплошную среду, в которой происходит все, что названо в предыдущем абзаце. В этой же среде производится, диффундирует и инактивируется цАМФ.

Кинетическое уравнение для концентрации ПСТ-клеток с учетом сказанного выше имеет вид

$$\tau_b b_t = -\nu(bc_x)_x + R_b^2 b_{xx} + \theta(a - a_0)(b_0 - b) - \theta(a_0 - a)b. \quad (41)$$

Здесь ν — приведенный коэффициент хемотактической подвижности $\nu = \mu\tau_b$, $R_b^2 = \tau_b D_b$.

Динамика распределения аттрактанта $c(x, t)$ описывается уравнением прежнего вида — (III.7), учитывающим производство ПСТ-клетками, линейную деградацию и диффузию:

$$\tau_a c_t = f_1 b - c + R_c^2 c_{xx}. \quad (42)$$

Количественные оценки содержащихся здесь параметров остаются по порядку величины теми же, что использовались ранее при рассмотрении доволновы кластеризации амeб (§ III.3).

В уравнении (41) в качестве порогового уровня для контрольного параметра детерминации a_0 можно принять особую точку на растущем участке функции $f(a) - \beta \kappa_a a$; b_0 в этом уравнении задает предельную концентрацию клеток, так что область допустимых значений для b покрывает интервал от нуля до b_0 .

Уравнения (40)–(42) образуют замкнутую систему, формально описывающую основные черты индивидуального поведения клеток агрегата — дивергенцию на два специализированных типа, две компоненты движения — диффузионную и хемотактическую, производство аттрактанта. Полный анализ решения этой системы проводить не будет. Нашей целью, как уже отмечалось, является понимание и описание тех черт группового поведения клеток, которые сообщают массе клеток агрегата типичные свойства морфогенетического поля. Наряду с такими типичными свойствами, дифференциация клеток в агрегате и их упорядочение в пространстве имеют особенности, не свойственные другим морфогенетическим полям. В частности, по-видимому, специфичен для *D. discoideum*, во всяком

случае пока не описан для других систем *тот путь* развития, которым формируется макроскопическая структура поля псевдоплазмодия. Ключевые этапы на этом пути: однородная дифференциация клеток, сортировка в пространстве, морфологическая поляризация (подробнее см. в § III.1). Особенностью здесь является отсутствие в механизме пространственного упорядочения клеточных дифференцировок роли для позиционной информации.

Опираясь на сформулированную модель, мы попытаемся прояснить, каким образом позиционная дифференциация клеток осуществляется помимо позиционной информации.

Анализ поведения на основании модели.

а) Масштабы времен. Из опытов по регенерации псевдоплазмодия из его изолированных фрагментов [165] мы получаем оценку масштаба времени детерминации — 1–2 часа. Эта оценка определяет порядок величины характерного времени τ_a эволюции параметра a .

Кинетика распределения аттрактанта существенно более быстрая ($\tau_c \lesssim \lesssim 1$ мин, § III.1). Миграции клеток, учитываемые уравнением (41), также следует отнести к более быстрой временной шкале, чем шкала клеточной детерминации. Скорость хемотактического перемещения оценивается в 20–30 мкм/мин. При такой скорости типичный размер агрегата — 300 мкм — покрывается за 10–15 мин.

б) Пространственные масштабы. Можно выделить два характерных масштаба когерентности в системе (40)–(42). Это масштаб когерентности, связанный с перемещением клеток и определяемый радиусом диффузии аттрактанта (~ 100 мкм), и масштаб когерентности клеточной детерминации R_a в уравнении (40). Мы не имеем количественной оценки последнего из эксперимента, но можем предполагать, что эта величина порядка клеточных размеров, т.е. 10 мкм*).

При дальнейшем анализе поведения в модели (40)–(42) мы будем пользоваться названными выше отношениями иерархии времен

$$\tau_c \ll \tau_a$$

и пространственных масштабов

$$R_c \gg R_a.$$

в) Макроскопически однородная дифференциация. К макроскопическим масштабам мы относим масштаб, определяемый радиусом диффузии аттрактанта $R_c \gtrsim 100$ мкм, к микроскопическим — масштаб когерентности детерминации клеток $R_a \lesssim 10$ мкм.

Условие макроскопической однородности формулируется в виде

$$\tau_b J_b = v b c_x - R_b^2 b_x = 0. \quad (43)$$

Уравнение для параметра детерминации a при условии (43) становится не-

*) Уже цитировались работы, в которых продемонстрировано диффузное распределение одиночных престолевых клеток в раннем агрегате Dd , а также на начальных этапах регенерации псевдоплазмодия из фрагмента [159, 165]. Обнаруживаемая в этих опытах низкая кооперативность детерминации и дает основание для предположения относительно соответствующего масштаба когерентности.

зависимым от распределения клеток $b(x, t)$ и имеет вид

$$\tau_a a_t = f(a) - \beta \kappa_n \langle a \rangle + R_a^2 a_{xx}. \quad (44)$$

Заметим, что условие макроскопической однородности (43) оставляет возможность микрогетерогенных распределений $a(x, t)$, т.е. таких, для которых существенные изменения параметра a имеют место в интервалах $\Delta x \ll R_c$. По этой причине в уравнении (44) сохранен член $R_a^2 a_{xx}$.

С другой стороны, интересуясь макроскопически сглаженными распределениями $b(x, t)$, мы должны заменить члены локального "производства" и "гибели" в (41) на усредненные величины с масштабом усреднения $\Delta x \sim R_c \gg R_a$. При этом уравнение для концентрации клеток $b(x, t)$ переписывается в виде

$$\tau_b b_t = -v(bc_x)_x + R_b^2 b_{xx} + (\tilde{b} - b), \quad (41')$$

где

$$\tilde{b} = \frac{b_0}{\Delta x} \int_{\Delta x} \theta(a - a_0) dx.$$

Для мультидоменных распределений $a(x)$ с двумя фиксированными уровнями плато: $a_1 = 0$ и $a_2 = 1$ (см. ниже), величина \tilde{b} будет:

$$\tilde{b} = b_0 \tilde{a}, \quad \text{где} \quad \tilde{a} = \frac{1}{\Delta x} \int_{\Delta x} a(x, t) dx. \quad (45)$$

При условии макроскопической однородности

$$\tilde{a} \equiv \text{const} = \frac{1}{L} \int_0^L a(x, t) dx = \langle a \rangle.$$

Отсюда легко видеть, что концентрация престолевых клеток асимптотически выходит на уровень, определяемый средним по всему агрегату значением контрольного параметра детерминации a :

$$\bar{b} = \langle a \rangle. \quad (46)$$

(Здесь и ниже значение b_0 принимается равным единице.) Заметим, что данный асимптотический уровень средней концентрации ПСТ-клеток определяется независимо от условия макроскопической однородности (43). Для этого достаточно потребовать лишь отсутствия потока ПСТ-клеток через границу агрегата Ω :

$$J_b|_{\Omega} = 0,$$

и проинтегрировать с ним уравнение (41').

Далее необходимо исследовать два вопроса: а) условие поддержания макроскопической однородности и б) эволюцию распределения параметра a в ее рамках.

Устойчивость макроскопически однородной дифференциальной системы. Имея в виду иерархию характерных времен для уравнения (40) системы (41'), (42), вопрос об устойчивости можно рассматривать отдельно: в рамках уравнений движения (41'), (42) — по отношению к макроскопически неоднородным возмущениям δb , δc при неизменных

характеристиках распределения $a(x)$; и в уравнении (40) (при устойчивости в предыдущем случае) — по отношению к отклонению δa .

а) Линейный анализ устойчивости в системе (41'), (42). Линеаризованные уравнения для малых отклонений δb , δc получаются путем линеаризации системы (41'), (42). В масштабе времени $t \sim \tau_c$, т.е. при постоянном, макроскопически однородном распределении a это дает:

$$\begin{aligned} \tau_b \delta b_t &= -\nu \bar{b} \delta c_{xx} + R_b^2 \delta b_{xx} - \delta b, \\ \tau_c \delta c_t &= f_1 \delta b - \delta c + R_c^2 \delta c_{xx}. \end{aligned} \quad (47)$$

Здесь δb и δc представляют собой уже усредненные отклонения. Очевидно полное подобие уравнений (47) приводившимся ранее при анализе вопроса о мелкомасштабной кластеризации амёб интерфейсы (§ III.3, система (III.9)). Нет необходимости повторять исследование поведения решений этих уравнений (см. § III.3). Достаточно будет лишь сформулировать результат в более подходящей для данной постановки задачи форме.

Критическим параметром здесь более уместно считать не активность секреции аттрактанта, а среднюю по объему агрегата концентрацию \bar{b} ПСТ-клеток. Данный параметр, как видно из (46), определяется текущим состоянием в более медленно эволюционирующей подсистеме детерминации клеток ($\langle a \rangle$), описываемой уравнением (40). Пока величина \bar{b} мала, макроскопически однородное распределение $b \equiv \bar{b}$ оказывается асимптотически устойчивым. Это означает, что при малом общем количестве ПСТ-клеток они должны быть однородно диспергированы по объему агрегата.

С ростом \bar{b} гомогенное распределение $b \equiv \bar{b}$ теряет асимптотическую устойчивость. При этом взаимное хемотактическое притяжение клеток начинает доминировать над рассредотачивающим эффектом их диффузии и приводит к спонтанному нарушению макроскопической однородности. Анализ нелинейной фазы развития неустойчивости также проводился в § III.3. Показано, что в результате названной неустойчивости могут формироваться многоцентровые скопления хемотактически активных клеток (престеблевых в данном случае). Их пространственный период близок к диффузионному радиусу аттрактанта (~ 100 мкм). При типичных размерах агрегата на стадии ранней дифференциации клеток в несколько сотен микрон это означает возможность формирования нескольких скоплений престеблевых клеток. В следующем параграфе мы ставим и анализируем вопрос о дальнейшей судьбе этих скоплений.

Итак, пока мало среднее значение $\langle a \rangle$, должно поддерживаться однородное распределение дифференцирующихся клеток. Выясним, как при этом меняется само $\langle a \rangle$. Ответ может быть получен из уравнения (44).

б) Эволюция распределения параметра детерминации $a(x, t)$ [189]. Уравнение (44) имеет два гомогенных стационарных решения $\bar{a} \equiv 0$ и $\bar{a} \equiv 1$, значения параметра a в которых соответствуют устойчивым стационарным состояниям "точечной" динамики. Раньше эти значения были соотнесены нами с двумя типами детерминации клеток агрегата. Однако межклеточные взаимодействия (через диффундирующие морфогены), учитываемые в форме двух последних слагаемых уравнения (44), способны нарушить устойчивость однородных состояний

Действительно, уравнение (44) по форме совпадает с уравнением (II.6) и, следовательно, содержит общие математические предпосылки неустойчивости тьюрингова типа (см. § II.3). Однако здесь мы не можем воспользоваться формальными результатами, полученными при исследовании неоднородных распределений в § II.3, ввиду своеобразия характера дисперсионной зависимости в уравнении (44). Причиной этого своеобразия является формально бесконечный радиус эффекта самоподавления, предполагаемый членом $-\beta\kappa_n(a)$. Менее формально существенной оказывается диспропорция величин L , R_n и R_d :

$$R_d \ll L < R_n,$$

где R_d и R_n — характерные диффузионные радиусы для ДИФ и NH_3 , а L — характерный линейный размер агрегата.

Особенность зависимости $\lambda(k)$ состоит в том, что значения λ , близкие к максимальному, имеет целый ряд нормальных мод с кратными значениями волнового числа k . Тем самым неустойчивость однородного распределения \bar{a} всегда оказывается существенно вырожденной. Действительно, при условии отсутствия потоков на границах J_n, J_d для всех неоднородных нормальных мод $\delta a_n(x, t) \sim e^{\lambda_n t} \cos(k_n x)$ демпфирующий фактор $\langle \delta a_n \rangle$ отсутствует. Он включается лишь для гомогенных возмущений δa_0 . Имея это в виду, из уравнения (44) после его линеаризации получаем выражения для показателей экспоненциальной эволюции нормальных мод:

$$\tau_a \lambda_0 = -\beta\kappa_n + \omega, \quad \tau_a \lambda_i = -R_d^2 k_i^2 + \omega, \quad i \geq 1,$$

где $\omega = df(\bar{a})/da$. Устойчивость стационарных состояний 0 и 1 в "точечной" динамике предполагает отрицательные значения λ_0 . Но если при этом величины ω положительны, то при больших L (так что $\omega > R_d^2 (\pi/L)^2$) моды с i от 1 до известного критического значения имеют положительный временной показатель λ_i . Таким образом, оба однородных состояния оказываются асимптотически неустойчивыми. Исходно однородная масса клеток агрегата должна испытывать самопроизвольное расслоение по значению параметра λ_i , т.е. по типу детерминации.

Существенная вырожденность асимптотической неустойчивости однородных распределений \bar{a} делает неконструктивным квазигармонический метод анализа нелинейной фазы развития неустойчивости (см. § II.3). Однако необходимые сведения о свойствах неоднородных распределений удастся получить, комбинируя численный и качественный методы анализа.

Безя в качестве начального условия произвольную последовательность локализованных возмущений на фоне однородного состояния и далее численно решая уравнение (44), получаем эволюцию распределения $a(x, t)$. Ее характерной чертой является двухфазность. Первая, более быстрая стадия, приводит к формированию "доменных стенок" — крутых фронтов раздела между участками плато. На следующей, относительно медленной стадии смещаются уровни плато и сдвигаются (без изменения формы) разделяющие их фронты. Асимптотическим состоянием является ряд доменов с фиксированными уровнями верхнего и нижнего плато и стационарными положениями фронтов раздела. Из численного анализа следует также, что однозначного распределения длин доменов в асимпто-

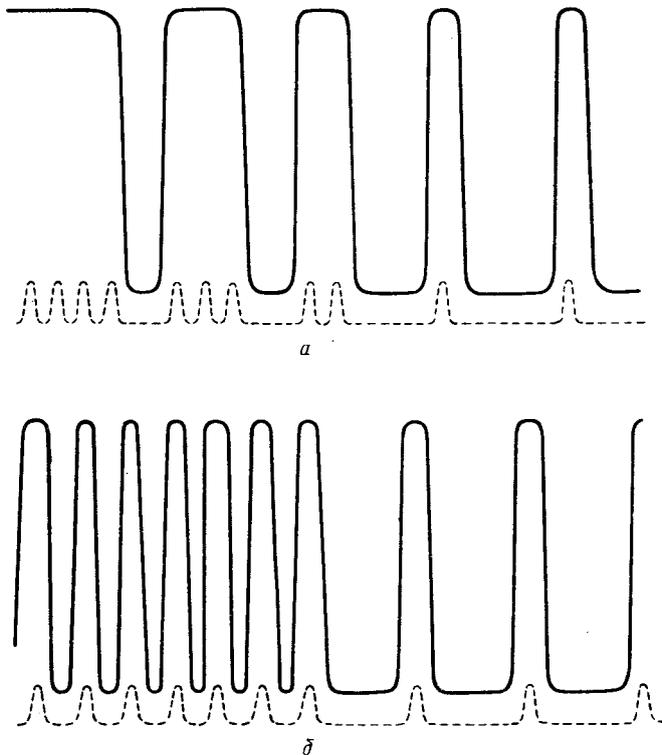


Рис. 24. Эволюция распределения параметра клеточной детерминации, полученная численным решением уравнения (40) без конвективного члена. Используемые значения параметров: $\tau_a = 5 \cdot 10^{-2}$, $R_a = 2 \cdot 10^{-2}$. Асимптотические состояния (сплошные линии) полностью определяются начальным состоянием (штриховые линии). В обоих случаях значение $\langle a \rangle$ в асимптотическом состоянии одно и то же; $f = -0,5a + 15a^2 - 10a^3$; $\beta \kappa_n = 2$

тическом состоянии не существует. Данное распределение варьируется изменением начального профиля $a(x, 0)$ (рис. 24). Вместе с тем уровни плато и форма профиля $a(x)$ в переходной области однозначно детерминированы. Контролируя в численном анализе отдельно среднее значение $\langle a \rangle$, обнаруживаем, что изменение этого параметра монотонно. При старте из состояния с относительно низким значением $\langle a \rangle_0$ величина $\langle a \rangle$ монотонно растет.

Выделив "доменную стенку" в качестве основного элемента структуры асимптотического распределения $\bar{a}(x)$, мы можем уточнить некоторые характеристики этой структуры путем качественного и аналитического исследования. Соответствующее рассмотрение с необходимыми деталями будет проведено в следующей главе. Отсылая к ней за подробными разъяснениями, приведем здесь лишь качественные выводы.

1. На любом ограниченном отрезке $x \in [0, L]$ стационарное решение уравнения (44) с одной доменной стенкой асимптотически устойчиво. Расположение стенки по отношению к границам отрезка однозначно детерминировано.

2. Пропорции структуры бинарного расслоения (отношение длин доменов) инвариантны по отношению к изменению размера отрезка L

Вывод об асимптотической устойчивости, очевидно, не распространяется на состояния типа тех, которые мы представили выше как результат численного решения уравнения (44) (см. рис. 24). Действительно, поскольку, как было отмечено, бинарное расслоение может реализоваться на любом отрезке (конечно, превышающем протяженность переходной области $\Delta x \sim R_a$), постольку может сформироваться и любое распределение длин доменов в структуре, где их более двух. Это означает, что любое асимптотическое состояние уравнения (44), в котором более двух непрерывных участков плато, является состоянием безразличного равновесия. Единственным асимптотически устойчивым состоянием является бинарное расслоение.

С другой стороны, отмечалось, что бинарное расслоение на отрезке любой протяженности имеет фиксированные пропорции. Отсюда следует, что и совокупность таких расслоений, формирующая многодоменную структуру распределения $\Delta x \sim R_a$, несмотря на подвижность границ доменов, имеет ту же инвариантную характеристику. Тем самым оказывается инвариантным — не зависящим от полного размера и детального характера асимптотического распределения $\bar{a}(x)$ — отношение совокупных протяженностей областей с высоким и низким плато. Это означает и инвариантность среднего значения $\langle a \rangle$ и, в соответствии с (46), средней концентрации ПСТ-клеток.

Напомним, все, что говорилось выше о динамике распределения параметра детерминации, относится к макроскопически однородным распределениям дифференцирующихся клеток. Последнее условие позволило нам игнорировать вклад конвективного члена в эту динамику. Уравнением (44), как мы видели, контролируются лишь три макроскопические характеристики: это уровни верхнего и нижнего плато асимптотического распределения $\bar{a}(x)$ и среднее по всему интервалу $(0, L)$ значение параметра a . Ко всем остальным макроскопическим характеристикам, в том числе и характеру распределения $\bar{a}(x)$, сглаженного в макроскопическом масштабе, асимптотические состояния динамического уравнения (44) безразличны.

Далее, как накладывается на эволюцию распределения $a(x, t)$ учет макроскопических потоков клеток? Если границы агрегата непроницаемы для клеток: $J_b|_{0,L} = 0$, то интеграл $\int \frac{\partial J_b}{\partial x} dx$ по объему равен нулю.

Отсюда очевидно, что на значении среднего конвективный член в уравнении (40) не сказывается. Данный параметр, являющийся критическим при определении характера распределения дифференцирующихся клеток, полностью определен редуцированным уравнением (44) и меняется во времени, как было отмечено, монотонно.

в) Общая картина дифференцировки клеток в раннем агрегате из анализа динамической модели (40) – (42). Из проведенного анализа динамической модели (40) – (42) вырисовывается следующая картина дифференциации клеток в агрегате. Собственно дивергенция клеточных типов — локальный процесс с масштабом когерентности порядка R_a . Данный процесс

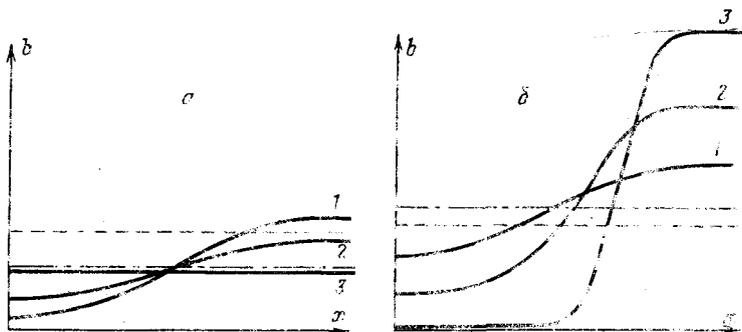


Рис. 25. Гомогенизация распределения хемотактически активных (престеблевых) клеток b при средней концентрации $\bar{b} = (a)$ ниже порогового значения $b_{кр}$; спонтанное расслоение клеточной массы в результате хемотактической сортировки при средней концентрации ПСТ-клеток \bar{b} выше порогового значения $b_{кр}$ (б); 1–3 – профили $b(x, t)$ в последовательные моменты времени, полученные при численном решении уравнений (41'), (42). Штрихпунктир – пороговый уровень $b_{кр}$, штриховая линия – уровень среднего значения \bar{b}

управляется двумя диффундирующими морфогенами – активаторами престеблевой и преспоровой детерминаций клеток, имеющими соответственно малый и большой по отношению к размерам агрегата радиусы диффузии. Единственным макроскопическим параметром пространственного распределения дифференцирующихся клеток, контролируемым этим процессом, является суммарная объемная доля каждого из типов клеток.

Характер макроскопического распределения клеток контролируется двумя антагонистическими модами их подвижности – дифференциальным хемотаксисом (престеблевые клетки в этом отношении более активны) и диффузией. Критическим параметром, определяющим этот характер, является суммарная доля (или средняя концентрация) престеблевых клеток. При малом значении данного параметра – на начальном этапе дифференцировки – распределение дифференцирующихся клеток макроскопически однородно.

Медленно – во временной шкале с масштабом τ_a (часы) – при поддерживаемой макроскопической однородности параметр (a) растет. По достижении им критического порогового значения однородное распределение клеток лишается асимптотической устойчивости. За порогом неустойчивости хемотаксис доминирует над диффузией клеток. При этом в исходно однородной массе клеток происходит самопроизвольная сортировка – хемотактически активные престеблевые клетки ассоциируются в компактные скопления (рис. 25).

Представленная картина дифференциации клеток на ранней стадии постагрегационного развития находится в качественном соответствии с наблюдаемой в эксперименте и описанной в § III.1. В принципе теоретическая модель, из которой была получена эта картина, позволяет проводить и количественное сопоставление с опытом. При этом в качестве тестируемых характеристик процесса могут выступать такие, как порог спонтанной сортировки дифференцирующихся клеток, число форми-

рующихся престолевых ассоциатов и некоторые другие. Однако специальный контроль этих характеристик в эксперименте пока не проводился. Кроме того, имеющийся фактический материал не позволяет получить надежную оценку ряда феноменологических параметров теории (f_1, R_a, μ). Эти параметры вполне доступны прямому определению из эксперимента, но и это пока не сделано.

Формулировку общих выводов, касающихся макроскопического контроля дифференцировки клеток в агрегате *Dictyostelium*, мы отложим до прояснения дальнейшего хода событий в раннем агрегате.

§ III.6. Полное пространственное расслоение дифференцированных клеток и морфологическая поляризация агрегата

Ассоциация престолевых клеток, обусловленная хемотактической неустойчивостью их диссоциированного состояния, еще не дает окончательного паттерна дифференцировки, типичного для псевдоплазмодия. Диффузионный радиус для аттрактанта, как отмечалось, в несколько раз уступает характерным линейным размерам раннего агрегата (100 против 500 мкм). Тем самым в объеме агрегата может зарождаться сразу несколько кластеров престолевых клеток. Но в нормальном развитии все они оказываются ассоциированными в одно компактное скопление, занимающее фронтальную часть тела псевдоплазмодия. Это дальнейшее расслоение клеточной массы сопровождается ее морфологической поляризацией. Осевая структура агрегата возникает и поддерживается благодаря объемной сегрегации клеток. Это известно из результатов простых опытов, проиллюстрированных рис. 16.

В настоящем параграфе анализируются движущие силы объемной сегрегации и морфологической поляризации агрегата [190, 191].

При исследовании модели (40)–(42) игнорировался существенный для дальнейшего фактор граничных условий для аттрактанта. Внешняя граница агрегата неоднородна по отношению к пропусканию цАМФ. Поскольку последний нелетуч, его поток через границу "агрегат – воздух" должен отсутствовать, т.е. справедливо условие

$$\left. \frac{\partial c}{\partial n} \right|_{\Omega_1} = 0.$$

Напротив, поверхность контакта с агаром может грубо рассматриваться как поглощающая:

$$c|_{\Omega_2} = 0,$$

что соответствует диффузии молекул цАМФ из агрегата в агар и быстрому разбавлению в нем.

Считая пока границу агрегата неподвижной, выясним направление перемещения одиночного скопления престолевых клеток.

Неоднородность условий на границе для диффундирующего аттрактанта создает сквозной градиент его концентрации в объеме агрегата. Это в свою очередь должно вызывать направленные перемещения хемотактически активных клеток.

Направление вектора градиента объемной концентрации цАМФ в стационарном распределении $c(\mathbf{r})$ определяется асимптотическим решением уравнения (42)

$$f_1 b - c + R_c^2 \nabla^2 c = 0. \quad (48)$$

Ради простоты будем пренебрегать размером скопления ПСТ-клеток по сравнению с расстоянием до границы агрегата. Считая, кроме того, что количество клеток в скоплении неизменно, получим вместо (48) уравнение диффузии и распада с локализованным источником:

$$-c + R_c^2 \nabla^2 c + Q\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0) = 0. \quad (49)$$

Необходимо определить вектор ∇c в точке \mathbf{r}_0 . Рассмотрим следующие упрощенные модельные ситуации [190].

Пусть область, доступная аттрактанту в трехмерном пространстве, ограничена плоскостью Ω . Проанализируем два варианта граничных условий на плоскости:

- а) отсутствие потока: $\partial c / \partial n|_{\Omega} = 0$;
- б) поглощение аттрактанта: $c|_{\Omega} = 0$.

Решение уравнения (49) при обоих типах граничных условий без труда находится методом "изображений". При этом задача (49) распространяется на все пространство, а эффект граничных условий имитируется источником-изображением. Последний должен быть помещен в точке \mathbf{r}_0^* — зеркально-симметричной к \mathbf{r}_0 . Интенсивность Q^* производства аттрактанта "изображением" должна быть выбрана так, чтобы были выполнены условия а) или б).

Легко видеть, что величина Q^* окажется в случае а) $Q^* = Q$ и в случае б) $Q^* = -Q$. Далее немедленно находим стационарные распределения, удовлетворяющие уравнению (49):

$$\text{а) } c = QR_c \left(\frac{1}{r} e^{-\frac{r}{R_c}} + \frac{1}{r^*} e^{-\frac{r^*}{R_c}} \right),$$

$$\text{б) } c = QR_c \left(\frac{1}{r} e^{-\frac{r}{R_c}} - \frac{1}{r^*} e^{-\frac{r^*}{R_c}} \right),$$

где $r = |\mathbf{r} - \mathbf{r}_0|$, $r^* = |\mathbf{r} - \mathbf{r}_0^*|$.

Именно вклад источника-изображения (второе слагаемое в обоих выражениях) учитывает эффект границы и обеспечивает хемотактический сигнал — градиент концентрации c в точке \mathbf{r}_0 . Как легко видеть, вектор $\nabla c(\mathbf{r}_0)$ направлен нормально к плоскости Ω в случае а) и от нее — в случае б). Отсюда заключаем, что граница, непроницаемая для аттрактанта, притягивает его источник, а поглощающая — отталкивает.

Перенося этот качественный результат на агрегат со смешанными граничными условиями, приходим к выводу, что скопление ПСТ-клеток — источник аттрактанта — должно вытесняться из объема на поверхность агрегата. Несколькими ниже мы дополнительно убедимся в этом в численной имитации.

В силу указанных причин во всех точках раннего агрегата существует составляющая вектора $\nabla c(r_0)$ в направлении низ – верх. Эта составляющая дает однонаправленный хемотактический снос для всех престеблевых клеток и их скоплений. В результате: а) завершается расслоение клеток, так что престеблевые аккумулируются на вершине полусферы, и б) формируется ось развития "верх – низ", определяющая направление последующей морфологической поляризации агрегата. Названные события составляют первый шаг реального морфогенеза псевдоплазмодия.

Физические факторы, определяющие равновесную форму псевдоплазмодия. При элонгации агрегата в движение, ориентированное вдоль выделившейся оси, вовлекаются уже все – не только престеблевые – клетки. При этом клетки основания оказываются удаленными от источника аттрактанта, находящегося на вершине, на расстояние, превышающее его диффузионный радиус (100 мкм). Поэтому хемотаксис не должен играть роли движущей силы данного преобразования. Здесь необходимо привлечь к анализу общие физические свойства клеточной массы. Рассматривая ее как каплю жидкости, добавляем к имеющимся два макроскопических параметра – гидростатическое давление p и поверхностное натяжение σ на границе агрегат – воздух [181].

В области соска на вершине растущего агрегата его поверхность обладает значительной кривизной $r \sim 100$ мкм. Опираясь на нее, мы можем определить *равновесную* форму агрегата из следующих соображений [190].

Локальное механическое равновесие поверхности задается условием Лапласа

$$\Delta p = \sigma/R, \quad (50)$$

где R – значение средней кривизны, σ – коэффициент поверхностного натяжения, а Δp – перепад гидростатического давления на поверхности. Равновесие в объеме агрегата задается условием взаимной компенсации хемотактической силы и градиента давления. Оно имеет вид

$$f_{ch} = \eta \nabla c = \nabla p. \quad (51)$$

Здесь феноменологический параметр η пропорционален коэффициенту хемотактической подвижности μ .

Два условия равновесия (50) и (51) вместе с полем концентрации аттрактанта $c(r)$ – решением задачи (49) – определяют равновесную форму агрегата. Общее решение этой проблемы крайне осложнено тем обстоятельством, что поле концентрации аттрактанта определяется не независимо от формы. Изменение формы клеточной массы обуславливает (через граничные условия) и в то же время обусловлено (в силу (50), (51)) изменением распределения c . В такой самосогласованной постановке задача решается только путем численной имитации с помощью ЭВМ. В следующем разделе будут приведены полученные этим путем результаты.

Для качественного предсказания равновесной формы примем как данное начальное условие формообразования, соответствующее сформировавшемуся бугорку на вершине полусферического агрегата (рис. 26). Считая радиус r кривизны поверхности в этой области заданным, из условия (50) получим гидростатическое давление в ней $p_u = p_0 + 2\sigma/r$. Далее, считая известным перепад концентрации аттрактанта Δc между областью

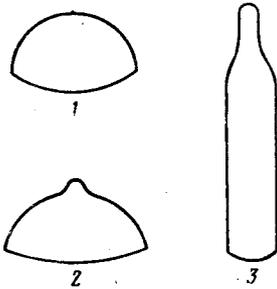


Рис. 26. Преобразование формы раннего агрегата *D. discoideum* (1, 2), форма мигрирующего псевдоплазмодия (3)

престеблевых клеток, сконцентрированных в буторке, и частью агрегата, свободной от них, получим значение давления в этой последней: $p_b = p_0 + 2\sigma/r - \eta\Delta c$. Перепад давления $\Delta p = p_b - p_0$ определяет среднюю кривизну поверхности агрегата в части, содержащей преспоровые клетки: $\Delta p = \sigma K$. Пренебрегая (как мы уже делали раньше) производством аттрактанта ПСП-клетками, приходим к постоянству величины K .

Форма границы определяется помимо названного условия постоянства кривизны заданным полным объемом агрегата V . Если величина K^{-3} мала по сравнению с этим объемом, то единственный способ удовлетворить двум названным условиям (заданный объем и заданная кривизна поверхности) — вытянуть клеточную массу в цилиндр. Таким образом, мы приходим к реальной равновесной форме мигрирующего псевдоплазмодия, такой, как на рис. 26.

Численная имитация процесса формообразования [191]. Для определения квазистационарного поля концентрации аттрактанта $c(r)$ численно решалась задача о диффузии и линейном распаде:

$$-c + R_c^2 \nabla^2 c = 0. \quad (52)$$

Вместо точечного источника в уравнении (49) на сфере радиуса r_0 , малого по сравнению с характерными размерами агрегата (его поверхность Σ), задавалось фиксированное значение концентрации $c(r_0) = \Gamma$. Условия на внешней границе агрегата принимались в виде $\partial c / \partial n|_{\Sigma} = 0$.

Хемотактическая сила, действующая на источник, рассчитывалась по формуле

$$F_{ch} = \eta \oint_{\Omega_0} \nabla c d\Omega. \quad (53)$$

Главной особенностью задачи, как отмечалось, является подвижность границы Σ . Ее деформация следует за коллективными перемещениями клеток в объеме, обусловленными хемотактической силой f_{ch} . При заданном (квазистационарном) распределении $c(r)$ может быть введена соответствующая плотность потенциальной энергии $u = -\eta c(r)$, что непосредственно следует из выражения для силы в виде $f_{ch} = \eta \nabla c$.

Полная потенциальная энергия всего объема агрегата выражается интегралом:

$$E = 2\pi \int_0^R R \int_0^{z=f(R)} u(R, z) dz dR + \sigma S. \quad (54)$$

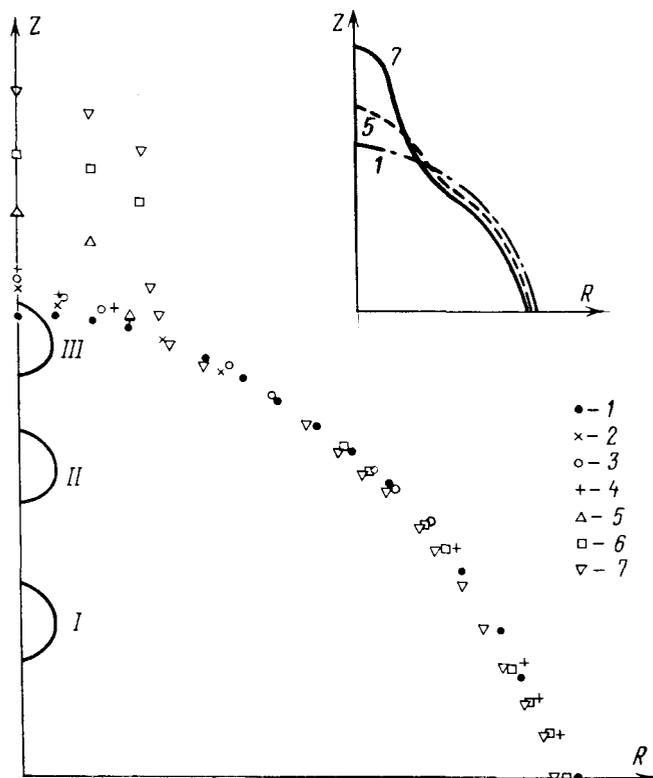


Рис. 27. Машинная имитация формообразования агрегата *D. discoideum* на основе хемотаксиса: 1–7 – последовательные положения контура поверхности на вертикальном срезе (показана половина симметричного профиля); I–III – последовательные положения сферы Ω_0 , имитирующей источник цАМФ. Переход I–III происходит за время, меньшее, чем затрачивается на переход I–2

В это выражение добавлена поверхностная потенциальная энергия σS . Выражение (54) представлено в цилиндрических координатах и подразумевает сохранение осевой симметрии в ходе эволюции формы (рис. 26).

Квазиравновесная форма агрегата при заданном поле $c(r)$ определяется из условия минимальности $E(R, f)$ при постоянном объеме V . Варьируя выражение (54) и приравнявая вариацию к нулю, получаем для квазиравновесного состояния

$$c(R, f(R)) - 2\sigma K(R, f(R)) + \lambda = 0, \quad (55)$$

где λ – множитель Лагранжа, определяющийся из условия постоянства объема

$$2\pi \int_0^R R f(R) dR = V,$$

а K – локальная средняя кривизна поверхности $z = f(R)$.

На каждом шаге итерационной процедуры определялось распределение $c(r)$ в заданных границах. Далее вычислялись значения выражения в левой части равенства (55) вдоль границы. Таким образом вычислялась сила, приложенная к внешней поверхности агрегата. Локальный сдвиг точек поверхности принимался пропорциональным значению этой силы. Перемещение источника полагалось пропорциональным F_0 . Тем самым определено новое положение границы и источника и заданы исходные данные для выполнения следующей итерации.

Реальный агрегат *D. discoideum* окружен слизистой оболочкой, секретируемой его клетками. Эта оболочка препятствует выходу за пределы агрегата "всплывающего" скопления престолевых клеток. В расчете это учитывалось добавлением упругой силы, действующей на источник, пришедший в контакт с границей.

Результат расчета, полученный по описанной выше итерационной схеме, — эволюция формы клеточной массы — показан на рис. 27. Как видно, предсказываемая эволюция соответствует наблюдаемой, представленной на рис. 26.

§ III.7. Сопоставление с экспериментальными данными

а) Эксперименты по регенерации псевдоплазмодия. Если в эксперименте изолировать поперечным рассечением два фрагмента тела мигрирующего псевдоплазмодия, каждый из них со временем восстанавливает на соответственно уменьшенном количестве клеточного материала все пропорции структуры неоперированного слизевика (см. рис. 16). Это давно известные результаты, выявляющие наличие типичных свойств морфологических полей у клеточного агрегата *D. discoideum* (§ III.1).

После анализа, проведенного в двух последних параграфах, объяснение этих свойств не представляет труда. Результатом названной операции является нарушение равновесия: как локального — в динамической системе контроля детерминации (40), так и глобального механического, определяемого системой уравнений (48)–(51). Первое обусловлено нарушением пропорции двух типов дифференцированных клеток. Очевидно, передний фрагмент слизевика обладает избыточной по отношению к равновесной долей престолевых клеток и тем самым величина $\langle a \rangle$ в нем оказывается завышенной. Напротив, в заднем фрагменте эта величина ниже той, которая должна быть в асимптотическом состоянии уравнения (40).

Релаксация к равновесию $a_t = 0$ в каждом из фрагментов приводит к восстановлению исходного значения $\langle a \rangle$ (напомним, не зависящего от объема фрагмента). При этом в переднем фрагменте, где величина $\langle a \rangle$ в начальный момент велика, в соответствии с уравнением (40) производная a_t в среднем по объему получает отрицательный приток, а в заднем — положительный. Соответственно в переднем фрагменте должна происходить редифференцировка ПСТ–ПСП, а в заднем — обратная. Больше того, опираясь на модель, мы можем уточнить пространственный характер процесса редифференцировки.

В переднем фрагменте средняя доля престолевых клеток понижается от относительно большого исходного уровня $\langle a \rangle_0$, так что весь процесс

восстановления величины $\langle a \rangle$ протекает при условии нестабильности макроскопически однородного распределения дифференцированных клеток $\bar{b} > b_{кр}$. Соответственно в ходе редифференцировки должно поддерживаться расслоение клеток (§ III.5, см. рис. 25).

Напротив, в заднем фрагменте на начальной стадии восстановления равновесия средняя доля престеблевых клеток мала $\langle a \rangle_0 < \langle a \rangle_{кр}$. При этом асимптотически стабильным является гомогенное диффузное распределение ПСТ-клеток. В отсутствие объемной сегрегации клеток нет и фактора, определяющего морфологическую ось в клеточной массе. В этом случае агрегат силой поверхностного натяжения должен восстанавливать сферическую форму. В опыте действительно регистрируется начальное округление преспоровой части псевдоплазмодия (см. рис. 16). Далее, по мере накопления престеблевых клеток, их диффузное распределение становится нестабильным и все события должны развиваться так, как было описано для нормального развития. Именно такой путь процесса регенерации слизевика в преспоровом фрагменте отмечается в эксперименте [165].

б) Эксперименты по трансплантации. Более насыщенная деталями экспериментальная картина получена на химерных образцах в работах [172, 192].

В этих работах при изоляции фрагментов разрез поперек длинной оси слизевика проводили по одному из пяти примерно равноотстоящих друг от друга положений. Затем фронтальный фрагмент (ФФ) одного слизевика приживлялся к тыловому (ТФ) — другого (см. схему на рис. 28). После операции изоляции в тыловом фрагменте включается регенерационный процесс — накопление престеблевых клеток — который должен завершаться генерацией новой оси развития (см. приведенные выше результаты по регенерации псевдоплазмодия). Однако при формировании химер это происходит лишь в определенных комбинациях фронтальных и тыловых сегментов.

В одной серии экспериментов ТФ был неизменен, тогда как длина ФФ варьировалась. В опыте контролировалась частота генерации в ТФ собственной морфологической оси в зависимости от длины ФФ. При успешной генерации химерный образец имел всего две оси (в ФФ, где скопление престеблевых клеток существует изначально всегда, существует и собственная ось — см. выше). Такой образец порождал двух независимых слизевиков. В противном случае из химеры формируется единственный слизевик с осью морфологической поляризации, определяемой сегрегацией дифференцированных клеток в ФФ.

Результат, в виде зависимости частоты подавления регенерации морфологической оси в ТФ от длины тестируемого ФФ, приведен на рис. 28. Как видно, подавляющий эффект ФФ убывает по мере увеличения расстояния до регенерирующего ТФ.

Контрольный опыт — сравнение частоты генерации второй оси в комбинациях 1234/23 (эффективность генерации — 85%) и 12/2345 (та же величина — 25%) — показал, что результат операции определяется не количеством клеточного материала, а начальными условиями процесса регенерации (используемыми при получении химеры сегментов).

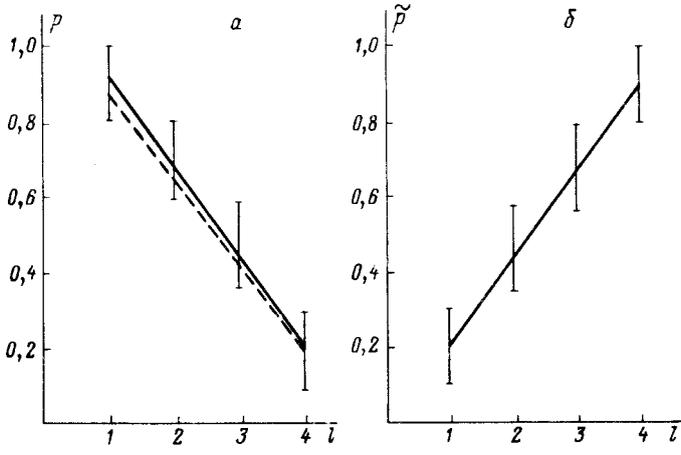
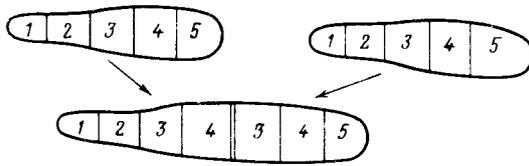


Рис. 28. Частоты: *a* – ингибирования дупликации морфологической оси p в зависимости от длины фронтального сегмента в химерном образце при неизменном заднем сегменте (2345) и *б* – дупликации оси \tilde{p} в зависимости от длины заднего сегмента при неизменном переднем (1234) [172, 192]. Цифры в нижнем ряду соответствуют длине химерного образца. Штриховой линией показана зависимость величины $1 - \tilde{p}$ от полного размера химеры, построенная путем пересчета данных рис. *б*. Вверху – схема эксперимента [172, 192]

В другой серии экспериментов неизменным был ФФ – 1234, а варьировался ТФ – 2345, 345, 45, 5. Та же зависимость частоты генерации двух осей развития, но теперь от длины ТФ, приведена на рис. 28.

Описанные эксперименты идейно близки экспериментам по трансплантации, проводившимся на пресноводной гидре [193]. По существу близки и полученные результаты. В обоих случаях показана, с одной стороны, способность к регенерации полной структуры морфогенетического поля его частью, а с другой – эффект подавления формирования множественных однотипных элементов структуры поля, *убывающий с расстоянием, на котором такие элементы могут зарождаться.*

В данном случае речь идет о поле, структура которого определена паттерном дифференцировки клеток в агрегате ПСТ/ПСП и морфологической полярностью клеточной массы. В литературе принята точка зрения о независимой регуляции названных макроскопических процессов [172, 160, 194]. Полагают, что одна система химических морфогенов контролирует пространственный порядок дифференцировки клеток, другая – формирование "организатора" морфологической оси. Экспериментальных оснований для такого разделения нет.

В двух последних параграфах нам удалось обосновать все существенные макроскопические преобразования от однородной клеточной массы раннего агрегата до сформированного слизевика, полагаясь лишь на формы активности клеток, установленные экспериментально. При этом двум химическим морфогенам (ДФ и NH_3) приписывается функция контроля только суммарных долей дифференцированных клеток, а макроскопический порядок самоорганизуется как следствие хемотактической активности клеток.

Можно ли, оставаясь на тех же позициях, обосновать и приведенные выше результаты трансплантационных экспериментов?

Мы видели, что образование компактных областей однородно дифференцированных клеток достигается путем сортировки за счет неодинаковой хемотактической активности клеток. Далее, если скопление ПСТ-клеток сформировалось, в результате хемотактического взаимодействия с границей клеточного агрегата (предыдущий параграф) оно генерирует ось дальнейших морфологических преобразований. Регенерация оси в *изолированном* заднем сегменте псевдоплазмодия очевидно вытекает из названных свойств. Как может повлиять на нее посадка переднего сегмента? Качественно результат такой манипуляции нетрудно предсказать.

Ассоциат ПСТ-клеток, изначально существующий на переднем конце вновь сформированной химеры, является источником градиента цАМФ, монотонно спадающего в направлении от переднего конца. Если пороговое значение градиента для хемотактического отклика достигается на расстоянии l_1 от источника, то от протяженности ФФ зависит глубина погружения надпорогового градиента в ТФ химерного образца $\delta = l_1 - l_{\text{ФФ}}$. В пределах соответствующей области ПСТ-клетки испытывают снос по градиенту в направлении к переднему краю. Следовательно, они не могут участвовать в генерации собственной оси ТФ. Этой способностью обладают лишь ПСТ-клетки заднего сегмента в области Ω протяженностью $L - l_1$, примыкающей к его тылу.

На основании сказанного можно предсказать, что зависимость частоты зарождения второй оси от тестируемой комбинации фрагментов является функцией лишь одной степени свободы — длины L (вместо двух, приведенных на графиках рис. 28). Строя графически зависимость частоты подавления генерации второй оси развития в химерном образце от указанной длины, убеждаемся в справедливости данного предсказания.

Далее, необходимо объяснить, почему приведенная зависимость убывающая. Приводимое в литературе объяснение на основе постулата об источниках ингибитора "организатора" на двух полюсах слизевика [172] представляется искусственным и необоснованным.

Хотя ПСТ-клетки области Ω непосредственно не ощущают существование градиента аттрактанта в остальной, фронтальной части агрегата, на их самопроизвольную ассоциацию указанный градиент влияет. Действительно, для свободно диффундирующих клеток фронтальная граница области Ω является открытой. Оказавшись здесь, эти клетки хемотактически сносятся в направлении фронтального полюса. Таким образом, имеет место линейная по концентрации ПСТ-клеток убыль их количества в области Ω . Скорость этой убыли определяется скоростью хемотактического

сноса μ :

$$dN/dt = -\mu S b.$$

Здесь N — полное количество престолевых клеток в области Ω , S — площадь контакта этой области с передним сегментом химеры. Учитывая, с другой стороны, гомогенное накопление ПСТ-клеток вследствие редифференцировки преспоровых, получим уравнение накопления в виде

$$\frac{db}{dt} = -\mu \frac{b}{L - l_1} + Q,$$

где Q определяется темпом редифференцировки.

В соответствии с последним уравнением предельный уровень концентрации ПСТ-клеток в ТФ должен быть $\bar{b} = Q(L - l_1)/\mu$, т.е. он линейно падает с протяженностью области Ω . С уменьшением L значение \bar{b} должно оказаться ниже критического $b_{кр}$, необходимого для аккумуляции ПСТ-клеток посредством хемотактического сортинга. В этом случае не осуществляется уже первый шаг к генерации собственной оси развития в области Ω . Если же условие ассоциации $\bar{b} > b_{кр}$ не нарушено, то для формирования оси необходимо, чтобы ПСТ-скопление возникло не на границе области Ω . Иначе оно может мигрировать как целое к источнику аттрактанта на переднем полюсе образца, не порождая новой оси развития. Последнее тем более вероятно, чем короче область Ω .

Приведенные соображения качественно проясняют наблюдаемую зависимость частоты дупликации оси развития от комбинации сегментов в трансплантационных экспериментах [172, 192].

в) Развитие агрегата в нестандартных условиях. Агрегаты амёб *D. discoideum* можно получать не на поверхности агара, как обычно, но из суспензии клеток. В этом случае формируются плотные клеточные агглютинаты, в которых затем происходит нормальная дифференциация клеток и их пространственная сегрегация [159, 195]. Однако ни формирования оси, ни последующей морфологической трансформации, сопровождающих дифференцировку клеток в агрегате на подложке, при агрегации из суспензии не наблюдается.

В другом эксперименте [196] клеточный агрегат устранился с поверхности агара и помещался на кончик иглы. В этом случае в одном агрегате возникало несколько сосков, которые порождали несколько осей развития и, в конечном итоге, несколько плодовых тел.

При интерпретации этих результатов акцент следует сделать на различии в граничных условиях в двух описанных экспериментальных ситуациях [190].

В первом случае граница агглютината свободно пропускает молекулы цАМФ. Огрубляя, эту границу можно считать поглощающей для аттрактанта. Напротив, в ситуации с агрегатом на кончике иглы вся граница агрегата непроницаема для цАМФ.

Если при первичной хемотактической сортировке сформировалось несколько престолевых кластеров (см. § III.5), то в нормальных условиях (клеточная масса на поверхности агара) все они испытывают однонаправленный снос — от подложки. В результате формируется единствен-

ное компактное скопление ПСТ-клеток на вершине полусферической массы. Дальнейшая последовательность событий для данного, нормального случая уже не один раз называлась (данный параграф выше и § III.6).

В эксперименте с агрегатом, окруженным раствором, все престолевые кластеры вследствие отталкивания от поглощающей аттрактант границы также концентрируются в единое скопление, но теперь в центре агрегата. В данном случае сферическая симметрия не должна нарушаться, оси пространственной сегрегации клеток не формируются. Соответственно в итоговом состоянии центральная область клеточного шара заполнена ПСТ-клетками с преспоровым поясом вокруг. Именно такое распределение дифференцированных клеток регистрируется в эксперименте [159, 195].

Наконец, в агрегате, устроенном с подложки [196], ПСТ-кластеры притягиваются границей агрегата, непроницаемой для аттрактанта. При этом нет направления их предпочтительного движения, как в первом случае, ибо граница теперь однородна. Таким образом, в данном случае отсутствует фактор вторичной агрегации престолевых клеток, приводящий в норме к их концентрации в единое скопление. Каждый из кластеров, оказавшись на поверхности клеточной массы, может породить радиально направленную ось, что и наблюдается в эксперименте [196].

ВЫВОДЫ

Типичные элементарные акты группового поведения клеток в развитии многоклеточных организмов — дивергенция клеточных типов и их пространственная сегрегация, закладка осевых структур, направленные коллективные перемещения клеток — достаточно полно и наглядно представлены на многоклеточной фазе цикла развития псевдошизомодия *Dd*. Теоретическое исследование, проведенное в данной главе, имело целью описать и обосновать, исходя из экспериментально установленных форм индивидуальной активности клеток *D. discoideum*, наблюдаемые режимы их группового поведения. Фактические сведения об этих формах и молекулярных факторах их контроля, доступные из литературы, достаточны для формулировки феноменологической модели развития псевдошизомодия.

Математический анализ модели позволяет дать ответ на вопрос о существенных контролируемых в эксперименте параметрах, управляющих сменой типов упорядоченности группового поведения клеток. Конкретно, по основным этапам развития *Dd* получены следующие результаты.

I. Ранняя мелкомасштабная кластеризация клеток. Для данного этапа развития модель имеет дело с полем диспергированных клеток и принимает в рассмотрение непрерывную секрецию аттрактанта, его диффузию во внеклеточном пространстве, хемотактическое и диффузионное перемещение клеток. Показано, что названные формы активности сообщают клеточному полю способность к спонтанной смене макроскопического состояния. Она осуществляется в результате неустойчивости состояния с однородным распределением диспергированных клеток по отношению к коллективным модам флуктуаций плотности.

Стационарным продуктом развития неустойчивости является пространственно регулярное расслоение поля, при котором скопления клеток разделены интервалами порядка диффузионной длины аттрактанта.

Критическим параметром данного перехода является уровень секреции аттрактанта: спонтанная дегомогенизация происходит по мере его роста. Таковой действительно имеет место в преагрегационный период развития клеток *D. discoideum* и примерно совпадает по времени с их кластеризацией. Тем самым устанавливается качественное соответствие выводов из теоретической модели с данными наблюдений.

II. Агрегация на фазе струеобразования. В отличие от предыдущей стадии, поле клеток в фазе струйной агрегации имеет черты крупномасштабной организации. Территория, контролируемая одним центром агрегации ($\sim 1 \text{ см}^2$), покрыта сетью ветвящихся центростремительных потоков агрегирующих клеток. Эти потоки объединяются в центре либо по радиально сходящимся руслам, либо накручиваясь по спиралям на центральное ядро конечного радиуса. Центральная область ядра во втором случае опустошается в результате возникновения центростремительных потоков клеток.

Названные черты реальной картины интерпретируются теоретической моделью, в основе которой лежит выделение ядра агрегационной территории как области автономно, ритмически секретирующих цАМФ клеток. Клетки вне ядра самопроизвольно цАМФ не производят, но способны к индуцированной импульсной секреции (ждуший режим). Эти вводимые в качестве постулатов модели положения не выходят за рамки реальных фактов.

Теоретический анализ автономных режимов секреции ядра, проведенный в приближении двух существенных гармонических мод осцилляций, дает два возможных асимптотических режима автоколебаний. Это синхронные осцилляции (уровня цАМФ) и периодические вихревые автоволны. Во внешней области агрегационного поля ими индуцируются режимы распространения: в первом случае — концентрических волновых фронтов импульсного производства цАМФ, во втором — спиральных.

Полученные режимы волнового распространения аттрактанта определяют два типа организации потоков клеток, движущихся хемотактически, именно те два типа, которые зарегистрированы в эксперименте.

III. Макроскопический контроль дивергенции клеточных типов в псевдоплазмодии. Общей целью рассмотрения было обоснование и описание на языке математической модели тех черт группового поведения клеток *D. discoideum* в агрегате, которые сообщают клеточной массе типичные черты морфогенетического поля.

Способность к выбору постагрегационной программы развития — престолевой или преспоровой — вводилась в формальное описание стандартным образом на основе общей динамической модели компетенции (II.2). Замкнутое описание детерминации клеток в агрегате, учитывающее наряду с компетенцией к выбору экспериментально установленные факторы его контроля, а также хемотактическую подвижность клеток, дается кинетической системой (III.40) — (III.42). Ее исследование методами качественной теории дифференциальных уравнений в комбинации с численным анализом приводит к следующей картине развития макроскопического состояния агрегата.

На первом этапе дифференцировки клеток в раннем агрегате их пространственное распределение макроскопически однородно. По мере накопления престолевых клеток макроскопическая однородность клеточной

массы спонтанно нарушается — взаимное притяжение ПСТ-клеток, обусловленное хемотактической активностью, приводит к их ассоциации в компактные скопления. Полное пространственное расслоение дифференцированных клеток в агрегате осуществляется в результате однонаправленного хемотактического сноса ПСТ-клеток к вершине агрегата. При этом существен фактор асимметрии граничных условий для аттрактанта — на поверхности агрегата и вдоль границы контакта его с подложкой. Пространственная сегрегация клеток устанавливает ось последующих морфологических преобразований агрегата.

Контроль дивергенции путей развития клеток агрегата, осуществляемый двумя диффундирующими морфогенами, обеспечивает наблюдаемую регуляцию объемных долей (не абсолютных количеств) типов дифференцированных клеток. Необходимым условием такой именно регуляции является существенная диспропорция диффузионных радиусов морфогенов в отношении к размерам агрегата: $R_{\text{диф}} \ll L < R_{\text{NH}_3}$. При данном условии двухморфогенная система контроля детерминации оказывается недостаточной для формирования однозначного макроскопически упорядоченного распределения дифференцированных клеток. Устойчивое формирование паттерна дифференцировки в развитии псевдоплазмодия обеспечивается включением дополнительных движущих сил — хемотактической сортировки и асимметрии граничных условий.

В целом представленная модель позволяет интерпретировать не только окончательный паттерн дифференцировки псевдоплазмодия, но и последовательные фазы его формирования. Существенным в этой последовательности является то, что пространственная упорядоченность дифференцировки достигается не путем трансляции предварительно установившейся "позиционной информации", но путем хемотактической сортировки неупорядоченно дифференцирующихся клеток. Подчеркнем, что свойство регуляции пропорций макроскопического паттерна дифференцировки, исходя из которого формулировалась общая идея "позиционной информации" [31], присуще и псевдоплазмодию. Однако при этом предложенная интерпретация данного свойства исключает какую-либо роль "позиционной информации".

IV. Самоорганизация пространственной формы псевдоплазмодия. Наблюдаемые преобразования формы агрегата в процессе образования мигрирующего слизевика интерпретируются на основании общих физических свойств клеточной массы — поверхностного натяжения на границе агрегат — воздух и гидростатического давления — и хемотактической подвижности в сочетании с секрецией аттрактанта.

Общий анализ и машинная имитация, учитывающие названные факторы, дают хорошее качественное соответствие с наблюдаемой картиной формообразования. Деформация клеточной массы является производной взаимодействия "химической" и "механической" степеней свободы. Это взаимодействие проявляется в зависимости распределения аттрактанта от формы границы агрегата, с одной стороны, и во влиянии этого распределения через хемотаксис на движение клеток — с другой.

V. Интерпретация экспериментов. Дано объяснение результатов описанных в литературе экспериментов по регенерации псевдоплазмодия из изолированных частей и серийным трансплантациям. Этими опытами уста-

навливается наличие в псевдоплазмодии полного и универсального (для многоклеточных) набора свойств морфогенетического поля. Тем самым понятию морфогенетического поля придается физический смысл.

Предложенный механизм формирования морфологической оси в развитии псевдоплазмодия успешно объясняет результаты, полученные при помещении агрегата в нестандартные условия. В этих экспериментах и их интерпретации выявляется роль асимметрии внешних условий в процессе формообразования.

§ III.8. Формулировка сводной модели коллективного развития *D. discoideum*

Доступный фактический материал по многоклеточному развитию *D. discoideum* допускает более глобальную постановку вопроса, чем та, в рамках которой проводился анализ в § III.3–III.6. До сих пор мы каждый раз ограничивали рассмотрение выделенной фазой развития, отличающейся от предыдущих и последующих характерным макроскопическим режимом. При этом ставилась задача обоснования наблюдаемой на данной фазе реорганизации макросостояния клеточного коллектива, исходя из экспериментальной информации о характерных для нее формах активности индивидуальных клеток.

Наша цель в настоящем параграфе — связать рассмотренные эпизоды коллективного развития *Dd* в его единый сценарий. Таким образом, на конкретном примере *D. discoideum* мы рассчитываем прояснить одну принципиальную черту развития многоклеточных — его историчность.

В общем виде вопрос ставится следующим образом. Наблюдая в онтогенезе последовательные переключения в цепи характерных макросостояний, должны ли мы относить их на счет определенных переключений в генетическом аппарате или макроскопические события развития не подчинены столь буквально генетическому контролю? Перестройки на макроскопическом уровне могли бы подготавливаться не экспрессией новых генов и синтезом новых белков, а эволюцией параметров метаболизма при неизменном состоянии генома.

Конечно, окончательный ответ на поставленный вопрос должен дать эксперимент. Однако сейчас это методически невыполнимая задача, поскольку зарегистрировать в клетке появление новых белков, если они представлены в небольшом числе копий, не позволяет чувствительность современных методов, а активацию транскрипции новых генов можно обнаружить, только если сами гены или соответствующая мРНК выделены и клонированы. Иными словами, возможность решения задачи предполагает известный заранее ответ.

Чем может помочь в данной ситуации теория?

Непосредственный контроль макроскопических преобразований в развитии в любом случае осуществляют не гены, а те или иные формы межклеточных взаимодействий (которые модулируются генами). *D. discoideum* в этом отношении — уникальная для теории модель, поскольку межклеточные взаимодействия здесь описаны в эксперименте полно как ни для какой другой многоклеточной системы (§ III.1). Эти взаимодействия обеспечиваются химической сигнализацией и описываются, по крайней

мере на том уровне, который требуется для обоснования коллективного поведения клеток, феноменологической моделью реакционно-диффузионного типа (§ III.2). Если бы удалось показать, что единая модель способна интерпретировать целый ряд перестроек макроскопического состояния, не привлекая всякий раз новые параметры и переменные, то это дало бы дополнительные основания считать метаболический уровень контроля ведущим.

Макроскопические преобразования в развитии *D. discoideum*, с которыми по отдельности мы имели дело в данной главе, включают в себя мелко-масштабную клеточную кластеризацию, крупномасштабную волновую агрегацию, формирование струйных потоков агрегирующих клеток, сортировку дифференцирующихся клеток агрегата. Из эксперимента нам известно, что при всем этом координация поведения клеток осуществляется единой системой химической сигнализации, включающей в себя производство и секрецию цАМФ, его диффузию во внеклеточном пространстве, рецепцию цАМФ и индуцированный отклик в виде секреции и направленного движения клеток (§ III.1).

Непосредственной причиной прохождения указанной серии макроскопических перестроек в развитии *D. discoideum* является закономерная смена динамических режимов сигнализации. Как уже отмечалось (§ III.1), клетки агрегационного поля последовательно проходят режимы непрерывной, монотонной секреции цАМФ (при этом уровень секреции и время жизни цАМФ эволюционируют на доволновой фазе агрегации – первый растёт, затем второе падает), режим рэлейной активности и вновь – режим непрерывной секреции, но на более высоком уровне, чем вначале.

Таким образом, задача состоит в том, чтобы обосновать эту смену в рамках единой динамической модели.

Любая динамическая модель, претендующая на описание названных режимов, должна строиться на базе двух петель обратной связи – положительной и отрицательной. В цепи синтеза цАМФ обе петли имеют одно общее звено – аденилатциклазу (АЦ). Данный фермент активируется комплексом цАМФ-рецептор (положительная обратная связь) и угнетается ингибиторами (в том числе глюкоза, аминокислоты и пр. [176]). Участие цАМФ в отрицательной обратной связи обуславливается его способностью активировать катаболизм высокомолекулярных предшественников ингибитора (например, гликогена [16] или белков, аккумулированных амебами в фазе питания [176]). В эксперименте контролировался суммарный пул белков, запасенных клетками *D. discoideum*, в вегетативной фазе и показан его монотонный расход с характерным временем τ порядка часов в процессе коллективного развития [168]. Тем самым медленно расходуемый резерв питания может служить показателем возраста или времени коллективного развития в популяции голодающих клеток [167].

Для формулировки замкнутой модели системы регуляции синтеза цАМФ мы вслед за авторами работы [176] вводим дополнительный динамический параметр R с характерной шкалой изменения порядка часов и эволюцией, описываемой уравнением

$$\partial R / \partial t = -\kappa(c) R. \quad (56)$$

Здесь, в соответствии со сказанным выше, подразумевается, что $\kappa(c)$ – возрастающая функция концентрации цАМФ.

Поскольку продуктом распада предшественника (R) является ингибитор (h), то

$$h = N(R_0 - R),$$

где N — число молекул ингибитора, порождаемых одной молекулой предшественника ($N \gg 1$). С учетом линейной убыли ингибитора (отток или инактивация) имеем для динамики h :

$$\partial h / \partial t = N\kappa(c)R - \kappa_h h. \quad (57)$$

Относительные масштабы времени эволюции h и R определяются величинами N и κ_h (величина κ_h^{-1} определяет продолжительность рефрактерного периода рэлейной активности амёб и составляет от двух до десяти минут). Тем самым $\tau_h \ll \tau_R$.

Замкнутое динамическое описание системы сигнализации получается добавлением к уравнениям (56), (57) уравнения автокаталитического воспроизводства цАМФ и его распада под действием гидролизующего фермента — фосфодиэстеразы. С учетом существования определенного порога активации АЦ (комплексом цАМФ-рецептор) и некоторого предельного уровня активности этого фермента [118] уравнение для концентрации c внеклеточного цАМФ можно записать в виде

$$\partial c / \partial t = b[f_0(R) + f(c, h)] - q(R)c + D_c \nabla^2 c. \quad (58)$$

Здесь f_0 — базальный, не зависящий от внешнего цАМФ, уровень активности АЦ (спонтанная активность), q — обратное время жизни внеклеточного цАМФ. Нелинейная функция производства и секреции цАМФ $f(c, h)$ имеет вид, представленный на рис. 17. Характерный масштаб времени динамики h определяется величиной q и составляет $\tau_c \sim 10$ с, т.е. $\tau_c \ll \tau_R$.

Уравнения (57), (58) описывают динамические режимы сигнализации в шкале времени с масштабом τ порядка минут. Параметр R в этих уравнениях и в данном масштабе времени исполняет роль управляющего — разным значениям R соответствуют различные относительные расположения нуль-изоклин на фазовой плоскости $\{c, h\}$. При этом по мере убывания R изменение ситуации на фазовой плоскости приводит к последовательной смене динамических режимов сигнальной системы: а) гомеостатическая регуляция с относительно низким уровнем цАМФ, б) состояние возбудимости (рэлейная активность), в) самоподдерживающиеся осцилляции цАМФ, г) гомеостатический режим с повышенным уровнем секретлируемого цАМФ (см. рис. 18). Как видно, имеет место такая же последовательность режимов генерации цАМФ, какая наблюдается в эксперименте (ср. с § III.1).

В полной системе, включающей уравнение эволюции управляющего параметра, (56)–(58), названная последовательность осуществляется без какого-либо внешнего управления — с ростом времени.

Качественное описание эволюции режимов точечной динамики системы сигнализации цАМФ, проведенное выше, не является оригинальным результатом данной работы (см. [176, 179]). Однако в цитированных работах осталось непроясненным следующее важное обстоятельство. Темп чередования режимов генерации цАМФ, т.е. темп развития, неоднороден в популяции клеток. Если в начале волновой стадии агрегации практически

все клетки находятся в режиме рэлейной активности, на стадии струйной агрегации заметная доля клеток ($\sim 10^{-2}$) становится автономным, ритмическим источником цАМФ [118]. В псевдоплазмодии эта доля не оценивалась, однако показано, что преспоровая область в целом секретирует цАМФ ритмически [173]. В то же время, по крайней мере, часть престолевых клеток секретирует цАМФ в непрерывном, монотонном режиме [173]. Это обстоятельство существенно и учитывалось нами при рассмотрении моделей струйной агрегации (§ III.4) и сортировки дифференцирующихся клеток в псевдоплазмодии (§ III.5, III.6).

В рамках расширенной модели (56)–(58) указанное нарушение однородности возникает само собой по следующей причине. В ходе крупномасштабной волновой агрегации нарушается однородность клеточного поля – в центре агрегационной территории повышается клеточная плотность. Это в силу (58) приводит к повышению среднего уровня концентрации цАМФ и согласно (56) к ускорению темпа эволюции параметра R . Соответственно клетки в этой области с опережением по отношению к клеткам на периферии агрегационной территории оказываются за порогом осцилляторной неустойчивости и переходят в режим автономной, ритмической секреции. Сформировавшийся таким образом перепад значений управляющего параметра R не устраняется в последующем развитии агрегата и проявляется в двух режимах секреции цАМФ – монотонном, непрерывном режиме, характерном для ПСТ-клеток, и ритмическом, присущем ПСП-клеткам (рис. 29).

Независимым доводом в пользу предполагаемой модели (56)–(58) обратной связи быстрой динамики концентраций c и h и медленной динамики параметра R , т.е. зависимости темпа эволюции R от c , могут служить известные данные об ускорении развития амёб с ростом исходной концентрации клеток [118]; более плотная популяция раньше переходит в режим крупномасштабной агрегации.

Полная динамическая модель для агрегационной фазы развития Dd содержит наряду с уравнениями сигнальной системы (57), (58) уравнение для поверхностной плотности клеток (см. § III.3):

$$\partial b / \partial t = -\operatorname{div} J_b; \quad J_b = \mu b \nabla c - D_b \nabla b. \quad (59)$$

После добавления к прежним уравнениям агрегационного поля (57)–(59) дополнительного, описывающего эволюцию управляющего параметра R , модель приобрела новое качество – историчность. Ею описывается больше, чем совокупность отдельных характерных режимов коллективного поведения клеток. Эти режимы закономерно сменяют друг друга в медленной шкале времени ($\tau_R \sim \kappa^{-1}(c)$). Время развития при этом материализуется в изменении параметра R .

Однако развитие Dd продолжается и после завершения агрегации амёб (§ III.1). Интерпретации характерных макроскопических событий пост-агрегационного развития были посвящены § III.5, III.6.

Из эксперимента мы знаем, что является триггером, включающим пост-агрегационную программу развития (ПАПР) клеток Dd . Это формирование специализированных контактных структур между клетками и уровень концентрации цАМФ – выше некоторого порога [152, 153]. Оба названных фактора в нормальном развитии являются производными

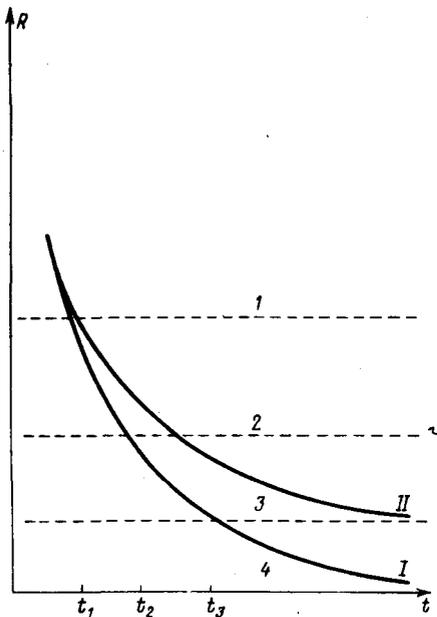
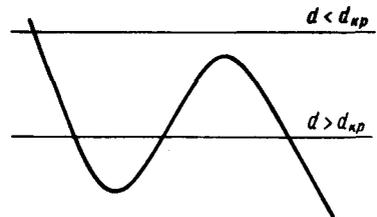


Рис. 29. Эволюция управляющего параметра R в двух областях агрегационного поля: I — ядро агрегационной территории, II — область вне ядра с пониженной клеточной плотностью. Интервалы значений R 1–4 соответствуют динамическим режимам a –2 системы сигнализации на рис. 18

Рис. 30. Вид функции контроля постагрегационной детерминации клеток $D. discoideum$ $f(a) + \alpha d - \beta n$. Компетентность к дивергенции клеточных типов соответствует бистабильности в динамике $a(t)$ и предполагает надкритический уровень управляющего параметра d



агрегационной фазы. Это позволяет сшить в единой модели агрегационные и постагрегационные режимы поведения клеток.

З а м е ч а н и е. Само включение ПАПР заведомо не может трактоваться как событие, контролируемое лишь на метаболическом уровне. Как уже отмечалось (§ III.1), этот переход вызывается существенными перестройками в спектре экспрессируемых генов. Мы не можем претендовать на сколько-нибудь полное и адекватное описание данного уровня регуляции. Однако, придерживаясь очень общей идеологии, выражаемой на языке феноменологического параметра порядка (§ III.5), мы можем включить в рассмотрение главную отличительную особенность ПАПР — дивергенцию клеточных типов в псевдоплазмодии. В соответствующих терминах единственным приобретением клеток агрегата является способность выбора одного из двух альтернативных состояний гомеостатического равновесия, т.е. ПСТ или ПСП — тип детерминации. Данной особенностью не обладают амебоидные клетки.

В рамках модели регуляции ПАПР, предложенной нами в § III.5, бистабильный режим динамики контрольного параметра детерминации a устанавливается только при надпороговом значении концентрации ДИФ. Тем самым превышение этого порога может рассматриваться как сигнал к переключению в постагрегационный режим развития и, наоборот, при $d < d_{кр}$ клетки дедифференцируются в амебоидное состояние (рис. 30).

Формально это можно трактовать следующим образом. Вводятся объемные концентрации амебоидных клеток b , престеблевых клеток p_1 , и преспоровых клеток p_2 . Уравнение движения для b с учетом сказанного имеет вид

$$\partial b / \partial t = -\kappa_1 \theta(d - d_{кр})b + \kappa_2 \theta(d_{кр} - d)(p_1 + p_2) + \text{div} J_b, \quad (60)$$

где членом $\text{div} J_b$ учитываются клеточные потоки $J_b = \mu b \nabla c - D_b \nabla b$. Переключение между двумя типами детерминации ПСТ и ПСП описывается уравнениями

$$\begin{aligned} \frac{\partial p_1}{\partial t} &= \theta(d - d_{\text{кр}}) [\kappa_3 p_2 \theta(a - a_0) - \kappa_4 p_1 \theta(a_0 - a)] - \\ &- \theta(d_{\text{кр}} - d) p_1 - \text{div} J_{p_1}, \end{aligned} \quad (61)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial p_2}{\partial t} &= \theta(d - d_{\text{кр}}) [\kappa_4 p_1 \theta(a_0 - a) - \kappa_3 p_2 \theta(a - a_0)] - \\ &- \theta(d_{\text{кр}} - d) p_2 - \text{div} J_{p_2}. \end{aligned}$$

Здесь a_0 — пороговый уровень параметра детерминации a , соответствующий переключению между ПСТ- и ПСП-типами (см. § III.5).

Далее, для формального выражения того факта, что переключение в ПАПР обуславливается высоким уровнем концентрации цАМФ (чем, как отмечалось выше, обеспечивается связь агрегационного и постагрегационного периодов развития Dd), в уравнение динамики (35) добавляется член $\theta(c - c_0)$. Таким образом, для $d(t)$ имеем

$$\frac{\partial d}{\partial t} = \frac{1}{\tau_d} [\kappa_d \theta(c - c_0) a + d_0(R) - d] + D_d \nabla^2 d. \quad (62)$$

Здесь c_0 — уровень цАМФ, который, как считается, достигается в агрегате (или добавлением экзогенного цАМФ в экспериментах с дисагрегированными клетками [155, 157]).

Для параметра контроля детерминации a и для концентрации второго из пары морфогенов NH_4^+ уравнения движения сохраняем в прежнем виде (см. § III.5):

$$\frac{\partial a}{\partial t} = \frac{1}{\tau_a} [\varphi(a) + \alpha d - \beta n] - a_i \text{div} J_i, \quad (63)$$

$$\frac{\partial n}{\partial t} = \frac{1}{\tau_n} [\kappa_n a - h] + D_n \nabla^2 n. \quad (64)$$

Здесь сумма в правой части представляет собой вклад от трех клеточных потоков J_b, J_{p_1}, J_{p_2} .

Далее, с учетом реальной иерархии временных масштабов (§ III.5)

$$\tau_n, \tau_d \ll \tau_a, \quad (65)$$

сохранения полного числа клеток

$$b + p_1 + p_2 = \text{const} = b_0 \quad (66)$$

и иерархии пространственных масштабов (§ III.5)

$$\tau_d D_d \ll L^2 \ll \tau_n D_n \quad (67)$$

система уравнений (60)–(64) может быть редуцирована. Во временной

шкале с масштабом $\tau \sim \tau_a$ интегрирование (62), (64) дает:

$$\tau_a a_t = [\varphi(a) + \alpha \tilde{d} - \gamma \langle a \rangle] - a_i \operatorname{div} J_i, \quad (68)$$

$$\tilde{d} = \int d_0(R(r)) \frac{1}{\rho} e^{-\frac{\rho}{Rd}} d\bar{\rho} + \theta(c - c_0) [\kappa_d a + R_a^2 \nabla^2 a].$$

Уравнения (61), (66) легко сводятся к одному — для концентрации ПСТ-клеток p_1 :

$$\begin{aligned} \frac{\partial p_1}{\partial t} = & \theta(d - d_{кр}) [\kappa_3(b_0 - p_1) \theta(a - a_0) - \\ & - \kappa_4 p_1 \theta(a_0 - a)] - \theta(d_{кр} - d) p_1 - \operatorname{div} J_{p_1}. \end{aligned} \quad (69)$$

Все изложенное выше резюмируем сводной системой уравнений:

$$R_t = -\kappa(c)R, \quad (70)$$

$$\dot{h}_t = N\kappa(c)R - \kappa_h h, \quad (71)$$

$$c_t = b[f_0(R) + f(c, h)] + f_1 p_1 - q(R)c + D_c \nabla^2 c, \quad (72)$$

$$b_t = -\kappa_1 \theta(\tilde{d} - d_{кр})b + \kappa_2 \theta(d_{кр} - d)(b_0 - b) - \operatorname{div} J_b, \quad (73)$$

$$a_t = \frac{1}{\tau_a} [\varphi(a) + \alpha \tilde{d} - \gamma \langle a \rangle] - \delta a \operatorname{div} J_{p_1}, \quad (74)$$

$$\begin{aligned} p_{1t} = & \theta(\tilde{d} - d_{кр}) [\kappa_1(b_0 - p_1) \theta(a - a_0) - \kappa_2 p_1 \theta(a_0 - a)] - \\ & - \theta(d_{кр} - \tilde{d}) p_1 - \operatorname{div} J_{p_1}, \end{aligned} \quad (75)$$

где

$$\tilde{d} = \int d_0(R(r)) \frac{1}{\rho} e^{-\frac{\rho}{Rd}} d\bar{\rho} + \theta(c - c_0) [\kappa_d a + R_a^2 \nabla^2 a];$$

$$d_0 < d_{кр} < d_0 + \kappa_d a.$$

По существу математическая модель (70)–(75) представляет собой объединение ряда более частных моделей, которые, как показал анализ в § III.3 – III.7, в совокупности позволяют обосновать все характерные режимы коллективного поведения клеток Dd от начала многоклеточного развития до формирования псевдоплазмодия. Объединение было достигнуто путем добавления эволюционного уравнения для управляющего параметра R и сопряжения агрегационной и постагрегационной фаз развития посредством введения зависимости динамики морфогена d от уровня концентрации цАМФ*).

*) Здесь уравнения для b и c обобщены по сравнению с соответствующими уравнениями на агрегационной фазе (58), (59) с учетом дифференциации клеток в агрегате. Подразумевается также, что в этих уравнениях должен быть сделан переход от поверхностных концентраций b и c к соответствующим объемным, когда b ($1/\text{см}^2$) становится больше соответствующей величины в монослое.

Прямое интегрирование системы динамических уравнений (70)–(75) требует привлечения таких средств вычислительной техники, которые автору недоступны. Однако качественное исследование поведения в рамках построенной модели провести можно. Из предыдущих параграфов данной главы мы уже имеем результаты анализа поведения для отдельных подсистем совокупной модели (70)–(75). Остается прояснить лишь, как "срабатывают" введенные здесь связи этих подсистем. Следующая ниже словесная схема дает качественный ответ на этот вопрос.

Начальные условия соответствуют однородной клеточной популяции $b \equiv b_0$, в которой значение R относительно велико, а f_0 – базальный уровень синтеза цАМФ – мало (см. рис. 29). В соответствии с уравнениями (71), (72) стационарный уровень h велик, а f_0 мал. Величины c и d ниже пороговых значений c_0 и $d_{кр}$ соответственно, так что уравнения (73)–(75) имеют стационарным решением

$$a = a_1, \quad p_1 = 0, \quad b = b_0. \quad (76)$$

С падением R согласно (70) растет величина f_0 (§ III.3), что приводит к спонтанному мелкомасштабному расслоению клеточного поля (см. (72), (73); § III.3). Далее, рост величины f_0 возвращает клеточное поле в допороговое гомогенное состояние (§ III.3).

Дальнейшее убывание R приводит к снижению уровня h , в результате чего сигнальная подсистема (71), (72) оказывается в ждущем режиме рэлейной активности (рис. 18б). Возбуждаются автоволновые режимы сигнализации и отслеживающие их режимы хемотактической активности. Формируются скопления клеток в центрах распространения волн аттрактанта и вытекающее отсюда расслоение клеток агрегационного поля по значению управляющего параметра (рис. 29). В рамках уравнений (72)–(74) формируется характерная картина струйной агрегации (§ III.4). С завершением аккумуляции клеток в центрах агрегационных территорий уровень c становится выше порогового c_0 , а \tilde{d} в соответствии с (75а) поднимается над порогом $d_{кр}$. В силу (74), (75) величины a и p_1 выводятся из состояния (76) – включается постагрегационная дивергенция клеточных типов и их пространственная сегрегация (§ III.5, III.6). Тем самым промежуточная цель коллективного развития *D. discoideum* – формирование псевдоплазмодия – достигнута.

Какой цели достигли мы в результате проведенного в настоящем параграфе рассмотрения? Построенной моделью (70)–(75) все наблюдаемые макроскопические события онтогенеза псевдоплазмодия *D. discoideum* связываются в единую цепь. Таким образом, уже не только отдельные макроскопические перестройки в коллективах клеток данного модельного многоклеточного организма, но и их закономерное чередование получают последовательное обоснование.

**САМООРГАНИЗАЦИЯ РАЗМЕТКИ
ПРИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ МОРФОГЕНЕЗАХ****§ IV.1. Универсальная разметка
морфогенетической активности эпителиев.
Активные деформации клеток
и упругие напряжения в эмбриональном материале**

Одним из ведущих формообразующих механизмов в эмбриогенезе являются деформации эпителиальных пластов: складки, выпячивания, изгибы и т.д. [1]. Данный тип морфогенетической активности характеризуется стандартной последовательностью более элементарных преобразований. Прежде всего осуществляется разметка — в эпителиальной ткани выделяется область, которой пока только предстоит проявить морфогенетическую активность. В этой области клеточный пласт заметно толще, чем в окружающих, за счет удлинения клеток в нормальном к пласту направлении морфологической поляризации (рис. 31). Затем следует активное движение именно этих клеток, которое и приводит к деформации пласта в целом [197].

Образование поляризованных клеточных доменов, постепенно обособляющихся от окружающих, тангенциально растягиваемых клеток, можно считать универсальным началом едва ли не всех морфогенезов многоклеточных животных. Наиболее типичные и общие примеры — образование зародышевых пятен, щитков или полосок при меробластических типах развития (например у насекомых); обособление поляризованных клеток презумптивной энтодермы перед началом и в процессе ее инвагинации от растягиваемой эктодермы [17]; поляризация клеток нервной пластинки перед началом нейруляции [17]; образование эктодермальных плакод органов чувств [199], апикальных гребешков парных конечностей и т.п.; поляризация клеток осевой мезодермы перед началом сомитогенеза [23] (см. рис. 32 с некоторыми из названных примеров).

Начальные условия выделения поляризованных доменов различны: в раннем развитии они могут быть связаны с актами ооплазматической сегрегации (бластула — гастрюла морского ежа), позже, как уже говорилось, — с индукторами. Важно, однако, отметить, что практически ни в одном случае начальные условия не предопределяют границ будущих доменов. В ряде случаев (почкование у асцидий и других видов) локальных начальных условий вообще не удастся обнаружить и можно говорить о "чистой" самоорганизации доменов [201].

Наши вопросы относятся именно к фазе вычленения областей поляризованных клеток. При этом мы будем интересоваться не столько причиной и механизмом деформации клеток, сколько координацией этой формы их активности. Почему, возникшая локально в определенном месте пласта, она распространяется далее, но лишь до вполне определенного предела? Могут ли деформации клеток сами организоваться в клеточной массе или эта организация подчинена специальному внешнему контролю? В соответствии с общим духом работы мы должны обосновать наблюдаемое

Рис. 31. Стандартная последовательность событий в процессе формирования на основе деформации зародышевого эпителия: *I* – начальное состояние, *II* – вычлнение домена колониобразных клеток – разметка морфогенетической активности, *III* – локальное выпячивание пласта

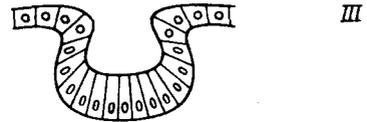
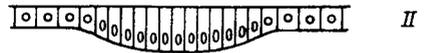
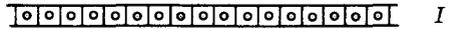
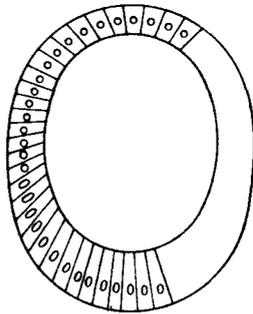
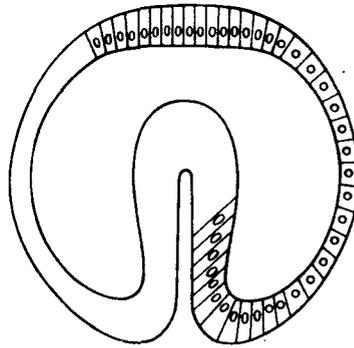


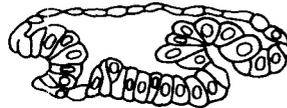
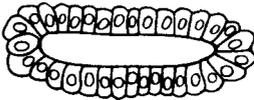
Рис. 32. Некоторые примеры формирования на основе локальных выпячиваний эпителиальных стенок: *I* – бластула и гастрולה морского ежа, *II* – раннее развитие наездника *Prestwichia aquatica* [200], *III* – участок брюшной эктодермы личинки мечехвоста *Limulus* с зачатками глаз [199]



I



II



III



формирование надклеточной упорядоченности в эмбриональном материале, исходя из его более элементарных свойств.

Ниже дается небольшой обзор экспериментальных сведений на этот счет.

1. Поляризация эмбриональных клеток – активный процесс, требующий затрат метаболической энергии. Экспериментально поляризация клеток в ткани индуцируется при нарушении механического равновесия в интактном зародыше путем рассечения ткани или эксплантации ее фрагментов [202, 203]. Подобные операции вызывают *активные* деформации

эмбрионального материала, в ходе которых изменяется форма отдельных клеток, так что увеличивается площадь межклеточных контактов на участках поверхности фрагментов [204].

Деформации этой категории характеризуются латентным периодом порядка минут и полностью подавляются при угнетении метаболизма — понижении температуры, добавлении ингибиторов АТФ или цианида [202]. На этом основании их относят к категории активных, т.е. связанных с выполнением работы (растяжения клеточной поверхности в выделенном направлении) [202]. Из анализа гистологических препаратов следует, что описанные деформации клеток сопровождаются не только деформацией клеточной мембраны, но и более глубокими перестройками всего цитоскелета [205, 206] (рис. 33).

2. Поляризация клетки — переход типа "все или ничего". Достаточно полное феноменологическое описание активной деформации клеток получено в экспериментах с культурами клеток, высеваемыми на пассивную твердую (пластик, стекло) поверхность (см. в качестве обзора [95]). Большинство видов эмбриональных клеток при этом формирует прочный, адгезионный контакт с поверхностью.

Адгезия клетки к подложке не есть простое прилипание, но активный "процесс псевдоподиального прикрепления", сопровождающийся деформацией клетки, подобной ее деформации в эпителиальном пласте. Заметим, что и для клеток эпителия вытягивание и сплющивание сопровождается появлением более плотных и протяженных областей их взаимного контакта [205].

В литературе представлена обширная экспериментальная информация о реорганизации цитоскелета, сопровождающей распластывание и адгезию клеток (см. в качестве обзоров [95, 16]). Однако эта информация пока не внесла достаточную ясность в понимание активного поведения клетки. Вопрос о силах, заставляющих клетку распластываться по подложке, остается неясным. Но некоторые сведения, касающиеся общего характера процесса, необходимые и достаточные для нас на данном этапе, получить удается.

Важно, что процесс распластывания имеет характерные черты перехода типа "все или ничего". Если говорить лишь об устойчивых состояниях, а не о промежуточных нестабильных формах, то их для клетки два: шарообразное без адгезии и распластанное с насыщающей адгезией [95]. При различных вариациях условий взаимодействия клетки с подложкой в эксперименте (например, при изменении плотности мест связывания на подложке [207]), не нарушающих внутренней организации клетки, в качестве асимптотического всегда обнаруживается одно из двух названных альтернативных состояний. Данные исследования кинетики распластывания указывают на существование определенного периода задержки (~ 5 мин) в состоянии без адгезии [207]. По истечении этого лаг-периода процесс прикрепления протекает кооперативно.

Названные факты нетривиальны, поскольку молекул, ответственных за адгезию на клеточной поверхности (различные классы гликопротеинов), вполне макроскопическое количество (порядка 10^7) [209]. При этом до образования связи с подложкой молекулы адгезии относи-

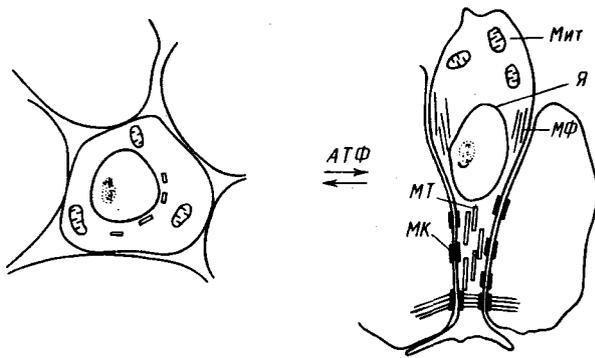
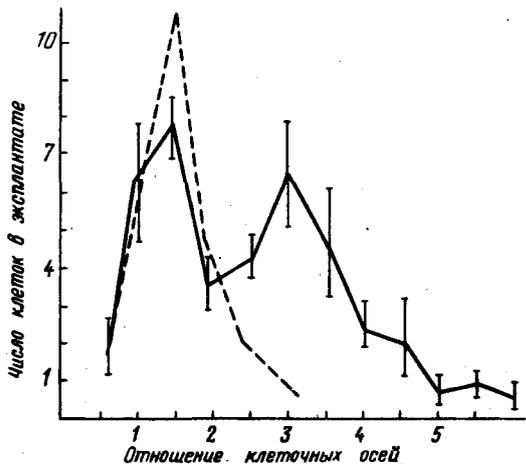


Рис. 33. Ультраструктурные перестройки при активной морфологической поляризации зародышевой клетки: *МФ* – микрофиламенты, *МТ* – микротрубочки, *МК* – специализированные структуры межклеточных контактов, *Я* – ядро, *Мит* – митохондрии

Рис. 34. Распределение клеток по степени морфологической поляризации в эксплантате индуцированной (сплошная линия) и неиндуцированной (штриховая линия) эктодермы [208]



тельно свободно и независимо друг от друга диффундируют в плоскости мембраны (коэффициент диффузии порядка 10^{-9} см²/с [210]). Исходя из этого можно было бы ожидать практически непрерывного набора состояний прикрепления клетки. В действительности их нет.

Таким образом, обсуждаемое поведение клетки представляет собой фазовый переход (типа первого рода) – кооперативную смену макроскопического состояния. Природой этого перехода только начинают интересоваться (см. например работы [211, 212]). Факт такого перехода, независимо от понимания его механизма, позволяет приписать клетке на подложке *два альтернативных, существующих в одних и тех же условиях и устойчивых, по крайней мере в малом, состояния*. Поскольку переходы между этими состояниями связаны с деформацией клетки, можно говорить о присущей ей механической активности.

.. Нетривиальность морфологической поляризации проявляется еще и в том, что соответствующая способность в эмбриональном материале возникает и сохраняется только в определенные, ограниченные интервалы развития (рис. 34). При этом данную способность приобретает большое количество клеток, в том числе и те, которые в норме никогда не поля-

ризируются. Так, у морского ежа могут поляризоваться все клетки зародыша в эксперименте на стадии бластулы — гастролы [213], а поляризуется в норме лишь вегетативная часть бластулы. В зародышах амфибий на стадиях нейрулы и ранней хвостовой почки способны к поляризации практически все клетки, но эта способность проявляется лишь в опытах по эксплантации [202, 214].

3. Упругие напряжения в эмбриональном материале. В опытах по эксплантации, проводившихся в условиях, когда исключены активные механо-химические процессы, типа описанных выше, выявлена дополнительная категория деформаций [202, 203]. Эти деформации можно считать *пассивными*. Для них характерно отсутствие латентного периода — они обнаруживаются немедленно после нарушения интактности эмбрионального материала.

Пассивные деформации отражают наличие предсуществующих в интактной ткани упругих механических напряжений [202]. Помимо механической упругости клеточной мембраны вместе с прилегающим кортикальным цитоскелетом ее внешним носителем является специальная форма внеклеточного матрикса, общая для ряда эпителиев — базальная ламина [16]. Ей, а также специализированным структурам межклеточных контактов (типа адгезионных или плотных [16]) обязаны когерентные свойства эпителиальной ткани. Пассивные, мгновенные деформации эмбрионального материала являются именно таким свойством.

4. Упругие напряжения порождаются активными деформациями эмбриональных клеток [216]. Если изолировать фрагмент эмбриональной ткани, предсуществующие механические напряжения в нем немедленно релаксируют. Однако со временем (порядка получаса) такой же процедурой рассечения, как в предыдущем случае, их вновь регистрируют [216]. Эта повторная генерация напряжений сопряжена с появлением в массе клеток ограниченного числа морфологически поляризованных. Разумеется, в отличие от пассивного сброса напряжений, их повторная генерация — процесс активный, т.е. АТФ-зависимый [202].

Насколько реально считать источником появления напряжений в эмбриональном материале обсуждающуюся активную деформацию клеток? Снова адресуем этот вопрос к экспериментам с одиночными клетками на подложке.

Давно установлено, что вслед за прикреплением к твердой поверхности многие виды эмбриональных клеток начинают активно перемещаться. Уже отсюда ясно, что клетки при взаимодействии с подложкой должны вызывать в ней неоднородные напряжения. Однако, к удивлению многих, выяснилось, что мощность развиваемого при этом усилия на несколько порядков превосходит потребляемую собственно для движения [91].

Предоставив клетке в качестве подложки тонкую резиновую пленку, в ней обнаружили систему радиальных морщин, указывающих на значительные натяжения, развиваемые расплывающейся клеткой. Оценка силы натяжения составила около 10^{-2} дин на клетку, причем эта величина не коррелирует со степенью двигательной активности [91]. Вероятно, столь большие напряжения необходимы для самого процесса расплывания, т.е. для преодоления поверхностного натяжения и упругого сопротивления клетки.

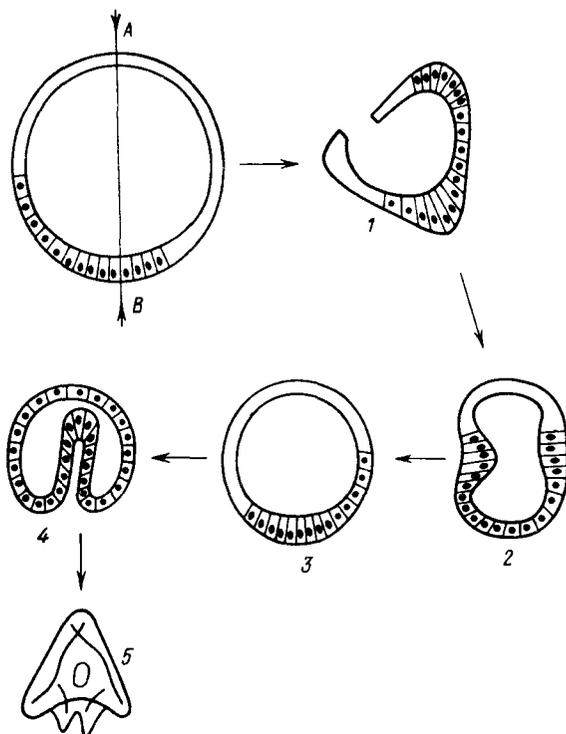


Рис. 35. Схема процесса регенерации при меридиональном рассечении бластулы морского ежа [213]: 1, 2 – переменная фаза регенерации: признаки дальнего порядка отсутствуют, 3, 5 – после “осферивания” зародыша процесс клеточной поляризации приобретает черты дальнего порядка и дает устойчивый, эквивалентный результат

В эмбриональном материале подложкой для поляризующейся клетки служат окружающие. При этом фактор генерируемых упругих натяжений в принципе способен играть роль дальнодействующей сигнализации: механическую активность данной клетки должны “почувствовать” другие – на значительном расстоянии от нее. Подобное “дальнодействие”, как не раз отмечалось в данной работе, является одной из наиболее общих предпосылок самоорганизации макроскопического порядка. Более конкретно, можно утверждать то, о чем говорится в следующем пункте.

5. Упругие натяжения контролируют “дальний” порядок активной поляризации клеток в массе. Наличие “дального” порядка – главная отличительная черта интактной эмбриональной ткани по сравнению с тканью, целостность которой нарушена. В стенке бластулы морского ежа поляризованы клетки в пределах зоны (вегетативная пластинка) с детерминированным местоположением и фиксированными границами. Наличие глобального контроля внутриклеточных процессов проявляется здесь в подавлении поляризации способных к этому клеток боковых стенок.

При нарушении целостности зародыша простым местным рассечением упругие напряжения в нем релаксируют, и при этом он лишается всяких

признаков пространственного порядка. Вместо стандартного расчленения на компартменты обнаруживают хаос клеточных деформаций (рис. 35). С восстановлением целостности в ходе процесса регенерации восстанавливается и исходный тип организации [213].

На счет глобальной регуляции клеточных процессов относится и свойство "размерной инвариантности" развития зародыша — его способность сохранять пропорции частей при вариации размеров целого. Подробнее об этом будет специальный разговор в своем месте.

6. Ближние взаимодействия клеток. Контактная поляризация. Хаотичность клеточной поляризации в ткани без натяжений (п. 5) проявляется лишь в относительной независимости поведения удаленных друг от друга клеток. Но ближние корреляции механической активности при этом не нарушаются: соседние клетки преимущественно сохраняют однотипное состояние — деформированное или недеформированное.

Вообще, в массе эмбрионального материала никогда не встречаются одиночные поляризованные клетки, но всегда — целые группы соседних.

За данную кооперативность механической активности клеток в коллективе ответственны контактные межклеточные взаимодействия, такие, что уже поляризовавшиеся клетки индуцируют к поляризации своих ближайших соседей. Это так называемая контактная поляризация клеток [205, 217].

Процессы, аналогичные или полностью соответствующие контактной поляризации клеток, описаны также на культурах клеток [218, 95]. И здесь ближние взаимодействия обеспечивают ближнюю корреляцию направлений осей морфологической поляризации распластанных клеток. При этом установлено, что существенной, необходимой чертой таких ближних взаимодействий является межклеточная адгезия [219].

Наглядная демонстрация явления контактной поляризации представлена в экспериментах по трансплантации [214]. При подсадке к фрагменту зародышевого материала в норме неполяризующегося (брюшная часть зародыша) эксплантата поляризованной ткани (из спинной части) наблюдается распространение фронта контактной поляризации по исходно неполяризованной клеточной массе [214]. Характерная скорость такого распространения, зарегистрированная не только в данном эксперименте (см. [208]), составляет 5–10 мкм/мин (рис. 36).

Резюме. Резюмируем представленные фактические сведения сводкой важных для дальнейшего выводов.

1. Индивидуальные клетки зародышевых эпителиев в период их морфогенетической активности обладают механической активностью. За счет метаболической энергии они способны самопроизвольно деформироваться, обладая двумя дискретными, устойчивыми в малом формами: изотропной и морфологически поляризованной в направлении, нормальном к пласти.

2. Клеточный материал эпителиальной ткани, рассматриваемый как сплошная среда, обладает чисто механической пассивной упругостью.

3. Механическая активность данной клетки в ткани подвержена контактному влиянию со стороны соседних. Контактные взаимодействия обеспечивают кооперативность поляризации клеток.

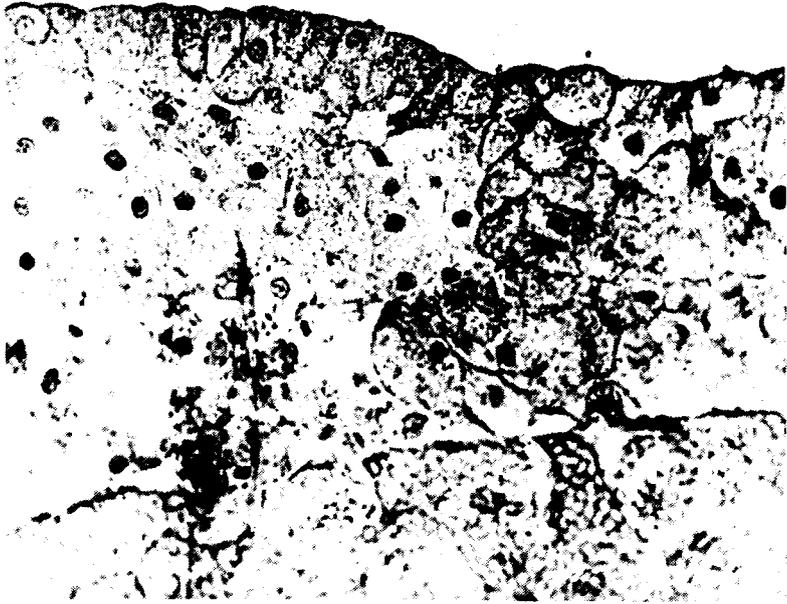


Рис. 36. Распространение фронта контактной поляризации клеток (стрелка) от ранее поляризованной ткани (нейроэктодерма лягушки *Rana temporaria* – более темная – справа) в ткани, никогда не поляризующейся в естественном развитии (вентральная эктодерма зародыша *Xenopus* – более светлая). Стадия ранней нейрулы. Фото Л.В. Белоусова (МГУ)

Выделенные свойства клеточного материала сами по себе не элементарны. Обуславливающие их субклеточные механизмы, по всей видимости, достаточно сложны. И все же, когда ставится вопрос об организации групповой активности клеток в зародышевой ткани, эти свойства могут рассматриваться как элементарные. Именно на их основе с помощью теоретической модели мы попытаемся обосновать наблюдаемое формирование макроскопической упорядоченности поляризации клеток в эпителии.

§ IV.2. Самоорганизация разметки морфогенетической активности. Теоретическая модель [216, 220]

а) Качественное описание модели [221]. Представим эпителиальный пласт в виде одномерной цепочки сцепленных клеток. Пусть, дл. начала, границы цепочки закреплены и остаются неподвижными при деформациях внутренних клеток. Это условие вводится в связи с упоминавшимся экспериментальным фактом: при появлении свободных краев у эпителия дальний порядок в нем исчезает.

Каждая клетка рассматривается как упругий элемент, релаксированное состояние которого соответствует изотропной форме. Клетки пласта, кроме того, обладают механической активностью: наряду с изотропным состоянием альтернативным устойчивым состоянием является морфологически поляризованное, в котором клетки вытянуты перпендикулярно пласту и сжаты в касательном направлении.

Пусть в исходном состоянии все клетки изотропны; тем самым упругие напряжения в пласте отсутствуют. Убедимся в способности к коллективному отклику данной системы, сопровождающемуся понижением симметрии макроскопического состояния, в ответ на достаточно произвольный внешний стимул.

Пусть каким-либо внешним воздействием вызвано зарождение локального очага клеточной поляризации. Дальнейшая эволюция состояния определяется двумя факторами. Во-первых, поляризованные клетки оказывают близкодествующее стимулирующее влияние — контактная поляризация — на соседние неполяризованные. Во-вторых, в результате растяжения упругого пласта вне области поляризации возникает далекодействующий эффект противоположного знака. Упругие натяжения должны препятствовать распространению клеточной поляризации, поскольку клеткам, сжимаясь (при поляризации), приходится совершать дополнительную механическую работу.

Пока поляризация охватывает небольшую часть клеток, натяжения, а вместе с ними и второй из двух названных эффектов, невелики. При этом очаг поляризации расширяется. Параллельно нарастают натяжения перед распространяющимся фронтом. Достигнув определенного значения, эти натяжения должны остановить фронт поляризации. Таким образом формируется бинарное расслоение пласта (рис. 37).

Необходимо решить вопрос об устойчивости данной структуры по отношению к малым внешним возмущениям (асимптотическая устойчивость), а также ее чувствительности к вариации начальных условий зарождения. Необходимо установить также внешние параметры, управляющие пропорциями структуры доменного членения, и, в частности, в связи с общей проблемой эмбриональных регуляций, зависимость этих пропорций от линейных размеров пласта.

Эти вопросы мы исследуем далее с помощью формальной феноменологической модели [216].

б) М а т е м а т и ч е с к о е о п и с а н и е м о д е л и. В предлагаемой динамической модели формально учитываются выделенные выше свойства эмбрионального эпителия. При этом модель, как уже отмечалось, имеет феноменологический характер, т.е. не опирается на какой-либо конкретный внутриклеточный механизм морфологической поляризации. Механическая активность клеток интерпретируется в достаточно общем виде следующим образом.

Вводится динамический параметр p , имеющий смысл меры поляризации. В изотропном состоянии клетки $p = 0$, в морфологически поляризованном в направлении, перпендикулярном пласту, $p > 0$.

Реально процесс поляризации определяется, вероятно, многими физическими и биохимическими параметрами клетки. О них нам пока известно очень мало. В чисто феноменологическом описании мы постулируем подоб-

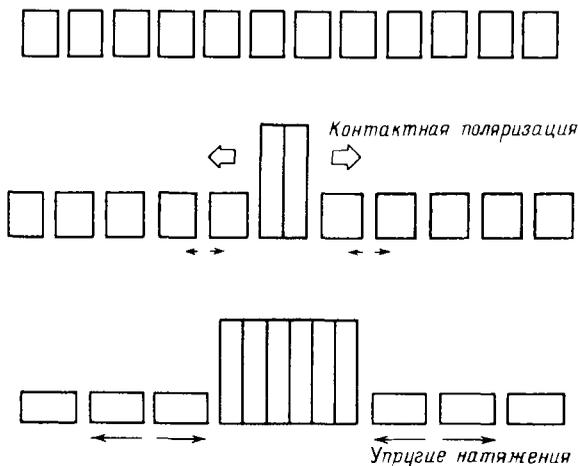
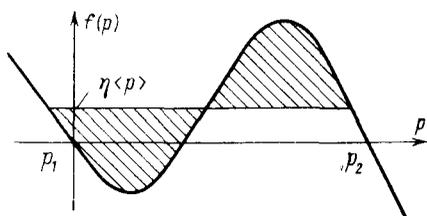


Рис. 37. Иллюстрация к механизму самоограничения расширяющейся зоны клеточной поляризации за счет нарастающих упругих натяжений

Рис. 38. Графическое определение параметров p_1 , p_2 , $\langle p \rangle$ доменной структуры клеточной поляризации $\bar{p}(x)$ для стационарного решения уравнения (8)



но тому, как это делается в феноменологической теории критических явлений, а именно — выделяем один эффективный параметр (параметр порядка) p . Этот параметр описывает темп-лимитирующую степень свободы, вообще говоря, сложной внутриклеточной динамики, обуславливающей механическую активность клетки.

Уравнение движения параметра p для i -й клетки в одномерной цепочке, в общем виде учитывающее относительную стабильность двух дискретных форм клетки и ее контактные взаимодействия в пласте, выглядит следующим образом:

$$\dot{p}_i = \frac{1}{\tau} f(p_i) + \varphi(p_i - p_{i-1}) + \varphi(p_i - p_{i+1}). \quad (1)$$

Здесь сам по себе факт бистабильности выражается в характерной И-образной форме нелинейной зависимости $f(p)$, использовавшейся нами и ранее в данной работе (рис. 38). Учет контактных взаимодействий в форме (1) подразумевает, что функция φ обращается в нуль при нулевом значении аргумента, $\varphi(0) = 0$. Иными словами, если соседние клетки поляризованы в равной мере, они не оказывают взаимного поляризующего или деполаризующего влияния.

Ниже мы будем иметь дело с относительно гладкими распределениями p_i . Это позволяет считать величины $p_i - p_{i \pm 1}$ относительно малыми и ограничиться линейным приближением для функции $\varphi(p_i - p_{i \pm 1})$ (не

имеющей, как полагается, особенностей в нуле). На том же основании мы можем перейти от дискретной переменной к непрерывной координате x : $i = \left[\frac{x}{d_{\text{кл}}} \right]$. В результате получим вместо (1):

$$\frac{\partial p}{\partial t} = \frac{1}{\tau} f(p) + D \frac{\partial^2 p}{\partial x^2}; \quad D = d_{\text{кл}}^2 \left. \frac{d\varphi}{dz} \right|_0. \quad (2)$$

Здесь появившийся новый параметр D имеет смысл коэффициента переноса поляризации.

Далее, в уравнении движения для $p(x, t)$ следует учесть эффект пассивных упругих напряжений. Этот эффект состоит в том, что касательные натяжения должны препятствовать нормальной поляризации клетки, повышая механическую энергию поляризованного состояния, а сжатие, напротив, способствовать ей. Такой эффект формально выражается добавлением в уравнение (2) слагаемого, пропорционального величине касательного напряжения $\sigma = \sigma^{\text{акт}} + \sigma^{\text{упр}}$:

$$\frac{\partial p}{\partial t} = \frac{1}{\tau} f(p) + D \frac{\partial^2 p}{\partial x^2} - \kappa \sigma. \quad (3)$$

Здесь, как обычно, считается, что положительному значению $\sigma^{\text{упр}}$ соответствует упругое натяжение, а отрицательному — сжатие.

Величина σ не является независимым параметром, поскольку упругие напряжения сами возникают как результат активной деформации поляризующихся клеток (см. предыдущий параграф). В первом приближении активное деформирующее напряжение можно принять пропорциональным степени поляризации $\sigma^{\text{акт}} = \epsilon p$. При этом нормальная поляризация, при которой клетка сокращается в касательном к пласту направлении, является источником сжимающего усилия. Пассивная упругая реакция на это усилие — величина $\sigma^{\text{упр}}$ — должна быть найдена из условия механического равновесия. Как отмечалось выше (п. 3 предыдущего параграфа), релаксация к этому равновесию — процесс мгновенный в масштабе времени поляризации. Соответственно динамической переменной настоящей модели является только выделенный параметр внутриклеточной динамики p , а величина упругого напряжения $\sigma^{\text{упр}}$ — ведомый равновесный параметр.

Локальная форма условия механического равновесия для задачи с единственным пространственным измерением представляет собой условие отсутствия суммарной силы, складывающейся из пассивной упругой составляющей $d\sigma^{\text{упр}}/dx$ и активной деформирующей силы. В рассматриваемом линейном приближении (см. предыдущий абзац) последняя выражается в виде $\sigma^{\text{акт}} = \epsilon p$; $f_{\text{акт}} = \epsilon dp/dx$. Таким образом, имеем в качестве условия механического равновесия [222]

$$\epsilon \frac{dp}{dx} + \frac{d\sigma^{\text{упр}}}{dx} = 0. \quad (4)$$

Граничные условия для параметра p везде ниже будут считаться единственными и соответствующими требованию отсутствия потоков клеточной

поляризации на краях пласта:

$$\left. \frac{dp}{dx} \right|_{0,L} = 0. \quad (5)$$

Для второго параметра задачи (3), (4) — $\sigma^{упр}$ — мы рассмотрим несколько вариантов краевых условий, а именно: 1) жестко закрепленные границы пласта, 2) они же свободные и 3) промежуточный случай упругого закрепления границ.

При условии *жесткого* закрепления существенна лишь неизменность общего размера, поскольку в уравнениях (3), (4) величина $\sigma^{упр}$ определяется лишь относительными смещениями точек x пласта. Обозначая продольное смещение точки с координатой x как $u(x)$, выразим условие неизменности общего размера в виде

$$\Delta u = u(L) - u(0) = 0. \quad (6)$$

Связь величины $u(x)$ с упругим напряжением $\sigma^{упр}$ задается законом Гука

$$\sigma^{упр} = E du/dx. \quad (7)$$

Далее, уравнение (4) интегрируется с учетом (6), (7), и результат для $\sigma(x)$ подставляется в уравнение (3). В итоге приходим к замкнутому описанию эволюции распределения $p(x, t)$ в виде

$$\frac{\partial p}{\partial t} = \frac{1}{\tau} f(p) + D \frac{\partial^2 p}{\partial x^2} - \kappa \epsilon \langle p \rangle. \quad (8)$$

Здесь $\langle p \rangle$ обозначает среднее по длине пласта:

$$\langle p \rangle = \frac{1}{L} \int_0^L p dx.$$

Весьма существенной чертой динамики p является эффективное дальное действие (член $\langle p \rangle$ в уравнении (8)). К нему привела чисто упругая — когерентная — реакция на локальные процессы активной деформации клеток. Именно это дальное действие и является источником *глобального контроля внутриклеточных процессов* в пласте.

в) **Анализ поведения [216].** В исходном состоянии пласта, по предположению, поляризация и упругие напряжения отсутствуют:

$$p \equiv 0, \quad \sigma \equiv 0. \quad (9)$$

Данное состояние удовлетворяет условию стационарности $p_t = 0$, поскольку значение $p = 0$ является одной из трех нулевых точек функции $f(p)$ (см. рис. 38).

Вопрос об условиях самопроизвольного расчленения пласта на поляризованные и неполяризованные зоны упирается в исследование стабильности гомогенного неполяризованного состояния (ГНС). Более узкий вопрос об асимптотической устойчивости ГНС решается аналитически.

Для малых по амплитуде возмущений ГНС линейное приближение уравнения (8) имеет вид

$$y_t = \frac{1}{\tau} \alpha y + D y_{xx} - \kappa \epsilon \langle y \rangle, \quad (10)$$

где

$$\alpha = \left. \frac{df}{dp} \right|_0, \quad y = \delta p = p(x, t) - \bar{p}.$$

Граничным условиям (5) удовлетворяет набор косинусоидальных мод

$$y_n = e^{\lambda n t} \cos(n\pi x/L). \quad (11)$$

Общая зависимость декремента λ от волнового числа k_n легко находится после подстановки выражения (11) в уравнение (10). Заметим при этом, что для всех нетривиальных мод с $n \neq 0$ слагаемое $\langle y_n \rangle$ в уравнении (10) отсутствует. Поэтому имеем

$$\begin{aligned} \lambda_n &= \alpha/\tau - D\pi^2 n^2/L^2, \quad n \geq 1; \\ \lambda_0 &= \alpha/\tau - \epsilon k. \end{aligned} \quad (12)$$

Среди неоднородных возмущений y_n наивысшим временным показателем λ обладает первая гармоника — косинусоидальная полуволна. Исходное состояние $\bar{p} = 0$ становится неустойчивым по отношению к этой моде возмущений при условии

$$\mu = \alpha/\tau - D\pi^2/L^2. \quad (13)$$

Совокупный параметр μ можно рассматривать как бифуркационный параметр.

Далее, важно выяснить характер неустойчивости, а именно — “мягкая” она или “жесткая”. От этого зависит, следует ли ожидать новых режимов лишь за порогом потери асимптотической устойчивости (мягкая бифуркация) или имеется область параметров, в которой сосуществуют альтернативные устойчивые режимы: исходный — ГНС — и новый, представляющий собой нетривиальное решение уравнения (8). Иными словами, необходимо выяснить, закритическая или докритическая бифуркация асимптотических состояний сопровождается потерю линейной устойчивости ГНС.

Этот вопрос уже не может быть решен в рамках линейного приближения (10) и должен рассматриваться с учетом нелинейности функции $f(p)$.

Существенной информацией о функции $f(p)$ является лишь ее И-образный вид, обеспечивающий бистабильный характер внутриклеточной динамики. Для большей определенности будем аппроксимировать требуемые качественные свойства этой функции с помощью кубической параболы:

$$f(p) = \alpha p + \beta p^2 - \gamma p^3. \quad (14)$$

Здесь коэффициенты β и γ считаются положительными, а знаки при p^2 и p^3 продиктованы требованием И-образности.

Наличие квадратичного слагаемого в (14) должно вызвать примешивание к ведущей неустойчивой моде $n = 1$ второй гармоники $n = 2$. Поэтому и, ограничиваясь двухмодовым приближением, ищем решение в виде суперпозиции:

$$p = C_1(t) \cos \frac{\pi x}{L} + C_2(t) \cos \frac{2\pi x}{L}. \quad (15)$$

После подстановки (15) в уравнение (8) с учетом (14), получаем систему

обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка по времени относительно амплитуд:

$$\dot{C}_1 = \mu C_1 + \beta C_1 C_2 - \frac{3}{4} \gamma (C_1^3 + 2C_1 C_2^2), \quad (16)$$

$$\dot{C}_2 = \left(\mu - \frac{D\pi^2}{L^2} \right) C_2 + \frac{\beta C_1^2}{2} - \frac{3}{4} \gamma (C_2^3 + 2C_1^2 C_2).$$

Далее, необходимо исследовать характер ее стационарных решений $\dot{C}_1 = \dot{C}_2 = 0$ вблизи критической точки $\mu = 0$.

Для нетривиальных стационарных значений $\bar{C}_1, \bar{C}_2 \neq 0$, малых вблизи порога неустойчивости $\mu = 0$, без труда находим

$$\bar{C}_2 \approx -\frac{\beta}{3\gamma} \mu \left(\mu - \frac{D\pi^2}{L^2} + \frac{2\beta^2}{3\gamma} \right)^{-1}, \quad (17a)$$

$$\bar{C}_1 \approx -\frac{2}{\beta} \left(\mu - \frac{D\pi^2}{L^2} \right) \bar{C}_2. \quad (17b)$$

Если полный размер пласта L не слишком мал, так что $D\pi^2/L^2 < 2\beta^2/3\gamma$, то выражение в круглых скобках (17a) положительно, величина $\mu - D\pi^2/L^2$ в окрестности критической точки $\mu = 0$ отрицательна. Тогда из выражения (17b) следует существование найденного стационарного решения (17) при $\mu < 0$, т.е. до порога асимптотической неустойчивости ГНС. Таким образом, имеем докритическую бифуркацию в точке $\mu = 0$, а отсюда автоматически следует, что стационарное решение (17) неустойчиво [185].

Если, как в нашем случае, при потере устойчивости одного стационарного решения: а) не ответвляется непрерывным образом другое – асимптотически устойчивое, б) не возникают устойчивые осцилляции (в данном случае они исключены в силу первого порядка системы (16) по времени) и в) невозможен уход значений p к бесконечности (в силу отрицательного кубического члена), то непременно в системе (16) должно существовать стабильное состояние, не являющееся продуктом бифуркации исходного решения. Для этого второго состояния порог стабильности ГНС не является критической точкой – оно должно быть стабильно по обе стороны от нее. Таким образом, должна существовать область параметров, где оба состояния могут реализоваться как альтернативные стабильные режимы. Здесь ситуация такая же, как при равновесном фазовом переходе первого рода.

Интересующее нас сейчас устойчивое неоднородное распределение $\bar{p}(x)$, являющееся стационарным режимом динамики (8), т.е. решением уравнения

$$f(\bar{p}) + D\bar{p}_{xx} - \kappa \epsilon(\bar{p}) = 0, \quad (18)$$

не может быть исследовано методом бифуркационного анализа. Но это не мешает нам получить необходимые сведения о данном распределении.

Бистабильность в локальной динамике плюс фактор кооперативности (два первых члена уравнения (8)), как известно, задают асимптотические состояния типа доменных стенок (ДС). Однако без дополнительных далекодействующих механизмов устойчивого местоположения такой стен-

ки не получается. Без таких механизмов ДС движется с постоянной скоростью в том или ином направлении в зависимости от знака интеграла $\int f(p) dp$ [223]. В случае, когда этот интеграл равен нулю, хотя скорость стационарного перемещения ДС также равна нулю, любое ее местоположение является безразличным равновесием.

Убедимся, что фактор дальнего действия $\langle p \rangle$ является достаточным для фиксации ДС.

Состояние с единственной доменной стенкой, удаленной от границ отрезка $0, L$ на расстояния, существенно превосходящие ширину стенки δ ,

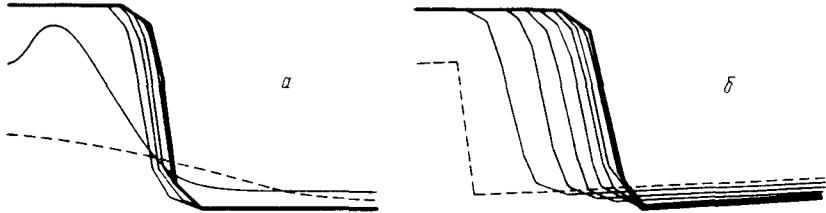


Рис. 39. Формирование асимптотической структуры бинарного членения пласта в области неустойчивости исходного, неполяризованного состояния при двух начальных функциях $p(x, 0)$ (штриховая линия). По вертикали — p , по горизонтали — x ; параметры: $D = 5 \cdot 10^{-3}$, $\tau = 5 \cdot 10^{-2}$; $f = 0,5p + 15p^2 - 10p^3$; $\kappa\epsilon = 5$

характеризуется значениями параметра p в двух доменах, p_1 и p_2 , и координатой ДС (см. рис. 39а). Для произвольной И-образной функции $f(p)$ указанные характеристики могут быть найдены следующим образом.

К граничным условиям (5) добавляются дополнительные:

$$\bar{p}_{xx} \big|_{0, L} = 0, \quad (19)$$

диктуемые требованием гомогенности распределения $\bar{p}(x)$ в пределах доменов. При данных условиях вблизи границ должно выполняться равенство

$$f(\bar{p}) = \kappa\epsilon \langle \bar{p} \rangle. \quad (20)$$

Считая здесь $\kappa\epsilon \langle \bar{p} \rangle$ пока неопределенным параметром $\kappa\epsilon \langle \bar{p} \rangle = c$, мы можем представить это равенство графически (см. рис. 38). Точки пересечения прямой $y = c$ с падающими ветвями кривой $f(p)$ задают значения p_1 и p_2 параметра p в доменах.

Далее определяется константа c (т.е. $\langle p \rangle$). Первый интеграл уравнения (18) вместе с граничными условиями (5) дают равенство

$$\Delta U = c \Delta p, \quad (21)$$

где

$$\Delta U = \int_{p_1}^{p_2} f(p) dp, \quad \Delta p = p_2 - p_1.$$

На графике рис. 38 этому равенству соответствует условие равенства заштрихованных площадей. Очевидно, этим условием константа c однозначно определена.

С найденными величинами p_1, p_2 и $\langle p \rangle$ из равенства

$$\langle p \rangle \approx p_1 + \Delta p \cdot x \quad (x = l/L)$$

и (21) определяется размер поляризованного домена l :

$$l/L = \Delta U / [\kappa \epsilon (\Delta p)^2]. \quad (22)$$

Сразу укажем на важное свойство структуры доменного членения — его размерную инвариантность. Внутренние пропорции этой структуры (отношение размеров доменов $l/(L - l)$) инвариантны при изменении общего размера L . Это свойство заслуживает специального внимания, поскольку имеет прямое отношение к проблеме эмбриональных регуляций. Соответствующее более детальное обсуждение будет представлено ниже.

г) Асимптотическая устойчивость бинарного доменного членения. Уравнение, описывающее эволюцию малых отклонений от найденного стационарного профиля $\bar{p}(x)$, имеет прежний вид (10) с тем лишь отличием, что в первом слагаемом коэффициент α теперь зависит от x . Исследование асимптотической устойчивости мы проведем по той же логической схеме, которая использовалась в § П.2.

Вывод об устойчивости будет обоснован, если удастся показать, что для любой функции $\Psi(x)$, совместной с граничными условиями (5), интеграл

$$\int \Psi^2 dx,$$

временная эволюция которого оценивается на основании уравнения движения (10), убывает. Имеем

$$\frac{d}{dt} \int \Psi^2 dx = 2 \int \Psi \Psi_t dx = 2 [\int \Psi \hat{L} \Psi dx - \kappa \epsilon \langle \Psi^2 \rangle], \quad (23)$$

где линейный оператор в правой части выражается в виде

$$\hat{L} \Psi = \alpha(x) \Psi + D \frac{d^2 \Psi}{dx^2}.$$

Для интеграла в правой части равенства (23) нетрудно получить оценку сверху. Для этого заметим, что, во-первых, функция $\Psi_0(x)$, пропорциональная производной \bar{p}_x (возмущение типа сдвига фронта $\bar{p}(x)$):

$$\Psi_0 = \eta \frac{d\bar{p}}{dx}, \quad (24)$$

является собственной для оператора \hat{L} и, во-вторых, соответствующее собственное значение равно нулю, поскольку

$$\hat{L} \Psi_0 = \eta [f_p \bar{p}_x + D \bar{p}_{xxx}] = 0.$$

Равенство нулю правой части следует из того, что квадратная скобка представляет собой производную по x правой части уравнения (18).

С другой стороны, при монотонной функции $\bar{p}(x)$ (т.е. для состояния с единственной ДС на отрезке $(0, 1)$) собственная функция Ψ_0 оператора \hat{L} обладает наименьшим собственным значением. Этот факт следует из того, что функция \bar{p}_x в этом случае не имеет узлов в интервале $(0, L)$ (осцилля-

ционная теорема). Из сказанного выше приходим к выводу (более подробно см. § 11.2): для любой функции Ψ

$$\int \Psi \hat{L} \Psi dx \leq 0,$$

причем равенство имеет место только для Ψ_0 .

Полученная оценка и равенства (23) дают для произвольной функции

$$\frac{d}{dt} \int \Psi^2 dx \leq -2\epsilon k \langle \Psi \rangle^2. \quad (25)$$

Данное неравенство дает доказательство асимптотической устойчивости. Действительно, для $\Psi \neq \Psi_0$ нестрогое неравенство (25) обращается в равенство, но поскольку для монотонного профиля $\bar{p}(x)$ среднее $\langle \bar{p}_x \rangle$ отлично от нуля, значение $\langle \Psi_0 \rangle^2$ оказывается отрицательным. Для любой же функции, отличной от Ψ_0 , неравенство (25) является строгим. Поэтому независимо от величины $\langle \Psi \rangle^2$ снова имеем

$$(d/dt) \int \Psi^2 dx < 0.$$

Таким образом, профиль распределения $\bar{p}(x)$ в стационарном состоянии типа бинарного доменного членения асимптотически устойчив.

д) Состояния с мультидоменным членением. Анализ стационарной доменной структуры, проводившийся в п. в) данного параграфа, никак не учитывал общий размер пласта. Тем самым найденные характеристики этой структуры — уровни плато в распределении p_1 и p_2 и среднее значение параметра p — оказываются размерно-инвариантными. Иными словами, бинарное расслоение, характеризуемое тремя фиксированными параметрами — $p_1, p_2, \langle p \rangle$, может реализоваться на отрезке любой длины (конечно, при условии, что эта длина существенно превышает ширину переходной области $\delta \sim \sqrt{D\tau}$). Отсюда следует возможность асимптотических состояний уравнения (8) с произвольными (в известных пределах, определяемых условием малости ширины переходной области по отношению к размерам доменов) числом доменов и распределением их длин. Одновременно это означает, что единственным асимптотически устойчивым состоянием является бинарное расслоение. Любое же асимптотическое состояние, в котором участков непрерывного плато более двух, является состоянием безразличного равновесия *).

В то же время, несмотря на подвижность границ доменов в мультидоменных структурах расслоения, одна глобальная характеристика должна оставаться неизменной. Независимо от полного размера и детального характера распределения $\bar{p}(x)$ средняя величина $\langle \bar{p} \rangle$, а вместе с ней и отношение совокупных протяженностей областей с высоким и низким плато однозначно определены. Названные характеристики во всех мультидоменных структурах такие же, как в выделенной, асимптотически устойчивой структуре бинарного расслоения.

е) Иллюстрация, полученные путем численного решения уравнения (IV.8). Доступными средствами аналитического исследования мы не можем судить об эволюции распределения $p(x, t)$

*) Этот результат был известен и ранее из работ Кернера и Осипова [64].

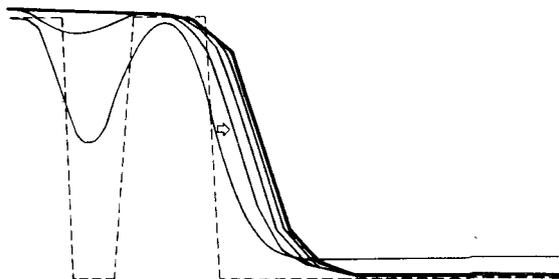


Рис. 40. Эволюция профиля $p(x, t)$, при сближенных начальных стимулах $p(x, 0)$. Штриховая линия – начальная функция $p(x, 0)$, жирная линия – асимптотический профиль. Параметры уравнения (8): $D = 5 \cdot 10^{-3}$; $\tau = 5 \cdot 10^{-2}$; $f(p) = -3,5p + 15p^2 - 10p^3$; $\kappa\epsilon = 5$.

По вертикали – p , по горизонтали – x

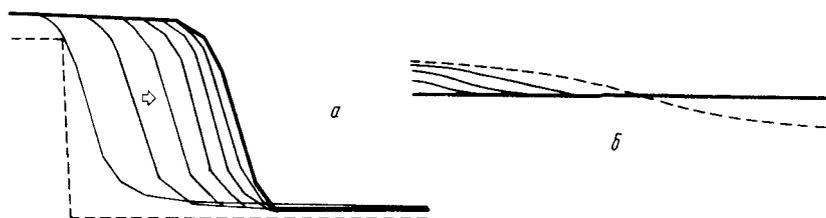


Рис. 41. Эволюция распределения $p(x, t)$ при двух начальных условиях $p(x, 0)$ в области метастабильности однородного состояния пласта. При локализованном начальном возмущении достаточной амплитуды (штриховая линия) устанавливается бинарная структура членения (а), малоамплитудные начальные возмущения релаксируют (б). По вертикали – p , по горизонтали – x ; $D = 5 \cdot 10^{-3}$; $\tau = 5 \cdot 10^{-2}$; $f = -3,5p + 15p^2 - 10p^3$; $\kappa\epsilon = 1$

вне достаточно малых окрестностей асимптотических состояний, т.е. за пределами применимости линейного приближения. Вопрос о том, как система приходит к этим состояниям начиная "издалека", может проясниться лишь путем численного анализа.

При численном решении сеточной аппроксимации уравнения (8) использовалась явная схема. Нелинейная функция $f(p)$ задавалась в виде кубического трехчлена (14) с варьируемыми параметрами α , β и γ . Варьировались также параметры ϵ , κ и D уравнения (8).

Назовем и проиллюстрируем основные результаты.

В широкой области значений параметров α , β , γ , D , $\kappa\epsilon$ асимптотическое состояние типа бинарного расчленения является глобально устойчивым, т.е. формируется при достаточно произвольных начальных условиях. В качестве иллюстрации показана эволюция профиля $p(x, t)$ при гладкой начальной функции (рис. 39а), при начальном распределении $p(x, 0)$ типа ступеньки (рис. 39б) и двух не слишком удаленных столбиков (рис. 40). Во всех случаях конечное состояние $\bar{p}(x)$ одинаково.

При достаточно произвольных начальных условиях $p(x, 0)$ эволюция распределения $p(x, t)$ имеет однотипный характер. Она проходит через относительно быструю фазу формирования фронта и медленную завершающую

шую фазу его поступательного перемещения без искажения формы вплоть до остановки в положении, предсказываемом выражением (22).

При вариации параметра α , входящего в выделенный при линейном анализе устойчивости ГНС бифуркационный параметр μ , удается разграничить области метастабильности ГНС и его абсолютной неустойчивости. В области метастабильности ГНС и доменная поляризация сосуществуют как альтернативные устойчивые в малом решения; переходы между ними: нуждаются в начальных стимулах конечной амплитуды (рис. 41). В области абсолютной неустойчивости тот же переход от ГНС к доменной поляризации может осуществляться и сколь угодно малым по амплитуде неоднородным возмущением ГНС (рис. 39a).

Рис. 42 иллюстрирует возможность формирования, при соответствующем начальном стимуле, структуры членения пласта с двумя доменами поляризации. С уменьшением толщины доменной стенки, определяемой параметром D , максимальное число ДС, которое может быть размещено на отрезке L , растет (см. рис. 24). Вместе с ним растет и степень потенциальной неоднозначности макроскопического состояния: изменяя конфигурацию начального стимула, можно получить неупорядоченный набор конечных состояний доменной поляризации (рис. 24). Это обстоятельство ставит проблему воспроизводимости при организации разметки в зародышевых эпителиях. Ниже ей будет уделено специальное внимание.

ж) **Диаграмма макроскопических состояний.** Информация об асимптотических состояниях клеточного пласта, полученная из анализа формальной динамической модели (IV.8), представлена в виде диаграммы состояний на рис. 43. Мы будем ссылаться на эту диаграмму при интерпретации экспериментальных результатов в § IV.4.

з) **Варианты краевых условий.** Условие неизменности общего размера пласта при интерпретации встречающихся реальных ситуаций оказывается слишком жестким. Обычно поляризующаяся эпителиальная ткань является лишь частью всего зародышевого материала. При этом окружающие ткани зародыша, хотя могут и не обладать способностью к активной поляризации, обычной механической упругости не лишены. В таком окружении края компетентного к поляризации фрагмента должны смещаться при его поляризации, вызывая при этом упругую реакцию, вообще говоря, во всей остальной части зародыша. Имея это в виду, приходим к следующему естественному обобщению краевых условий (6):

$$\epsilon p + \sigma^{up} = -qi|_{0,L}. \quad (26)$$

Здесь в левых частях обоих равенств стоят выражения для полной силы

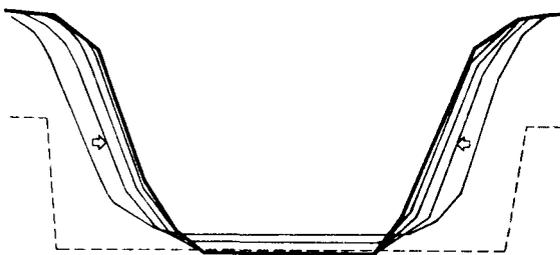
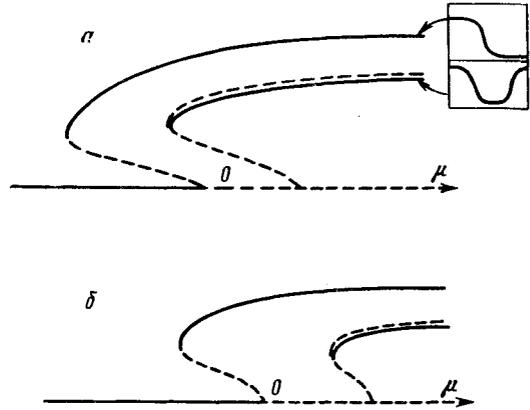


Рис. 42. Эволюция распределения $p(x, t)$ в соответствии с уравнением (8) при начальном условии в виде двух удаленных стимулов. Штриховая линия — начальная функция $p(x, 0)$; жирная линия — асимптотический профиль $\bar{p}(x)$. По вертикали — p , по горизонтали — x . Значения параметров — те же, что и на рис. 40

Рис. 43. Диаграмма стационарных состояний коллективной динамики клеточной поляризации, полученная из уравнения (8). Сплошные ветви соответствуют асимптотически устойчивым состояниям; штриховые — неустойчивым; комбинированные — состояниям безразличного равновесия; *a*, *б* соответствуют разным значениям размера пласта, в первом случае размер больше. Справа сверху на рис. 43*a* — вид профиля $\bar{p}(x)$ в соответствующих состояниях



(активной плюс пассивной — упругой) на границах поляризующегося пласта с внутренней стороны, а в правых — упругая реакция внешнего материала; $u|_{0,L}$ — смещения границ пласта, q — упругая постоянная. Отметим, что поскольку в выражении (26) u есть абсолютное смещение, а не относительная деформация, величина q представляет собой характеристику не только упругих свойств, но еще и геометрии, а также размеров пассивно деформируемого материала.

Упругие напряжения $\sigma^{упр}$ в поляризующейся ткани находим, как и в п. б), интегрируя условие механического равновесия (4). С учетом новых граничных условий (26) это дает для величины абсолютного изменения размера пласта

$$\Delta u|_{0,L} = - \frac{\epsilon L \langle p \rangle q}{K + qL} \quad (27)$$

и величины упругого напряжения $\sigma^{упр}$

$$\sigma^{упр} = - \epsilon \left(p - \frac{qL}{K + qL} \langle p \rangle \right). \quad (28)$$

В пределе большой жесткости q это выражение, как ему и положено, переходит в полученное ранее для граничных условий (6) $\sigma^{упр} = - \epsilon (p - \langle p \rangle)$. Но здесь нам более интересен противоположный предельный случай $qL \ll \ll K$. В этом случае выражение для $\sigma^{упр}$ имеет вид

$$\sigma^{упр} = - \epsilon \left(p - \frac{qL}{K} \langle p \rangle \right).$$

Соответственно, уравнение эволюции распределения $p(x, t)$ будет

$$\frac{\partial p}{\partial t} = \frac{1}{\tau} f(p) + \frac{D \partial^2 p}{\partial x^2} - \epsilon k \frac{qL}{K} \langle p \rangle. \quad (29)$$

Формально полученное уравнение динамики $p(x, t)$ отличается от такого при фиксированных границах пласта (8) только выражением постоянного

коэффициента при $\langle p \rangle$. Поэтому, как графический метод анализа асимптотических распределений, так и выводы о существовании и устойчивости структуры доменного членения пласта, полученные ранее, остаются в силе. Однако принципиальный вывод о размерной инвариантности пропорций этой структуры в данном случае оказывается несправедливым. Действительно, теперь условием равновесия доменной стенки ((21) или эквивалентным условием равенства площадей на графике рис. 38) фиксируется не величина $\langle p \rangle$, как при жестком закреплении границ пласта, а $(qI/K)\langle p \rangle$. Если приближенно считать, что вне домена поляризации $p \approx 0$, то

$$\langle p \rangle L \approx \Delta p l, \quad (30)$$

где l — линейный размер поляризованного домена, а Δp — инвариантный по отношению к изменению L перепад степени поляризации. Таким образом, в пределе малой жесткости внешнего по отношению к поляризующейся ткани материала оказывается детерминированным — не зависящим от размера этой ткани — абсолютный размер поляризованной области в ней.

Это дополнение существенно, поскольку именно такой тип регуляции имеет место при сегментации мезодермы в ходе сомитогенеза (см. § IV 4).

Другой вариант граничных условий, также заслуживающий внимания, возникает, когда клеточный пласт находится в механически напряженном состоянии (сжат или растянут) до и независимо от поляризации его клеток. Например, клеточная стенка бластулы морского ежа упруго растянута за счет тургора в полости бластулы. Избыточное гидростатическое давление в полости связано с активной закачкой воды через эпителий бластулы и выявляется при его рассечении до начала клеточной поляризации [213] (см. далее рис. 45).

Эти посторонние по отношению к активным деформациям клеток ткани напряжения можно учесть заменой граничного условия (6) на

$$\Delta u|_{0,L} = \delta L, \quad (31)$$

где δL — соответствующее растяжение (при $\delta L > 0$) или сжатие (при $\delta L < 0$) пласта. Это дает очевидным образом аддитивную добавку к полной величине упругих напряжений:

$$\sigma^{упр} = -\epsilon(p - \langle p \rangle) + E \frac{\delta L}{L}, \quad (32)$$

и соответственно к уравнению динамики распределения $p(x, t)$:

$$\frac{\partial p}{\partial t} = \frac{1}{\tau} f(p) + D \frac{\partial^2 p}{\partial x^2} - \kappa \epsilon \langle p \rangle - \kappa E \frac{\delta L}{L}. \quad (33)$$

Дополнительное слагаемое $-\kappa E \frac{\delta L}{L}$ в уравнении (33) дает два существенных эффекта.

Во-первых — сдвиг порога неустойчивости ГНС. Критическое отношение параметров определяется равенством прежнего вида (см. п.в. настоящего параграфа):

$$\mu = \frac{1}{\tau} \alpha - D \frac{\pi^2}{L^2}; \quad \alpha = \left. \frac{df}{dp} \right|_{p_0}. \quad (34)$$

Однако теперь сам исходный уровень p_0 отличается от такового при $\delta L = 0$:

$$p_0(\delta L > 0) < p_0(\delta L = 0). \quad (35)$$

Отсюда следует отличие и в величине α . В частности, для зависимости $f(p)$, аппроксимируемой кубической параболой (14), с уменьшением p_0 связано увеличение абсолютной величины производной f_p , что и приводит к сдвигу порога стабильности ГНС в соответствии с (34).

Во-вторых, дополнительным слагаемым $-\kappa E \frac{\delta L}{L}$ в уравнении (33) обуславливается сдвиг стационарного положения ДС.

Условием равновесия ДС фиксируется теперь не величина $\langle p \rangle$, как ранее, а сумма $\langle p \rangle + \frac{E}{\epsilon} \frac{\delta L}{L}$. Это дает новый размер поляризованного до-

мена \tilde{l} , отличающийся от прежнего l на величину $-\frac{E}{\epsilon} \frac{\delta L}{\Delta p}$. С общим растяжением пласта $\delta L > 0$ связано уменьшение величины l .

Эти выводы из теоретической модели будут использованы ниже при интерпретации фактических данных.

§ IV.3. Поляризация клеток в двумерном пласте [224]

Обобщение исходных уравнений (3), (4) динамической модели поляризации на двумерный слой клеток требует некоторых уточнений.

Прежде всего под морфологической поляризацией клеток мы, как и в одномерной модели предыдущего параграфа, подразумеваем активный процесс сжатия клеток в плоскости пласта и вытягивания по нормали. При этом степень поляризации, как и ранее, характеризуется скалярным параметром p , смысл которого остается прежним (см. § IV.2, п. б)). Поэтому прежний вид имеет и функция $f(p)$, учитывающая внутреннюю механическую активность клеток.

Эффект контактной поляризации будет предполагаться изотропным в плоскости пласта. В рамках данного предположения этот эффект полностью характеризуется всего одним коэффициентом переноса D и описывается членом диффузионного типа $D\Delta p$ (Δ – двумерный лапласиан) в уравнении динамики распределения $p(r, t)$.

Касательные напряжения теперь описываются тензором второго ранга. Мы, как и прежде, будем различать две составляющие этого тензора – пассивную, чисто упругую ($\sigma_{ik}^{упр}$) и активную, связанную с поляризацией клеток ($\sigma_{ik}^{акт}$). Условие механического равновесия по отношению к перемещениям в плоскости пласта выражается равенством [222]

$$\frac{\partial \sigma_{ik}^{акт}}{\partial x_k} + \frac{\partial \sigma_{ik}^{упр}}{\partial x_k} = 0. \quad (36)$$

Связь активных напряжений со степенью поляризации p определяется, как и в одномерном случае, линейным соотношением и плюс к тому принимаемым предположением об изотропности напряжения сжатия, создаваемого в плоскости пласта нормально поляризующейся клеткой. Фор-

мальным образом такая связь выражается в виде

$$\sigma_{ik}^{\text{акт}} = \epsilon \delta_{ik} p. \quad (37)$$

Наконец, относительно эффекта касательных упругих напряжений в динамике клеточной поляризации (который в одномерной модели (3), (4) учитывался членом σ) естественно считать, что напряжение сдвига в плоскости клеточного слоя никак не сказывается на активном поперечном вытягивании (поляризации) клеток. При таком сдвиге не возникает нормальной составляющей силы, как это имеет место при деформации всестороннего сжатия (растяжения) в плоскости пласта.

Из приведенных соображений следует, что в уравнении динамики поляризации двумерного клеточного пласта на месте слагаемого $-\kappa \sigma$ одномерной модели (3) должен стоять след тензора касательных напряжений:

$$\partial p / \partial t = \frac{1}{\tau} f(p) + D \Delta p - \kappa \text{Sp } \sigma_{ik}; \quad \sigma_{ik} = \sigma_{ik}^{\text{упр}} + \sigma_{ik}^{\text{акт}}. \quad (38)$$

Для дальнейшего анализа в уравнении (36) удобно перейти от тензора напряжений $\sigma_{ik}^{\text{упр}}$ к вектору u смещений в плоскости и далее — от тензорной к векторной записи [222]. С учетом (37) это дает:

$$\frac{E}{1 - \sigma^2} \text{grad div } u - \frac{E}{2(1 + \sigma)} \text{rot rot } u + \epsilon \text{grad } p = 0. \quad (39)$$

Здесь E — модуль Юнга, а σ — коэффициент Пуассона.

Для простоты проанализируем симметричный случай кругового пласта, в центре которого инициируется поляризация клеток. Ввиду принятых нами предположений об изотропности контактного переноса поляризации и напряжений в плоскости, генерируемых при поляризации, решения уравнений (38), (39) должны сохранять цилиндрическую симметрию.

Далее мы будем рассматривать параллельно два варианта краевых условий:

а) Круговой край пласта свободен. Такая ситуация вряд ли встречается в нормально развивающемся зародыше. Но в экспериментах по эксплантации фрагментов эмбриональных эпителиев имеет место именно она. Граничное условие в данном случае выражается в виде

$$\sigma_{rr}^{\text{упр}} + \epsilon p |_{r=R} = 0. \quad (40)$$

б) Пласт жестко закреплен на границе. Данный случай предполагается соответствующим интактному зародышу. Условие фиксации границы кругового пласта выражается в виде

$$u(R) = 0. \quad (41)$$

Здесь u — единственная отличная от нуля радиальная составляющая вектора смещений.

В полярных координатах величина u зависит только от радиуса $u = u(r)$. Интегрированием условия механического равновесия (39) эта величина легко находится. Ее выражение через функцию $p(r, t)$ имеет вид

$$u(r) = \frac{ar}{2} - \frac{b}{r} \int pr dr. \quad (42)$$

Здесь комбинация упругих констант в уравнении (39) обозначена для краткости $b = \epsilon(1 - \sigma^2)/E$, а постоянная a представляет собой константу интегрирования, которая должна быть найдена из граничных условий.

В случае свободной границы для нахождения постоянной a необходимо получить выражение для компоненты σ_{rr} тензора напряжений. Это выражение следует из известных формул теории упругости [222]

$$\sigma_{rr}^{ynp} = \frac{E}{1 - \sigma^2} (u_{rr} + \sigma u_{\varphi\varphi}),$$

$$u_{rr} = \partial u / \partial r, \quad u_{\varphi\varphi} = u/r,$$

где u_{rr} и $u_{\varphi\varphi}$ — компоненты тензора деформации в полярных координатах. Имеем

$$\sigma_{rr}^{ynp} = \frac{E}{1 - \sigma^2} \left[-bp(r) + \frac{a}{2} (1 + \sigma) + \frac{b(1 - \sigma)}{r^2} \int pr dr \right].$$

Подставляя данное выражение в условие на границе (40), получим

$$a = -b \frac{1 - \sigma}{1 + \sigma} \langle p \rangle.$$

Здесь $\langle p \rangle$ — среднее по площади пласта: $\langle p \rangle = \frac{R}{R^2} \int_0^R pr dr$.

Далее, входящий в уравнение динамики след тензора напряжений σ_{ii} находится с помощью соотношения [222]

$$\sigma_{ii}^{ynp} = \frac{E}{1 - \sigma} \operatorname{div} \mathbf{u} \quad (43)$$

теории упругости и равенств

$$\operatorname{div} \mathbf{u} = \frac{1}{r} \frac{d(ur)}{dr} = a - bp. \quad (44)$$

После подстановки выражения для постоянной a получим

$$\sigma_{ii} = (2 - \sigma) \epsilon p - \epsilon(1 - \sigma) \langle p \rangle. \quad (45)$$

Важный вывод, который следует из выражения (45), состоит в том, что упругие напряжения возникают не только в области поляризации клеток, но и там, где клетки неполяризованы ($p = 0$). Напомним, речь здесь идет о пласте с незакрепленными границами. В подобном случае для одномерной цепочки клеток вне области поляризации упругие напряжения полностью релаксируют за счет подвижности концов. В двумерном пласте такой релаксации препятствует возникновение тангенциальных напряжений.

Обращаем внимание на знак выражения (45). Как известно, для всех материалов значение коэффициента Пуассона лежит в пределах $0 - \frac{1}{2}$ [222]. При этом согласно (45) σ_{ii} отрицательно при положительных $\langle p \rangle$. Следовательно, локальная поляризация генерирует напряжения сжатия во всем пласте. Нелокальный упругий эффект в данном случае имеет знак,

противоположный таковому для случая одномерного (и двумерного, как будет показано ниже) ряда клеток с фиксированными концами.

Для кругового пласта с фиксированной границей общее выражение для величины радиальных смещений имеет, как и в предыдущем случае, вид (42). Однако краевое условие (41) приводит теперь к другому выражению для постоянной a :

$$a = b \langle p \rangle. \quad (46)$$

Равенства (43), (44), (46) дают для σ_{ii} :

$$\sigma_{ii} = (2 - \sigma) \epsilon p + \epsilon(1 + \sigma) / \langle p \rangle. \quad (47)$$

Нелокальность упругой реакции на поляризацию клеток снова имеет место, но знак ее в соответствии с (47) такой, что поляризующиеся клетки растягивают, а не сжимают неполяризованную часть пласта.

С полученными выражениями для σ_{ii} уравнение динамики $p(r, t)$ (38) становится замкнутым и соответственно двум случаям а) и б) имеет вид [224]

$$\tau p_t = f(p) + (R_p^2/r) p_r + R_p^2 p_{rr} + \eta_1 \langle p \rangle, \quad (48)$$

$$\tau p_t = f(p) + (R_p^2/r) p_r + R_p^2 p_{rr} - \eta_2 \langle p \rangle; \quad (49)$$

$$\bar{f}(p) = f(p) - \kappa \epsilon \tau (2 - \sigma) p, \quad \eta_1 = \kappa \epsilon \tau (1 - \sigma), \quad \eta_2 = \kappa \epsilon \tau (1 + \sigma).$$

При анализе динамических уравнений (48), (49) будем выделять лишь качественные черты отличия в поведении при двух типах граничных условий. При низкой средней степени поляризации в пласте (малом $\langle p \rangle$) уравнения (48) и (49) дают качественно одинаковое поведение. Новым элементом этого поведения по сравнению с одномерной моделью (8) в аналогичной ситуации является существование критического зародыша поляризации. Если в одномерном случае доменная стенка (которая, как мы видели из численного решения (8), формируется относительно быстро и из достаточно произвольного начального профиля $p(x, 0)$) перемещается поступательно с постоянной скоростью, то в двумерной модели эта скорость оказывается зависящей от размера поляризованной области. При этом существует такой критический размер, при котором скорость ДС меняет знак с положительного при $R > R_{кр}$ на отрицательный при $R < R_{кр}$ [225]. Таким образом, зародыш поляризации критического размера является неустойчивым стационарным состоянием. Данное состояние, хотя само по себе может не обнаруживаться, но его существование сказывается известным образом на вероятности достижения других — уже устойчивых — состояний [226]. А именно — критический размер зародыша $R_{кр}$ является пороговым для развития процесса поляризации в пласте из начального локального очага.

Простыми экспериментальными воздействиями, например общим растяжением или сжатием пласта, величина $R_{кр}$ может направленно изменяться в ту или иную сторону. Для оценки величины и направления сдвига порогового размера зародыша поляризации можно пользоваться выражением [225, 226]

$$R_{кр} = \frac{D \int (p_r)^2 dr}{\Delta U}. \quad (50)$$

Здесь ΔU – интеграл функции точечной динамики:

$$\Delta U = \int_{\Delta p} f(p) dp.$$

Для развития коллективной поляризации из локального очага путем формирования и распространения кругового фронта поляризации величина ΔU должна быть положительной. Значение интеграла в (50) определяется крутизной фронта поляризации p_r . Эта величина входит в выражение для критического зародыша так же, как коэффициент поверхностного натяжения в аналогичное выражение теории равновесных фазовых переходов первого рода [225]. Подобно коэффициенту поверхностного натяжения величина $\int p_r^2 dr$ существенно изменяется (падает до нуля) при приближении к критической точке сглаживания функции точечной динамики $f(p)$. Вдали от этой точки такие внешние факторы, как общее растяжение или сжатие пласта, мало сказываются на величине ΔU , но существенно – на величине $\int p_r^2 dr$ (см. п.3 предыдущего параграфа).

В пределе низкой средней поляризации $\langle p \rangle$, позволяющем игнорировать дальнедействующий эффект упругости, интересных для нас состояний с пониженной симметрией в плоскости пласта не возникает. Ничего не меняет в этом отношении и учет этого эффекта в том виде, в каком он представлен при свободной границе пласта, т.е. в уравнении (48). Устойчивыми стационарными состояниями в данном случае являются однородное неполяризованное и однородное же, но в котором все клетки одинаково поляризованы. При этом нелокальность в динамике поляризации повышает лишь кооперативность перехода из первого состояния во второе. Действительно, с ростом $\langle p \rangle$ величина ΔU в выражении для критического размера зародыша поляризации получает положительный прирост, пропорциональный $\langle p \rangle \Delta p$. Согласно (50) критический размер $R_{кр}$ должен при этом уменьшаться. Понижение порогового размера повышает вероятность развития коллективной поляризации из спонтанно зарождающихся новых центров поляризации. Таким образом, в пласте со свободным краем, где локальная поляризация вызывает дальнедействующий эффект упругого сжатия, даже при локальном запуске процесса поляризации можно ожидать многоцентрового развития этого процесса.

Процесс развития клеточной поляризации и его результат в пласте с фиксированной границей выглядят иначе. Здесь, в соответствии с уравнением (49), вполне аналогично одномерному случаю предыдущего параграфа процесс поляризации имеет отрицательную обратную связь. По мере накопления поляризованных клеток – роста $\langle p \rangle$ – поляризация новых тормозится. При этом, во-первых, понижается вероятность зарождения новых очагов коллективной поляризации и, во-вторых, рост надкритического зародыша поляризации постепенно замедляется вплоть до полной остановки. Устойчивым асимптотическим состоянием в данном случае является расслоение пласта на поляризованную и неполяризованную области с фиксированным отношением соответствующих площадей. Обосновывается это утверждение совершенно подобно тому, как это делалось в одномерной модели в предыдущем параграфе.

Таким образом, упругая дальнедействующая реакция на поляризацию в пласте с фиксированной границей обеспечивает механизм глобаль-

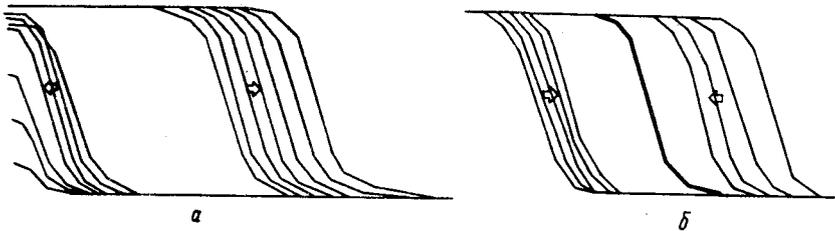


Рис. 44. Динамика поляризации в круговом пласте в двух краевых задачах: *a* – численное решение уравнения (48) (свободные границы), неоднородные стационарные распределения отсутствуют; *b* – численное решение уравнения (49) (фиксированная граница). Жирная линия – асимптотический профиль $\bar{p}(r)$. Параметры те же, что и на рис. 40

ного контроля поляризации. Он проявляется в подавлении способности к спонтанной поляризации клеток за пределами уже поляризованной области пласта и в обеспечении асимптотического состояния с пониженной симметрией распределения поляризации в плоскости пласта – состояния, в котором устойчиво сосуществуют области поляризованных и неполяризованных клеток с фиксированным отношением площадей – инвариантным при изменении общих размеров пласта (рис. 44б).

§ IV.4. Обсуждение биологических данных

а) Поляризация клеток определяет их активность в морфогенезе и дифференцировке. В эпителиальных пластах поляризующиеся клетки почти никогда не сохраняют прямоугольные сечения. Морфологическая поляризация, как правило, связана с сужением одного из клеточных концов. Это приводит к формированию клеточных “вееров”, хорошо выявляемых на окрашенных срезах эмбрионального материала [202]. Гистологическими наблюдениями и опытами по релаксации отсепарированных тканей было показано, что в ходе дальнейшего скручивания поверхность клеточного пласта устанавливается нормально клеточным осям “вееров” [202]. Таким образом, *поляризация клеток в значительной мере определяет будущую геометрию пласта.*

С другой стороны, показано, что распространение фронтов контактной поляризации клеток в эмбриональном материале приводит к быстрому подъему общего белкового синтеза [227] и что форма клеток (степень их вытянутости) влияет на спектр специфических синтезируемых белков, т.е. на экспрессию генома [228–230]. Отсюда следует, что *поляризация клетки может определить направление ее дифференцировки.*

Фактическим обоснованием для этого важного вывода могут служить литературные данные по экспериментам на разнородном эмбриональном материале. Приведем некоторые из них.

1. Мезенхима позвоночных, которая в норме может дифференцироваться либо в хрящ, либо в соединительную ткань, дифференцируясь, осуществляет выбор под контролем морфологического состояния клеток и их адгезионного взаимодействия с субстратом [231]. Клетки мезенхимы, культивирующиеся на подложке, распластаны; их цитоплазма содержит

микротрубочки и пучки актиновых филаментов. Такие клетки дифференцируются в фибробласты. При обработке распластанных клеток цитохалазином пучки микрофиламент деградируют. В результате клетки теряют способность к распластыванию, осфериваются и дифференцируются в хрящ [231]. Делается вывод о том, что взаимодействие актинового цитоскелета с компонентами внеклеточного матрикса, определяющее форму клеток, обеспечивает также регуляторный механизм цитодифференцировки.

2. Уже довольно давно стало ясно, что реакция эктодермы на индуцирующее воздействие — дифференцировка нервной ткани — подразумевает дальнейший процесс коллективных клеточных взаимодействий в индуцированном материале. Эти взаимодействия не сводятся к непосредственному отклику на контакт с индуцирующей тканью. Так, было показано, что в малой массе индуцированного материала (менее 30 клеток) вообще не происходит инициации нейральной дифференцировки [236].

В работе [232] проведено сопоставление электронно-микроскопической картины межклеточных контактов в эксплантатах индуцированной и неиндуцированной закладок. Обнаружена существенная разница. Индуцированные клетки имеют большую площадь и плотность взаимных контактов по отношению к неиндуцированным. При этом первые выделяются резко выраженной морфологической полярностью.

Как известно, первым признаком начала нейруляции является формирование области вытянутых колонообразных клеток нервной пластинки. Аналогичное явление при индукции линзы — формирование плакоды. Весьма вероятно, что именно клеточная поляризация является первичным откликом на действие индуктора, за которым следует и которым в какой-то мере обуславливается цитодифференцировка [233]. К этому выводу приводит анализ эксплантатов индуцированной эктодермы [232]. При эксплантации часть поляризованных в интактной ткани клеток деполаризуется. С возникающим новым распределением морфологической поляризации в массе клеток коррелирует новая картина цитодифференцировок: в эксплантате помимо нервной ткани формируются производные мезодермы — хорда и мышечная ткань [232].

В свое время Гольцфретер, трактуя факт низкой специфичности искусственных индукторов, предположил, что универсальной модой действия естественного и искусственных индукторов может быть деполаризация мембраны [234, 235]. Прямым следствием этого должно быть изменение ионного состава и pH в цитоплазме, косвенным — реорганизация цитоскелета и формы клеток [237].

Мы не можем более подробно останавливаться на затронутых темах, поскольку они выходят за рамки предмета данной работы. Существенная для нас сторона поляризации эмбриональных клеток состоит в возможности самоорганизации надклеточного порядка на ее основе. Как уже отмечалось в § IV.1, при первичной разметке многих эмбриональных зачатков эта возможность используется. Далее мы покажем, что дает обсуждавшийся в данной главе механизм этой самоорганизации для качественного понимания известных фактов эмбриологии.

б) Анализ экспериментов по эмбриональным регуляциям на морском еже. Наиболее близка к модельному

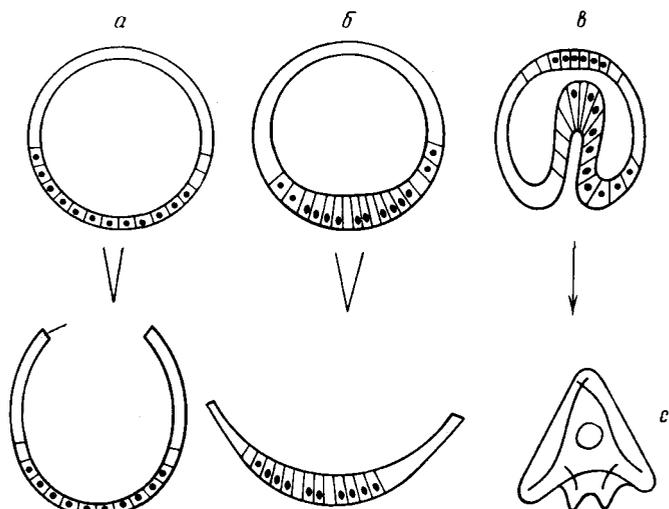


Рис. 45. Опыты по рассечению бластулы морского ежа [213], выявляющие возникновение дополнительных натяжений в эпителиальной стенке вследствие поляризации клеток в вегетативной области: *а-г* – схема нормального развития, *в* – гастрюла, *г* – плутеус

клеточному пласту бластула морского ежа. Ранняя бластула сложена из клеток одинаковой высоты. Позже, перед началом инвагинационной гастрюляции появляется градиент клеточной поляризации с максимумом на вегетативном полюсе (рис. 45). Надрезы зародыша на этой стадии приводят к немедленным деформациям – расхождению краев раны, указывающим на наличие механических, упругих натяжений в клеточной стенке бластулы [213].

Позже, по ходу гастрюляции, градиент морфологической поляризации клеток стенки зародыша становится все более резким. Поляризованные клетки вегетативной области в основном инвагинируют, а в анимальной области возникает второй домен поляризованных клеток (анимальная пластинка).

Фундаментальное свойство морфогенеза морского ежа (и более широко – морфаллактических полей – см. гл. I) – способность к эмбриональным регуляциям, т.е. к образованию уменьшенных зародышей нормальной структуры и пропорций после удаления более или менее значительной части клеточного материала. Объяснение этого свойства (его употребляемое в литературе обозначение – размерная инвариантность) – давно стоящая проблема. Как известно, именно она породила идею о первичном, по отношению к проявлению специфических форм активности эмбриональных клеток (цитодифференцировке), установлении позиционной информации – неспецифического препаттерна дифференцировок [31, 32].

В литературе принято относить свойство размерной инвариантности за счет химических препаттернов. Предлагались различные гипотетические варианты "реакционно-диффузионных" схем, обеспечивающие его наличие (см. работы [238, 239]). Стандартная двухкомпонентная реакционно-диффузионная система общего вида (§ I.2) полной размерной инвариант-

ности химического паттерна обеспечить не может. Для сообщения этой модели требуемого свойства в работе [239] постулировался дополнительный к двум имеющимся морфогенам молекулярный агент, исполняющий функцию переноса морфогенов. Таким путем удастся добиться имитации свойства размерной инвариантности в рамках модели "реакция—диффузия". Однако при этом пришлось "множить сущности" — к двум гипотетическим агентам добавлять третий. Тем самым еще более проблематичным становится экспериментальное обоснование модели.

Суть предлагаемой интерпретации свойства размерной инвариантности морфогенетических структур состоит в отнесении его за счет организации механической активности клеток в эпителиальных пластах. Доменные структуры поляризации эпителиев, рассмотренные в двух предыдущих параграфах, как было показано, обладают полной размерной инвариантностью. Назовем еще раз факторы, сыгравшие существенную роль в обеспечении этого свойства: 1) бистабильность клеточных механизмов регуляции формы, 2) когерентная упругая реакция всего пласта на локальные процессы активной деформации клеток, 3) локальный механизм запуска поляризации и механизм ее распространения путем контактного переноса. Последнее дает воспроизводимость паттерна поляризации, несмотря на потенциальную множественность асимптотических состояний.

Поскольку, как отмечалось выше, поляризация клеток предопределяет их дальнейшую морфогенетическую активность (например, поляризация вегетативных клеток стенки бластулы — их последующую инвагинацию), то размерная инвариантность паттерна поляризации достаточна для обеспечения таковой более поздних морфологических структур (архентерона и его производных).

Проблема эмбриональной регуляции не исчерпывается сказанным. Процесс регуляции не является столь однозначно детерминированным (эквивинальным), как было только что представлено. Укажем на ряд его черт, отмеченных в экспериментах с зародышами морского ежа.

1. Если произвести рассечение зародыша не позже стадии средней бластулы, то регуляционный процесс отчетливо распадается на две фазы [213]. Первая из них состоит в замыкании раны и характеризуется значительной вариабельностью возникающих форм. Хотя распространение клеточной поляризации имеет место на этой стадии, в ней отсутствуют черты глобального контроля (рис. 35). Очаги поляризации могут спонтанно формироваться и разрастаться в достаточно произвольных местах, размеры поляризованных областей недетерминированы, их границы размыты. Таким образом, на первой фазе регуляционного процесса никак не проявляется типичная для нормы картина дальнего порядка в организации механической активности клеток эмбриональной ткани.

Вторая фаза после замыкания раны характеризуется включением глобальной регуляции, которая обеспечивает правильную крупномасштабную организацию распределения поляризованных и неполяризованных клеток (рис. 35).

Необходимо прояснить, каким образом появление замкнутого зародыша приводит к описанному изменению характера регуляционного процесса.

2. Способностью перейти к гастрюляции после заживления раны обладает не любой фрагмент бластулы. Критичным является наличие в этом фрагменте выделенной группы клеток — микромеров, которая в норме располагается на вегетативном полюсе зародыша. Так, восстановления нормального развития не наблюдается, если изолирована группа анимальных blastomeres на стадии дробления или анимальная часть бластулы [240]. Но после подсадки в такую, не способную к инвагинации, редуцированную бластулу микромеров инвагинация в ней происходит.

Интересно, что количество микромеров при этом не играет роли. Нормальная инвагинация имеет место как при увеличении их числа на вегетативном полюсе по сравнению с нормой, так и при уменьшении [31].

С другой стороны, при трансплантации в анимальную область нормальной зародыша дополнительной группы микромеров наблюдается дополнительное к вегетативному анимальное влячивание стенки бластулы [240]. Вопрос состоит в том, каким образом локальное действие на эмбриональную ткань (подсадка микромеров) способно вывести ее из устойчивого состояния (неинвагинирующая бластула), индуцируя дальний порядок распределения поляризованных клеток.

Интересно и важно, что такой же по конечному результату эффект достигается при воздействии явно иной природы и характера. Имеется в виду индукция процесса инвагинации в замкнутой анимальной полубластуле добавлением в среду LiCl. Воздействие в данном случае, очевидно, нелокальное; оно должно отражаться на параметрах всей системы в целом. Тем не менее результатом его является все то же расчленение эмбриональной ткани на поляризованный и неполяризованный домены [241] (рис. 46).

Для интерпретации серии результатов, представленных в п. 2, обратимся к диаграмме стационарных состояний на рис. 43.

На рассматриваемой стадии бластулы—гастрюлы все клетки зародыша обладают способностью а активным деформациям [213]. Вместе с тем неспособность однородной (лишенной микромеров) половины бластулы к инвагинации указывает на то, что гомогенное неполяризованное состояние (ГНС) является относительно устойчивым. Соответственно этому значение бифуркационного параметра μ должно приходиться на область левее критической точки на диаграмме рис. 43. С другой стороны, данное значение не должно быть слишком мало. В противном случае вообще не могло бы реализоваться состояние, отличное от ГНС.

Способность микромеров индуцировать доменную поляризацию клеточной стенки и ее последующую инвагинацию следует трактовать как проявление метастабильности исходного неполяризованного состояния. Роль микромеров, как мы считаем, ограничивается обеспечением затравочной поляризации, необходимой для выхода за порог включения коллективной поляризации (§ IV.3). Вполне естественно, что для выполнения этой роли не имеет значение количество микромеров.

Однако имеют значение количество таких центров затравочной поляризации и расстояния между ними. Так, в опытах по трансплантации микромеров в область клеточного пласта, удаленную от уже имеющихся микромеров, наблюдаемая картина инвагинации указывает на формирование двух (вместо одного) доменов клеточной поляризации. В то же время в эксперименте часто удается наблюдать зарождение поляризации

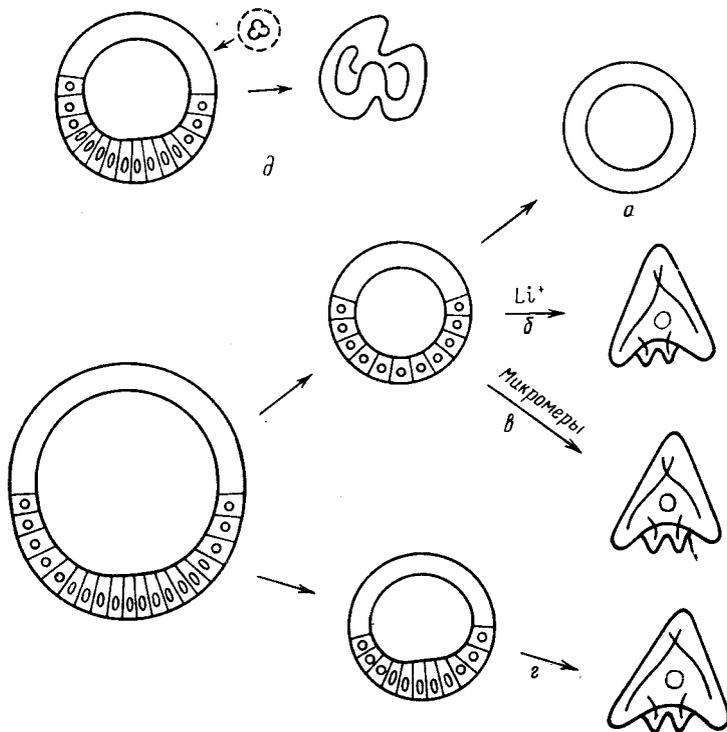


Рис. 46. Развитие фрагментов зародыша морского ежа при экваториальном рассечении бластулы. Анимальная область дает постоянную бластулу (а); тот же фрагмент развивается нормально при подсадке в эпителиальную стенку микромеров (б) или при помещении в раствор LiCl (в). Вегетативная полубластула развивается в личинку правильных пропорций, но уменьшенных масштабов (г). Подсадка в анимальную область неоперированного зародыша дополнительных микромеров приводит к удвоению структур (д)

независимо в нескольких точках вегетативной области бластулы, т.е. на сравнительно небольшом удалении друг от друга. В таком случае конечным результатом является вычленение единственного домена поляризованных клеток.

Описанное неоднозначное поведение естественным образом следует из динамической модели (IV.8) и хорошо имитируется путем численного решения уравнения (IV.8) (рис. 42, 24).

Опыты с добавлением соли LiCl в среду [241] свидетельствуют о том, что наличие предсуществующих центров затравочной поляризации (микромеров) не является необходимым условием включения коллективной механической активности клеток бластулы. Возможность спонтанного расслоения, реализующаяся в этих опытах, по-видимому, следует интерпретировать как выход в область значений параметров, где ГНС оказывается асимптотически неустойчивым. Данная область на диаграмме рис. 43 располагается правее критической точки $\mu = 0$. Понять, почему выход в неустойчивую область реализуется добавлением LiCl, можно,

если иметь в виду известную способность ионов Li^+ ингибировать активный транспорт натрия [242], что в свою очередь понижает эффективность эпителиальной стенки бластулы как водяного насоса. В результате избыточное гидростатическое давление в полости бластулы по сравнению с окружающей средой должно падать, а следовательно, должна уменьшаться степень растяжения стенки бластулы.

В предыдущем параграфе мы выяснили, что с уменьшением натяжения в пласте понижается радиус критического зародыша и тем самым порог включения коллективного процесса поляризации из локального очага. Кроме того, в п.3 § IV.2 отмечалось, что критическая точка асимптотической неустойчивости ГНС по отношению к малым флуктуационным возмущениям сдвигается при снижении натяжения пласта так, что ГНС при этом может становиться из метастабильного неустойчивым состоянием. Оба эти обстоятельства могут приводить к наблюдаемому эффекту LiCl .

В рамках обсуждаемого механизма самоорганизации механической активности клеток эпителия естественное объяснение имеет и факт немотонности, двухфазности процесса регуляции.

Первая фаза этого процесса приходится на состояние, в котором отсутствует тургор в полости бластулы — незамкнутый или замкнутый, но сморщенный пласт клеток. В этом состоянии отсутствуют внешние ограничения на свободу перемещения любой точки клеточного слоя. Очевидно, для данного случая адекватна краевая задача а) предыдущего параграфа (свободная граница).

После замыкания раны от операции (механизма и промежуточных этапов процесса мы можем здесь не касаться) происходит округление зародыша. Это округление свидетельствует о появлении тургора в полости бластулы и является следствием одностороннего тока воды снаружи внутрь. Избыточное гидростатическое давление в полости бластулы является внешним фактором жесткости, ограничивающим свободу сокращения поверхности клеточного пласта. Поэтому для сферического зародыша, характерного для второй фазы регуляционного процесса, хоть и грубо, адекватным представляется вариант б) краевой задачи предыдущего параграфа.

Обнаруживаемое в эксперименте различие глобальных черт клеточной поляризации для двух названных состояния пласта является следствием разных знаков нелокальной обратной связи, возникающей при поляризации. Этот знак положителен в пласте со свободной границей (уравнение (48)) и отрицателен при жестком ограничении свободы сокращения поверхности пласта (уравнение (49)).

Кроме того, снятие натяжений, обусловленных тургором в бластуле (первая фаза регуляционного процесса), дестабилизирует ГНС по отношению к спонтанному зарождению очагов клеточной поляризации (см. выше). Дестабилизация ГНС и отсутствие отрицательной обратной связи объясняют характерные черты макроскопической картины поляризации в зародыше на первой фазе регуляционного процесса: спонтанное зарождение очагов поляризации в произвольных местах клеточного слоя, бесконтрольное распространение поляризации из этих очагов, отсутствие дальнего порядка.

Появление натяжений в осферившейся бластуле на второй фазе регуляционного процесса повышает порог спонтанного развития коллективной

поляризации, сообщает ей отрицательную обратную связь, возвращает асимптотическую устойчивость ГНС и в результате стирает флуктуационную картину предшествовавшей фазы. Далее, при наличии микромеров (затравочного центра поляризации) сохраняется лишь одно пятно поляризованных клеток, судьба которого — устойчивое, детерминированное членение пласта — нам известна из анализа предыдущих параграфов. Таким образом, механическая целостность выступает как фактор, обеспечивающий глобальный контроль клеточных процессов морфологической поляризации.

в) Поляризация клеток в развитии глазного зачатка и при сомитогенезе. Очень четкий пример упорядоченной коллективной поляризации клеток дает развитие глаза позвоночных. Здесь однородный по толщине нейральный слой расчленяется на поляризованные клетки сетчатки и плоские — пигментного эпителия [243]. Считается доказанным, что соответствующая цитодифференцировка осуществляется под контролем морфологического состояния клеток [244]. Вся ткань глазного зачатка способна образовывать сетчатку и превращается в нее в условиях, когда силы растяжения отсутствуют. Пигментный эпителий дифференцируется лишь при наличии натяжений [243, 344].

Интересно, что у зародышей высших позвоночных процесс вычленения поляризованной области при формировании сетчатки регулируется внутриглазным давлением, т.е. совершенно аналогично тому, как это происходит в ходе регуляционного процесса у зародыша морского ежа. При экспериментальном или патологическом понижении давления длина поляризованного (сетчаточного) домена увеличивается за счет растянутого (пигментного) — явление колобомы [244]. Это явление прямо вытекает из модели. По существу его полная качественная интерпретация содержится в п.3 § IV.2.

Процесс сегментации осевой мезодермы позвоночных (сомитогенез) сопровождается на клеточном уровне такими же перестройками и, вероятно, обусловлен той же формой механической активности клеток, что и активная морфологическая поляризация в эпителиальной ткани [245]. Несегментированная мезодерма представляет собой рыхлую клеточную массу, существенную долю полного объема которой составляют межклетники [245, 246]. Та же ткань, входящая в состав сомитов, резко отличается более плотными и протяженными зонами межклеточных контактов и морфологией клеток, близкой к поляризованным клеткам эмбриональных эпителиев.

На первый взгляд может показаться, что метамерная организация зародышевого материала, порождаемая сомитогенезом (25–30 морфологически идентичных, не считая концевых, сомитов), имеет мало общего и управляется иными механизмами глобального контроля, чем бинарная структура доменного членения эпителиальной ткани. Такая периодическая в одном измерении — вдоль главной оси тела зародыша — структура, как кажется, могла бы создаваться под действием механизма типа тьюрингова, т.е. вследствие неустойчивости коллективной, пространственно периодической моды. Однако наблюдения и эксперименты показывают, что это не так.

Уже картина, представляющаяся при исследовании на гистологическом уровне, свидетельствует о том, что закладка сомитов — процесс не кол-

лективный, но рекурсивный [246]. Из этой картины, а также из экспериментов по тепловому удару [247] следует, что сомиты формируются последовательно от головы к хвосту зародыша. При этом зона активного сомитообразования охватывает по протяженности 3—4 длины сомита. Ни прямых, ни косвенных межклеточных взаимодействий, существенных для формирования очередного сомита, между областью сомитообразования и материалом сформированных сомитов очевидно нет [247].

Мезодерма за последним сформированным сомитом выглядит расслоенной на зоны компактизованного клеточного материала — названная выше трех-четырёхсомитная зона — и рыхлый остаток. По характеру контактов и форме клеток состояние клеточного материала в первой зоне аналогично таковому в областях клеточной поляризации эпителия. Таким образом, в постсомитной мезодерме имеет место такое же бинарное членение материала, как в поляризующемся при закрепленной границе эпителии.

Однако здесь возникает проблема. Каким образом выдерживается пространственная периодичность — сохраняется неизменным размер сомитов? Ведь по ходу продвижения фронта сомитообразования полный размер компетентного образца, каковым является длина постсомитной мезодермы, убывает. Если бы при расслоении мезодермы имело место свойство размерной инвариантности пропорций, обоснованное теоретической моделью для эпителиального пласта с жестко фиксированной границей, то вместо неизменной длины сомита должна была бы наблюдаться линейно убывающая с его последовательным номером.

Ответ на поставленный вопрос дает изменение предположения о характере граничных условий. Действительно, мы убедились (§ IV.2, п. 3), что если упругая связь поляризующейся ткани с примыкающими к ней на концах частями зародыша характеризуется достаточно малым коэффициентом жесткости, то инвариантной (по отношению к общему размеру) характеристикой расслоенного состояния является не относительный, а абсолютный размер поляризованного домена. Принимая названное условие мягкости в случае сегментирующейся мезодермы, со ссылкой на этот результат, удастся интерпретировать наблюдаемую пространственно периодическую сегментацию путем последовательных бинарных членений.

§ IV.5. Поляризация клеток в пласте с внешними упругими связями

Рассматривавшийся выше в настоящей главе случай изолированного эпителия представляет реальную ситуацию в идеализированном виде. В нем не отражены взаимодействия клеточного слоя с контактирующим материалом зародыша. Между тем для многих формообразовательных процессов на основе активности эпителиев такие взаимодействия имеют место и весьма существенны. Так, в развитии почки конечности у позвоночных именно взаимодействие эктодермы с подлежащей мезодермой определяет характерный паттерн — проксимо-дистальную последовательность формирующихся костей [16, 23].

Процессы морфогенеза различных придатков кожного покрова — волос, щетинок, чешуек, перьев и т.п., во многом сходные между собой, осуществляются в результате подобного взаимодействия. Формирование

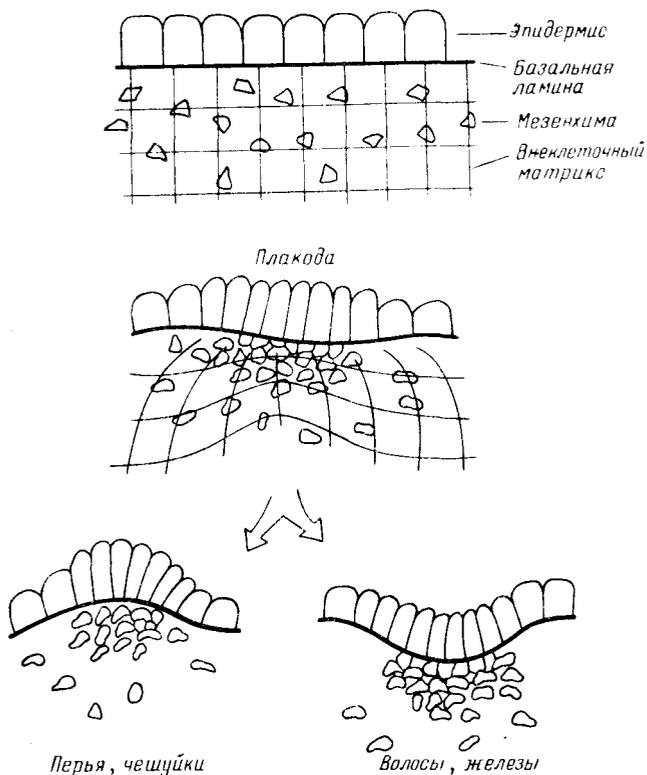


Рис. 47. Схема морфогенезов на основе механо-химической активности клеток эпидермиса

всех этих придатков начинается однотипно — в эпидермисе возникают утолщения (плакоды), под которыми конденсируются клетки мезенхимы [257]. Далее происходит либо выпячивание, либо втягивание эпидермиса, и от этого зависит — какая программа дальнейшего развития будет в нем включена [257] (рис. 47).

Вопрос к теории возникает в связи с наблюдаемым разнообразием макроскопических рисунков кожных структур. Это — гексагональные решетки (перья на спине цыпленка), решетки с прямоугольными ячейками (щетинки на поверхности ножек клопа), наконец — вовсе нерегулярные рисунки расположения щетинок и волосков у насекомых.

Само по себе формирование плакоды, как мы видели в данной главе, вполне может трактоваться на основе механо-химической активности клеток изолированного эпителия. Однако соответствующая модель не в состоянии обосновать наблюдаемые типы макроскопического порядка в расположении плакод. Существенная причина такой ограниченности модели заключается в том, что она содержит лишь единственный характерный размер. Этот размер соответствует радиусу когерентности процесса контактной поляризации клеток $R_p = \sqrt{D\tau}$. Дистантные же взаимодействия в пласте, связанные с упругими силами, в данной модели имеют формально

бесконечный радиус действия. Это обстоятельство отражено в форме нелокального члена $\langle p \rangle$ в уравнении динамики клеточной поляризации (8). Именно эту вырожденность и должен снять учет взаимодействия клеток модельного эпителия с внешним по отношению к пласту мате-риалом.

Кожный покров, к которому мы относим следующее ниже рассмотре-ние, имеет строение, схематически приведенное на рис. 47. Здесь внешний эпителиальный слой клеток – эпидермис – механически сцеплен с подле-жащей дермой через слой внеклеточного матрикса (базальная ламина) и длинные коллагеновые волокна (якорные филаменты). Множество трансплантационных экспериментов [16, 23] обнаруживает существенную роль взаимодействия эпидермиса и дермы в развитии структуры кожного придатков. Эти взаимодействия могут иметь сложный характер, но мы в данном параграфе выделяем и исследуем эффект наиболее прямого, чисто механического взаимодействия.

Пусть модельный клеточный пласт, описанный выше, сцеплен в каждой своей точке с упругой подложкой. Наличие дополнительной упругой связи отражается на условии механического равновесия пласта. В отличие от изолированного пласта, в данном случае упругая возвращающая сила возникает даже при одинаковом смещении u всех его точек. Эта сила про-порциональна абсолютной величине смещения $-qu$, и именно она должна быть добавлена в левую часть условия механического равновесия (4).

Вместо уравнения (4) теперь имеем

$$-qu + \frac{\partial \sigma^{\text{акт}}}{\partial x} + \frac{\partial \sigma^{\text{упр}}}{\partial x} = 0. \quad (51)$$

Здесь q – коэффициент, являющийся характеристикой упругих свойств подложки, пропорциональный ее сдвиговой жесткости.

Вид уравнения динамики клеточной поляризации в форме (3) сохра-няется, но характер распределения деформаций в пласте, а следовательно, и величина упругих напряжений $\sigma^{\text{упр}}$ должны измениться. Новое качество, которое вносит учет дополнительных упругих связей в форме уравнения (51), отражается в дополнительном размерном параметре $R_e^2 = E/q$ [см²]. Этот параметр задает характерную длину экспоненциального спада упругих напряжений в пласте при локальном источнике активной силы $\sigma^{\text{акт}}$.

Считая размер пласта существенно превосходящим величину R_e , по-лучим решение уравнения (51) в виде

$$E \frac{du}{dx} = -ep + \frac{\epsilon}{2R_e} \int e^{-\frac{|x-x'|}{R_e}} p(x', t) dx'. \quad (52)$$

Из него следует выражение для величины продольного напряжения в пласте:

$$\sigma = \frac{\epsilon}{2R_e} \int e^{-\frac{|x-x'|}{R_e}} p(x', t) dx' = \sigma^{\text{акт}} + \sigma^{\text{упр}}, \quad (53)$$

которое после подстановки в уравнение (3) приводит к замкнутому урав-

нению динамики клеточной поляризации в виде

$$\frac{\partial p}{\partial t} = \frac{1}{\tau} f(p) + D \frac{\partial^2 p}{\partial x^2} - \frac{\kappa \epsilon}{2R_e} \int e^{-\frac{|x-x'|}{R_e}} p(x', t) dx'. \quad (54)$$

Данное уравнение совпадает по форме с (II.6), полученным нами ранее эвристическим путем. Ему с чисто формальной стороны было уделено достаточно внимания в гл. II, на результаты которой мы можем здесь опереться.

Примем за исходное состояние с выключенной механо-химической активностью клеток:

$$p \equiv 0, \quad \sigma \equiv 0.$$

Оно, очевидно, удовлетворяет стационарной задаче $p_t = 0$, но вариацией параметров α , R_e , R_p может быть выведено к критической точке потери асимптотической устойчивости, являющейся также и точкой ветвления новых, пространственно-модулированных режимов.

Ограниченность радиуса действия дистантной моды межклеточной связи (экспонента в нелокальном члене уравнения (54)) привносит новое, по сравнению с моделью изолированного пласта, качество. Критической модой теперь является коротковолновая, тьюрингова мода, для которой на длине пласта укладывается несколько длин волн. В отличие от случая изолированного пласта, это число варьирует с изменением названных параметров.

Дисперсионное уравнение для линеаризованной задачи имеет вид

$$\tau \lambda(k) = \alpha - R_p^2 k^2 + \frac{\eta R_e^2 k^2}{1 + R_e^2 k^2}; \quad \eta = \epsilon \kappa \tau. \quad (55)$$

Необходимый как предпосылка тьюринговой неустойчивости рост декремента λ с волновым числом в области малых значений последнего обеспечивается нелокальной компонентой динамики при условии

$$\sqrt{\eta} R_e > R_p. \quad (56)$$

Таким образом, характерный масштаб распространения упругой реакции R_e должен быть достаточно велик по отношению к длине когерентности процесса контактной поляризации клеток R_p .

Каждый из параметров дисперсионного соотношения: α , R_p , R_e , η , а также их комбинации, в принципе могут исполнять роль критического параметра. Простой анализ выражения (55) дает для порога тьюринговой неустойчивости:

$$\mu_{кр} = 0, \quad \mu = \sqrt{\alpha + 2\eta} - \sqrt{\eta} - R_p/R_e. \quad (57)$$

Волновое число критической моды выражается в виде

$$k_{кр}^2 = \sqrt{\eta}/(R_p R_e) - 1/R_e^2. \quad (58)$$

Бифуркация пространственно-модулированных режимов. Анализ околочритического поведения вблизи порога тьюринговой неустойчивости проведем со ссылкой на наши результаты (гл. II), а также результаты, доступные из литературы [59–62, 108, 109].

В общем случае ветвление новых макроскопических состояний в критической точке может быть двух различных типов: докритическое и закритическое (рис. 48). При закритической бифуркации имеет место "мягкий переход" (без скачка) к новому макросостоянию. В этом случае бифуркационный анализ может быть проведен традиционными методами теории возмущений [108, 109]. Получающиеся таким образом стабильные профили $\bar{p}(x)$ оказываются модулированными критической гармоникой $\cos(k_{кр}x)$ с амплитудой, малой в меру близости к порогу неустойчивости.

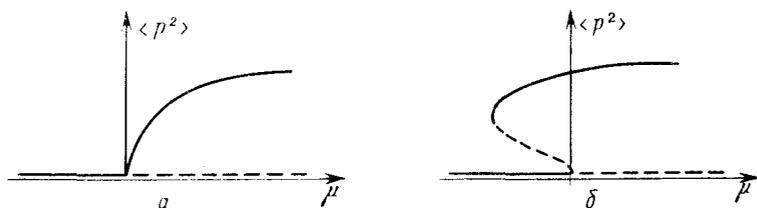


Рис. 48. Вид диаграммы бифуркаций стационарных решений уравнения (54). Сплошные линии – устойчивые ветви; штриховые линии – неустойчивые; а – закритическая бифуркация, б – докритическая бифуркация

На рис. 49 показана эволюция распределения $p(x, t)$ к асимптотическому состоянию $\bar{p}(x)$, полученная для данного случая путем численного решения уравнения (54). Отметим, что при генерации локального, малого по амплитуде начального возмущения исходного состояния эволюция $p(x, t)$ осуществляется путем распространения "волны переброса".

Другой типичный случай картины ветвления – докритическая бифуркация – отличается тем, что новое устойчивое состояние зарождается сразу с конечной амплитудой до порога асимптотической неустойчивости исходного состояния. Форму профиля $\bar{p}(x)$ в данном случае нельзя, как выше, установить путем бифуркационного анализа. Критическая точка $\mu_{кр}$ вообще не является особой для неоднородного распределения. Соответствующая информация доступна главным образом из численного анализа [74]. Однако в частном случае существенного отличия пространственных масштабов: $R_p \ll R_e$, графические, полукачественные методы анализа оказываются вполне информативными (см. например, [64]).

В данном случае асимптотические состояния представляют собой доменные структуры (рис. 50) с относительно узкой переходной зоной ($\Delta x \sim R_p$) между областями полностью поляризованных клеток ($p = 1$) и неполяризованными участками ($p = 0$). Ширины доменов и интервалы между ними не детерминированы параметрами задачи. Определены лишь нижние границы для этих величин [74].

Действительно, если клеточная поляризация индуцируется каким-либо образом локально, подавляющий эффект касательных натяжений пренебрежим, пока мало поляризованных клеток. При этом и если выполнено условие

$$\int_0^1 f(p) dp > 0, \quad (59)$$

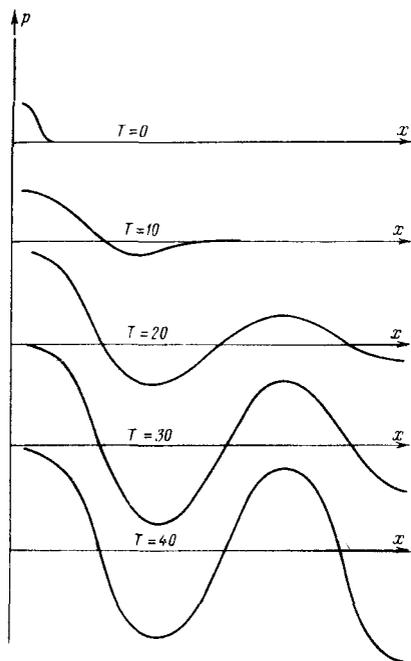
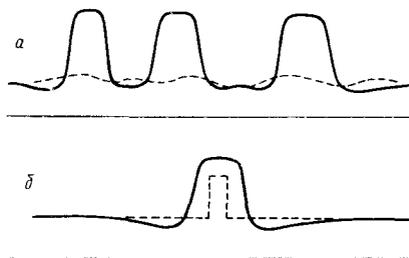


Рис. 49. Установление пространственно-регулярного паттерна клеточной поляризации $\bar{p}(x)$. Численное решение уравнения (54) при закритической бифуркации в окрестности порога тьюринговой неустойчивости. Значения параметров в безразмерных единицах: $D = 5 \cdot 10^{-3}$, $\tau = 5 \cdot 10^{-2}$, $R_e = 0,1$, $f = 4p + 0,3p^2 - 2p^3$

Рис. 50. Стационарные распределения клеточной поляризации доменного типа (уравнение (54)); $R_p \ll R_e$: *a* – в закритической, *б* – в докритической областях бифуркационного параметра μ . Штриховая линия – начальные распределения $p(x, 0)$



эффект контактной поляризации (диффузионный член в уравнении (54)) приводит к расширению поляризованной области путем распространяющегося фронта. Условие (59) хорошо известно как условие распространения "триггерной волны" – стационарного фронта "переброса" [225]. Ограничить это распространение может лишь нарастающий эффект натяжений, определяемый отрицательным нелокальным членом в уравнении (54). Поскольку данный эффект растет от нуля с ростом ширины домена поляризации l_p , он приводит к остановке фронта только при $l_p > l_{\min}$.

Та же причина – касательные натяжения – препятствует инициации новых центров клеточной поляризации в окрестности $\Delta x \sim R_e$ поляризованной области. Тем самым определяется минимальное расстояние между двумя поляризованными доменами. Ниже, в связи с интерпретацией экспериментов по индукции почкования у гидроилов, приводятся результаты численного анализа, подтверждающие представленные качественные соображения.

Хотя в критической точке тьюринговой неустойчивости для пространственно-модулированных макросостояний никаких пороговых эффектов быть не должно, характер распределения $\bar{p}(x)$ по разные стороны от этой точки различается. В области асимптотической устойчивости однородного состояния ($\mu < 0$) поляризованные домены могут сформироваться лишь путем "жесткого" начального возбуждения. В этой области распределение зон клеточной поляризации определяется распределением внешних стимулов. В частности, при одноцентральной стимуляции формируется уединенный домен поляризованных клеток. В закритической области ($\mu > 0$), где

однородное неполяризованное состояние асимптотически неустойчиво, специального внешнего возбуждения активности клеток не требуется. Расчленение на поляризованные и неполяризованные зоны пласта возникает самопроизвольно из флуктуационных возмущений. Устанавливающиеся в результате макроскопические паттерны $\bar{p}(x)$ при этом, вообще говоря, нерегулярны [65]. Ни ширины поляризованных доменов, ни промежутки между ними не фиксированы однозначно. В то же время такие макросостояния не являются и хаотическими, поскольку обе названных величины имеют определенные нижние пределы [64, 65].

Предсказать, какой тип ветвления — докритический или закритический — имеет место, можно, исходя из значений коэффициентов нелинейного разложения функции $f(p)$, а также временных показателей λ для второй гармоники $\text{exr}(2ik_{\text{кр}}x)$. Последняя оказывается сцепленной с критической $\text{exr}(ik_{\text{кр}}x)$ в решении нелинейной задачи (54).

Закритическая бифуркация имеет место, если выполнено условие существенной невырожденности [258]

$$\Delta\lambda = |\lambda(2k_{\text{кр}}) - \lambda(k_{\text{кр}})| > \beta^2/\gamma. \quad (60)$$

Здесь параметры β и γ являются коэффициентами разложения функции $f(p)$:

$$f(p) \approx \alpha p + \beta p^2 - \frac{\gamma}{3} p^3. \quad (61)$$

В обратном случае

$$\Delta\lambda < \beta^2/\gamma \quad (62)$$

бифуркация неоднородных состояний в точке тьюринговой неустойчивости становится докритической [258].

Из уравнения (55) выясняется, что левые стороны неравенств (60), (62) определены отношением R_p/R_e . В случае, если эта величина близка к единице, условие (60) удовлетворяется при конечных значениях β и γ . В этом случае имеем закритическую бифуркацию пространственно-модулированных распределений $\bar{p}(x)$, обладающих совершенным дальним порядком (пространственной периодичностью). Напротив, когда $R_p \ll R_e$, разница $\Delta\lambda$ мала. Поэтому для любых конечных величин β и γ выполнено условие докритической бифуркации неоднородных распределений $\bar{p}(x)$. Паттерны клеточной поляризации, как уже отмечалось, в данном случае не обладают строгой пространственной периодичностью.

Обобщение модели на случай двумерного пласта. Как и в одномерной модели, учет упругих внешних связей плоского пласта сводится к добавлению члена, соответствующего внешней силе, в уравнение механического равновесия (39). Эта сила теперь пропорциональна вектору смещения u так, что новое условие механического равновесия имеет вид

$$-qu_i + \frac{\partial \sigma_{ik}^{\text{акт}}}{\partial x_k} + \frac{\partial \sigma_{ik}^{\text{упр}}}{\partial x_k} = 0. \quad (63)$$

Уравнение динамики клеточной поляризации выглядит по-прежнему как (38). На его основе замкнутое описание эволюции распределения $\bar{p}(r, t)$ получаем следующим образом.

Имея в виду равенство [222]

$$\text{Sp } \sigma_{ik}^{\text{упр}} = \frac{E}{1 - \sigma} \text{div } \mathbf{u}, \quad (64)$$

действуем оператором div на уравнение (63). Таким образом получаем уравнение для следа тензора напряжений:

$$-\Omega + R_e^2 \Delta \Omega + a \Delta p = 0, \quad (65)$$

где

$$\Omega = \kappa \text{Sp } \sigma_{ik}^{\text{упр}}, \quad R_e^2 = \frac{E}{q(1 - \sigma^2)}, \quad a = \frac{\epsilon \kappa E}{q(1 - \sigma)}.$$

Решение (65) выглядит следующим образом:

$$\Omega = \frac{a}{\pi R_e^2} \int K_0 \left(\frac{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|}{R_e} \right) \Delta p(\mathbf{r}', t) d^2 \mathbf{r}'. \quad (66)$$

Здесь K_0 — функция Грина оператора $-\omega + \Delta \omega \cdot R_e^2$ (функция Макдональда).

Чтобы избавиться от дифференциального оператора в интеграле (66), проводим следующие преобразования:

$$\int K_0 \Delta p = \int K_0 \text{div}(\nabla p) = \int \text{div}(K_0 \nabla p) - \int \nabla K_0 \nabla p. \quad (67)$$

Первый интеграл в правой части приводится к интегралу по внешнему контуру l :

$$\int \text{div}(K_0 \nabla p) d^2 \mathbf{r}' = \oint_l K_0 (\mathbf{n} \nabla p) dl,$$

и равен нулю ввиду предполагаемого граничного условия для p :

$$\nabla_n p|_l = 0. \quad (68)$$

Второй интеграл преобразуем аналогичным образом:

$$-\int \nabla K_0 \nabla p = -\int \nabla(p \nabla K_0) + \int p \Delta K_0 = -\oint_l \mathbf{n} p \nabla K_0 dl + \int p \Delta K_0 d^2 \mathbf{r}'. \quad (69)$$

В нашей плоской задаче функцией Грина оператора $-\omega + R_e^2 \Delta \omega$ является $K_0(\rho)$ — цилиндрическая функция мнимого аргумента (функция Макдональда). При больших ρ она убывает по закону $K_0 \sim \sqrt{\pi/2\rho} e^{-\rho}$. Поэтому контурным интегралом в (69) можно пренебречь, если размеры пласта достаточно велики по сравнению с R_e . Далее, замечая, что функция K_0 удовлетворяет уравнению

$$-K_0 + R_e^2 \Delta K_0 = -R_e^2 \delta(\rho),$$

получим

$$\int p \Delta K_0 d^2 \mathbf{r}' = -p + \frac{1}{R_e^2} \int K_0(\rho) p(\mathbf{r}', t) d^2 \mathbf{r}'.$$

Возвращаясь с найденным выражением для Ω в уравнении динамики $p(\mathbf{r}, t)$

(38), окончательно имеем

$$\frac{\partial p}{\partial t} = \frac{1}{\tau} \tilde{f}(p) + D \Delta p - \frac{\kappa \epsilon (1 + \sigma)}{R_e^2} \int K_0 \left(\frac{|r - r'|}{R_e} \right) p(r', t) dr'; \quad (70)$$

$$\tilde{f} = f + \epsilon \kappa (\sigma - 2) p.$$

Для анализа критического поведения в рамках уравнения (70) существенно, во-первых, что интегральный оператор в нем имеет те же собственные функции, что и оператор Лапласа Δ , а именно e^{ikr} . Во-вторых, дисперсионное уравнение соответствующего линеаризованного уравнения совпадает с дисперсионным уравнением одномерной модели и имеет вид (55). Наконец, критическая точка тьюринговой неустойчивости, в которой определено значение только абсолютной величины волнового вектора k , автоматически оказывается вырожденной по направлениям этого вектора.

Если на данную ориентационную вырожденность не накладывается вырожденность по значениям волнового числа, т.е. выполнено условие (60), то решение уравнения (70) вблизи критической точки представляется в общем виде суперпозицией:

$$\bar{p}(r) = \sum_I W_I e^{ik_I r}; \quad |k_I| = k_{кр}. \quad (71)$$

Отбор ограниченного числа направлений I плоских волн в суперпозиции (71) осуществляет нелинейность функций f . Нетрудно убедиться, что член второго порядка в разложении (61) оставляет лишь тройки одномерных гармоник $e^{ik_I r}$, $I = 1, 2, 3$, волновые векторы которых образуют правильный треугольник [258, 60]:

$$\sum_{I=1}^3 k_I = 0.$$

Тем самым двумерные паттерны клеточной поляризации $\bar{p}(r)$ должны представлять собой регулярную гексагональную решетку [258, 60]. Близкую к (70) в формальном отношении математическую модель реакционно-диффузионного типа анализировал численно Балабеков [259]. Ему удалось получить регулярные ячеистые паттерны, однако объем проделанной вычислительной работы пока недостаточен, для того чтобы надежно установить тип решетки.

Следствием ориентационной вырожденности тьюринговой точки является докритический характер зарождения таких состояний [60, 258]. Более детальный бифуркационный анализ здесь не требуется, поскольку он ничем не отличается от такового для реакционно-диффузионных моделей, доступного из литературы [258, 60].

Если же критическая точка дополнительно вырождена по значениям волнового числа, т.е. $R_p \ll R_e$, то паттерны $\bar{p}(r)$ трансформируются так же, как для одномерного случая. При этом характерно нарушение регулярности и ограничения снизу для размеров поляризованных доменов и расстояний между ними [65, 74].

Биологическое обсуждение. Ситуации, в которых в эпителиальных пластах, сцепленных с подстилающим матриксом, форми-

руются макроскопические паттерны поляризованных клеток, весьма типичны для эмбриогенеза. В данном обсуждении мы коснемся двух примеров.

1. Морфогенезы покровных структур. Процессы закладки различных структур кожного покрова — волос, щетинок, перьев, желез, чешуек — осуществляются в результате взаимодействия эпидермиса с клетками мезенхимы в подстилающей дерме [257]. Формирование всех этих придатков начинается с вычлнения плакод в эпидермисе [257]. Соответствующий паттерн определяет макроскопическую организацию последующего морфогенеза.

Наблюдаемые характерные типы пространственной упорядоченности зачатков кожных структур представляют собой либо регулярные решетки (например, гексагональное расположение перьев), либо пространственно нерегулярные паттерны (волоски, щетинки). Отмечено, что формирование гексагональной решетки плакод, как в случае морфогенеза перьевых зачатков, происходит не одновременно на всей поверхности кожи зародыша, но путем распространения фронта от позвоночника в латеральном направлении [260]. Для паттернов нерегулярного типа, как отмечалось, хотя нельзя выделить определенного пространственного периода, представление о хаотическом размещении зачатков также несправедливо, ибо расстояния между отдельными зачатками ограничены снизу и сверху [74].

В литературе на основании факта существования промежутков между зачатками кожных структур делается вывод о существовании "полей ингибирования" в окрестности каждого зачатка [74]. Мы в результате проведенного исследования можем указать физическую природу "ингибиторного поля". В окрестности сформировавшейся эпидермальной плагоды возникновение другой подавляющей вследствие тангенциальных натяжений. При этом отношение двух характерных длин модели R_p/R_e задает тип макроскопической упорядоченности в распределении плакод.

Когда это отношение близко к единице, из модели естественным образом вытекают наблюдаемые черты процесса формирования гексагональной решетки перьевых зачатков, в том числе его последовательный характер. Предположения о "детерминационных волнах" или "запрограммированной последовательности развития зачатков", обычно вводимые в связи с таким характером [260], на наш взгляд, излишни и неоправданны.

Нерегулярные распределения плакод, как, например, при морфогенезе волосяного покрова, также выводятся из предложенной модели, но уже при отношении R_e/R_p , существенно превосходящем единицу. При этом даже однозначный радиус подавляющего действия натяжений приводит к макроскопическим распределениям плакод с нефиксированными, но ограниченными сверху и снизу расстояниями.

2. Эксперименты по индукции почкования на морских гидроидах [256]. Пликкерт в опытах с использованием механической стимуляции почкования гидроидов [256] наглядно показал проявление "полевых" черт морфогенеза. Эти опыты интересны для нас еще и тем, что позволяют сделать некоторые количественные оценки параметров модели.

Стимулом для развития нового побега в колонии гидрополипа может быть простой механический нажим на основной ствол. При таком же действии сразу в двух местах наблюдается следующая "интерференционная"

картина (рис. 51). При нажимах в близких точках (< 150 мкм) генерируется только одна почка, причем расположенная между местами воздействия. Таким образом, оказывается, что локализация внешнего стимула не совпадает с локализацией морфогенетического отклика на него. Это свидетельствует о том, что процесс морфогенеза становится существенно автономным после внешней инициации. Внешний иницирующий сигнал включает коллективный клеточный процесс, исход которого определяется не столько самим сигналом, сколько свойствами реагирующего клеточного материала.

При увеличении расстояния между точками внешней индукции снова формируется одна растущая почка, но локализована она уже на одном из мест воздействия. Отклик в месте приложения второго индуцирующего сигнала подавляется. На еще больших удалениях оба стимула оказываются результативными.

Отмечалось, что первым наблюдаемым событием при почковании гидроидов является формирование домена колонообразных клеток в эктодерме столона [261]. На этом основании мы можем пытаться интерпретировать приведенные результаты в рамках представленной модели самоорганизующейся механо-химической активности клеток — модели I. Результаты, полученные путем численного решения уравнения (54) при разных вариантах начальных условий и приведенные на рис. 52, показывают, что модель в состоянии интерпретировать наблюдаемую картину.

Качественное объяснение результатов численного анализа таково. При малом взаимном удалении начальных очагов поляризации (порядка или меньше длины когерентности процесса контактной поляризации R_p) путем контактного переноса происходит индукция механической активности в области между местами инициации. Затем зона клеточной поляризации сужается вследствие нарастающих тангенциальных натяжений. Если же расстояние между начальными стимулами к поляризации больше характерной длины R_p , но не превышает характерного радиуса распространения упругой реакции R_e , то определяющим оказывается именно эффект взаимного подавления очагов поляризации. При удалении на расстояния, превышающие R_e , индуцированные очаги поляризации ведут себя независимо.

Из приведенной интерпретации следует оценка для двух характерных размеров, являющихся основными феноменологическими параметрами модели: $R_p \lesssim 150$ мкм, $R_e \approx 280$ мкм.

Общее обсуждение. Надклеточная организация морфогенетической активности клеток эмбриональных эпителиев осуществляется путем предварительного упорядоченного разбienia ткани на зоны морфологически поляризованных и изотропных клеток. В основе исследованного механизма самоорганизации надклеточного порядка лежит способность к активной деформации зародышевых клеток и межклеточная координация данной формы активности. Цель проведенного в данной главе исследования состояла в выяснении вопроса, каким образом осуществляется глобальная координация процессов клеточного уровня.

Совокупность экспериментальных данных позволяет постулировать следующие элементарные свойства клеточного материала зародышевых эпителиев. 1. Механическая активность индивидуальных клеток — их способность к стандартной самопроизвольной деформации, обеспечивае-

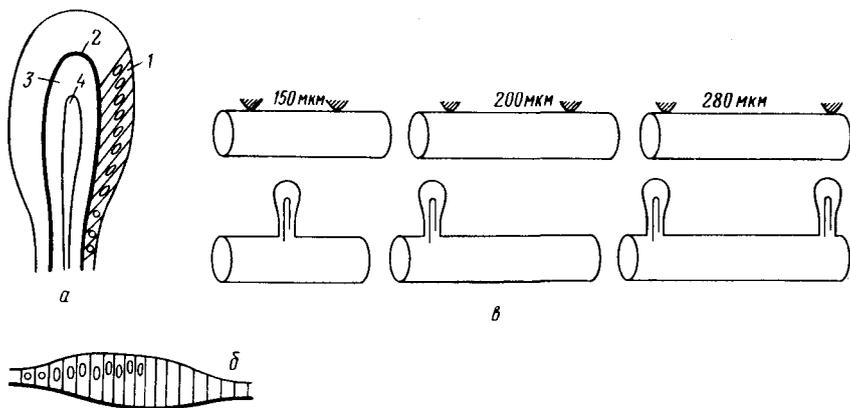


Рис. 51. Схема опытов по механической индукции почкования у гидрофил [256]: *a* – схематическое строение растущей почки гидрофила; 1 – эктодерма, 2 – базальная мембрана, 3 – энтодерма, 4 – гастроль; *б* – формирование домена столбчатых клеток (плакоды) в эктодерме – первый шаг в процессе почкования; *в* – два близко расположенных механических стимула индуцируют один общий зачаток; при удалении стимулов только один из них индуцирует почку; на расстоянии около 300 мкм и более каждый из стимулов индуцирует почку

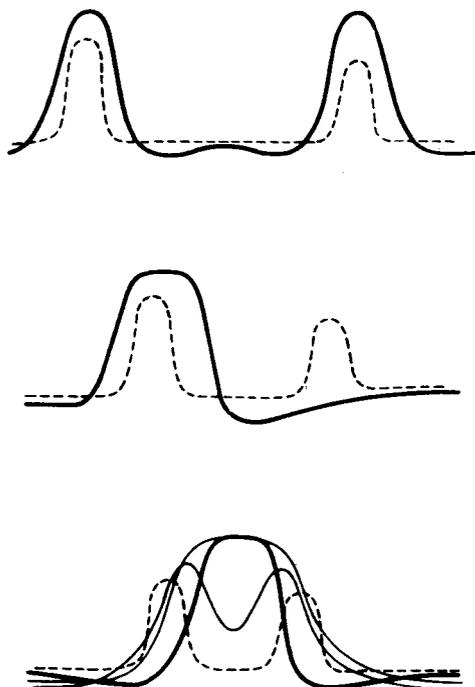


Рис. 52. Интерпретация экспериментов Пликкерта [256] в рамках математической модели (54). Результат численного решения уравнения (54) при $D = 5 \cdot 10^{-3}$; $\tau = 5 \cdot 10^{-2}$, $R_e = 0,4$, $f(p) = 0,5p + 15p^2 - 10p^3$. Жирные линии – асимптотические состояния $\bar{p}(x)$, тонкие – промежуточные профили $p(x, t)$, штриховые – начальные распределения $p(x, 0)$

мая метаболической энергией. 2. Ближние межклеточные взаимодействия, обуславливающие контактный перенос механической активности по клеточному слою. 3. Генерация упругих натяжений в пласте при активных деформациях клеток. 4. Отрицательный контроль механической активности тангенциальными натяжениями в пласте.

На основе этих свойств построена формальная математическая модель коллективной динамики механической активности клеток. Анализ модели позволяет параметризовать спектр макросостояний групповой активности клеток небольшим числом феноменологических параметров. Помимо пара-

метров, характеризующих внутриклеточный контроль активности (в математической модели — параметры функции $f(p)$), это два характерных пространственных масштаба R_p и R_e , определяющих длину когерентности процесса контактной поляризации и радиус распространения упругой реакции в пласте соответственно.

Из названных параметров составляется совокупный — бифуркационный параметр (μ), значением которого определяется режим групповой активности клеток.

В случае сопоставимых величин R_p и R_e групповое поведение клеток характеризуется глобальным дальним порядком и обусловливается неустойчивостью механически равновесного состояния по отношению к коллективной (тьюринговой) моде механической активности. Данной неустойчивостью спонтанно (без пространственно-упорядоченного внешнего воздействия) генерируется макроскопический паттерн механически активных клеток, в котором зоны клеточной поляризации организованы в виде пространственно-регулярной решетки.

В случае существенной диспропорции характерных длин: $R_p \ll R_e$, макросостояния клеточной активности лишены, вообще говоря, дальнего порядка. Однако некоторые черты ближнего порядка сохраняются. Они выражаются в подавлении формирования более чем одного домена поляризованных клеток в пределах областей с линейными размерами $\leq R_e$. Подавление механической активности есть результат упругих натяжений в окрестности поляризованного домена.

В обоих случаях переход к режимам групповой активности клеток в двумерном пласте является гистерезисным вследствие докритического характера бифуркации механически равновесного состояния пласта.

Выводимые из модели макроскопические паттерны клеточной поляризации передают качественные черты организации пространственного размещения зачатков при морфогенезах покровных структур. При этом, согласно предложенной теории, ведущая роль в разметке покровных морфогенезов приписывается механической активности эпидермальных клеток. В то же время влияние подстилающего слоя дермы на групповое поведение клеток эпидермиса учтено в параметре q . Этим параметром определяется характерный радиус дистантных межклеточных взаимодействий R_e . От величины R_e , в свою очередь, зависит как значение бифуркационного параметра μ , управляющего включением групповой активности клеток, так и геометрический тип устанавливающегося макроскопического паттерна (через отношение R_p/R_e). Вероятно, этим можно объяснить факты, свидетельствующие о роли дермы в формировании паттерна кожных зачатков [23]. При комбинации дермы и эпидермиса из разных источников характер формирующегося паттерна соответствует тому источнику, из которого бралась дерма [23]. Более детальное сопоставление теории с этими данными пока не проводилось.

Хотя, после введения в гл. I понятия морфогенетического поля, мы почти нигде в данной работе не оперировали этим понятием, выяснить его физический смысл было одной из наших общих целей. Под "полевым" аспектом развития подразумевается координированность развития клеток в пределах областей, охватывающих 10^2 – 10^3 клеток. Именно морфогенетическое поле определяет пространственный контроль развития на

элементарном уровне самоорганизации надклеточного порядка в эмбриогенезе (см. гл. I). Наиболее общим выражением названной координации являются отношения "доминирования", когда каким-либо образом (самопроизвольно, в результате индукции или вследствие предсуществующей неоднородности) вычленяется группа клеток, которая в дальнейшем развитии формирует специфический зачаток и подавляет такую же способность в своем окружении. Результатом этого оказывается пониженная симметрия детерминированного состояния по отношению к компетентному (см. § I.1).

Такая форма межклеточной координации обеспечивается, как утверждает предложенная теория, двумя модами межклеточных взаимодействий в зародышевых эпителиях: ближними — контактным переносом механической активности клеток, и дальними, опосредованными упругими напряжениями в пласте. Именно последним отводится роль подавления, т.е. роль необходимой для самоорганизации макросостояния с пониженной симметрией отрицательной обратной связи. На том основании, что вычленение плакод в эпителиальных пластах является едва ли не универсальным механизмом первичной организации морфогенеза (§ IV.1), мы считаем, что предложенной модели можно приписать значение общей физической модели морфогенетического поля.

Конкретные проявления полевого поведения наглядно выражены в экспериментах по индуцированному почкованию в колониях морских гидридов [256]. Сопоставление экспериментальной картины с результатами численного анализа предложенной модели дает хорошее согласие и позволяет сделать оценки определяющих параметров модели R_p и R_e .

Среди полевых черт развития отдельного внимания заслуживает свойство масштабной инвариантности, когда пропорции структур, развивающихся в редуцированных или, напротив, увеличенных по размерам (в результате хирургического вмешательства на ранних этапах развития) зародышах, совпадают. Наиболее ясная картина данного явления, описанная на клеточном уровне, составлена из экспериментов на зародышах морского ежа [213]. Анализируя эту картину, можно прийти к выводу, что соответствующий механизм относится к первичной разметке морфогенеза на стадии вычленения вегетативной зоны поляризованных клеток (поздняя бластула). Адекватная картина в теории получается в вырожденном случае клеточного пласта, свободного от упругих связей с подложкой (§ IV.2, IV.3). Главный вывод из проведенного для данного случая математического анализа состоит в том, что доля поляризованных клеток в пласте не зависит от его полного размера. При вычислении единственного домена поляризованных клеток (это макросостояние выделено, ибо является единственным асимптотически устойчивым) данная инвариантность означает одновременно инвариантность геометрических пропорций паттерна клеточной поляризации. Именно таков, как мы считаем, первичный механизм, обуславливающий свойство масштабной инвариантности, характерной для регуляции по типу морфаллаксиса.

Предсказания модели и постановка нового эксперимента. Как и обычно, при формулировке теоретической модели мы преследовали цель связать одну группу данных с другой. Данные по процессам клеточного уровня (механо-химическая активность клеток,

контактная поляризация) и модель на их основе позволили лучше понять и описать ключевые процессы на надклеточном уровне (самоорганизация морфогенетической активности в клеточных коллективах).

Однако модель становится рабочей, когда она способна не только объяснить то, что уже установлено, но и предсказать новые явления. Представленная теория допускает такие предсказания, указывая также эффективную тактику эксперимента.

Напомним, что фактором отрицательной обратной связи, контролирующим групповую механическую активность клеток, в теории является упругое натяжение. Релаксация натяжения должна приводить к снятию подавления механической активности и, следовательно, к вовлечению в поляризацию дополнительных клеток. Это можно было бы обнаружить непосредственно на гистологических срезах. Более того, имея в виду, что коллективные процессы на основе механо-химической активности способны играть ключевую роль в пространственной разметке клеточных дифференцировок (§ IV.4, а), можно ожидать и более отдаленных следствий вмешательства в эти процессы. Изменение нормального паттерна клеточной поляризации на ранних этапах развития могло бы приводить к изменению обычной картины распределения дифференцировок в зародыше.

Идея постановки соответствующего эксперимента принадлежит А. Зарайскому [262]. В качестве экспериментальной модели был взят зародыш шпорцевой лягушки на стадии гастрюлы. На этой стадии у амфибий детерминируются области будущих структур осевого комплекса: хорды, сомитов, нервной трубки.

До гастрюляции весь соответствующий клеточный материал располагается в так называемом гипослое эктодермы и в мезодерме [17]. Событием, непосредственно предвещающим гастрюляцию, является интенсивная поляризация клеток — вблизи места будущего впячивания [17]. Именно в этом месте, с целью релаксации механических напряжений в гипослое, проводилось его рассечение.

Как и ожидалось, сразу после операции края разреза расходились, что указывало на предсуществующие упругие напряжения. Уже через 15 мин распределение поляризации в гипослое существенно отличалось от нормы. При этом поляризация отмечалась в местах зародыша, где в норме ее не обнаруживают. В частности, зарегистрирован локализованный домен поляризованных клеток в гипослое на брюшной стороне. Важно, что при проведении операции в довольно широком интервале развития (порядка нескольких часов) и при наблюдении результата вскоре после операции (через 15 мин) регистрируемая картина оказывается качественно сходной.

Но это положение не сохраняется, если после операции зародышу давалась возможность развиваться, а последствия операции оценивались с задержкой (три часа и более). В этом случае в зародыше, оперированном на продвинутой стадии гастрюляции, вдали от места операции не обнаруживалось никаких аномалий развития. Но в зародыше, оперированном в начале гастрюляции, обнаруживается качественно иная картина. Спустя примерно сутки после операции на брюшной стороне такого зародыша формируются аномальные выросты, содержащие под эпителиальной оболочкой сомитоподобные структуры, мезенхимную ткань, а также скопле-

ние ткани, напоминающей нервную. В отдельных опытах зарегистрировано развитие полного осевого комплекса (нервная трубка, хорда, сомиты). Таким образом, зародышевый материал брюшной стороны претерпевал дифференцировки, связываемые обычно с нейтральной индукцией и локализуемые при нормальном развитии на спинной стороне.

Если появление новых зон клеточной поляризации после релаксации упругих напряжений является результатом, непосредственно предсказываемым теорией, то полученный результат, касающийся дифференцировки, в значительной степени неожидан. Его нельзя считать обязательным следствием поведения, описываемого моделью, ибо клеточные дифференцировки вообще не рассматриваются ею. Вместе с тем, на основании ряда косвенных данных мы предполагали связь морфологической поляризации с детерминирующей пути развития клеток (§ IV.4), такую что пространственная разметка дифференцировок определяется распределением в зародыше зон клеточной поляризации. Приведенные здесь данные хорошо согласуются с этим предположением.

Но это не все. Мы убедились, что изменение паттерна поляризации может выражаться в соответствующем изменении картины дифференцировок лишь в соответствующем, ограниченном интервале развития. Новый домен поляризованных клеток, возникший на брюшной стороне зародыша в результате экспериментального вмешательства, не индуцирует новых дифференцировок, если зародыш до вмешательства успел продвинуться в процессе гастрюляции. На ранней гастреле такое же вмешательство и первичный отклик на него оказываются эффективными.

То, что поляризация клеток эффективна лишь в свое, ограниченное время развития, очевидно, связано с ограниченным периодом компетенции к соответствующему выбору пути развития. Напомним в связи с этим, что коллективным процессам на основе МХАК отводится лишь роль в элементарном акте определения места в зародыше, где клетки, при условии и в соответствии с компетенцией, детерминируются на том или ином пути развития. О самой же компетенции мы не можем судить в рамках обсуждаемой теории первичной разметки морфогенеза.

В данном случае, по-видимому, существенна компетенция к хордо-мезодермальным дифференцировкам и, можно думать, именно детерминацией в данном направлении управляет поляризация клеток гипослоя эктодермы. Тогда неэффективность поляризации в гипослое на брюшной стороне зародыша при операции на продвинутой гастреле связана с утратой компетенции к хордо-мезодермальным дифференцировкам на этой стадии. На более ранней стадии (начало гастрюляции), как можно предполагать исходя из полученных результатов, соответствующая компетенция есть как в спинной, так и в брюшной эктодерме.

Конечно, эти предположения необходимо проверять независимыми экспериментами. Ряд таких экспериментов уже поставлен в Институте биоорганической химии АН СССР и в лаборатории проф. Л.В. Белоусова (МГУ), но их обсуждение не входит в предмет настоящей работы. Как бы там ни было, уже сейчас ясно, что предложенная физическая модель открывает новый круг задач, решение которых должно дать лучшее понимание того, как осуществляется макроскопический контроль эмбрионального развития.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Этот раздел мы посвятим обсуждению ряда общих вопросов, адресованных к теории контроля пространственного упорядочения в развитии многоклеточных.

1. Создается ли в эмбриогенезе новая информация? В свое время выход из тупика, в котором оказалось механистическое каузальное понимание развития в результате опытов по эмбриональным регуляциям, был указан новыми не только для биологии, но и для физики идеями о самоорганизации в термодинамически неравновесных системах. В значительной мере именно принципиальные затруднения в понимании движущих сил развития зародыша стимулировали рождение, широкий интерес и как следствие — быстрое развитие синергетики — общей физико-математической теории самоорганизации в неравновесных системах.

Первый и основной вопрос, на который искала ответ синергетика, — это вопрос о спонтанном понижении симметрии макросостояния. Стоит ли этот вопрос в эмбриологии? Усложнение пространственной организации, очевидно, имеет место в развитии многоклеточных организмов. Но имеется и существенная разница между самоорганизацией в традиционных — неорганических — объектах синергетики и самоорганизацией в биологическом морфогенезе.

В первом случае внешние и начальные условия подразумеваются вполне симметричными, а макроскопический порядок устанавливается в результате усиления специфических пространственных мод естественных флуктуаций (порядок через флуктуации). В этом случае за порогом самоорганизации системой запоминается случайный выбор и, в силу этого, ей справедливо приписать создание новой информации. Если бы в ходе развития основных эмбриональных паттернов также запоминался случайный выбор, создавалась новая информация, было бы невероятным наблюдаемое сходство однояйцовых близнецов. Таким образом, по-видимому, верно, что вся информация о макроскопическом строении организма содержится в зиготе и во внешних по отношению к зародышу условиях развития.

Вместе с тем, из опытов по эмбриональным регуляциям следует, что клетки раннего зародыша не содержат никаких инструкций к выбору одного из потенциально возможных направлений специализации, а структуры зрелого зародыша ни в каком виде не предсуществуют на ранних этапах развития. Здесь нет кажущегося противоречия с выводом об отсутствии генерации новой информации в эмбриогенезе. Отдельные клетки раннего зародыша действительно не имеют никакой информации о своей дальнейшей судьбе, но зародыш в целом содержит эту информацию. Она может быть заключена в локальных неоднородностях яйцеклетки, в асимметрии внешних условий.

Более конкретная демонстрация к приведенным высказываниям представлена в § IV.4, где анализируются макроскопические события в раннем развитии зародыша морского ежа. Область активной инвагинации бластулы до вычленения вегетативной зоны поляризованных клеток ничем не выражена. Появление такой выраженности нельзя считать результатом процесса "упорядочения через флуктуации". Возникающая разметка морфогенетической активности клеток бластулы не предсуществует, но

предопределена следующими факторами: 1) изначальной неоднородностью в виде локализованных на вегетативном полюсе микромеров, 2) приобретения всеми клетками эпителиальной стенки бластулы одинакового качества — способности к спонтанной морфологической поляризации; 1) и 2) приводят к локальному запуску клеточной поляризации, который, ввиду отрицательной обратной связи (через упругие натяжения), стабилизируется в однозначно детерминированном макроскопически неоднородном состоянии. Этот механизм не предполагает выхода к порогу асимптотической неустойчивости, и поэтому флуктуации не играют в нем роли. Мы думаем, что это достаточно общее правило для механизмов формирования основных паттернов зародыша. Исключение из него могут составлять структуры типа тонкого рельефа кожи, узора кровеносных сосудов и т.п.

Необходимо подчеркнуть, что описанный механизм, хотя и не связан непосредственно с неустойчивостью тьюрингова типа, предполагает ее возможность в более или менее узкой окрестности параметров. Это очевидно из диаграммы на рис. 43. Соседство с порогом истинной, т.е. вполне спонтанной, самоорганизации удается обнаружить и в эксперименте. Так, бластула морского ежа, лишенная микромеров и в силу этого неспособная к инвагинации в нормальных условиях, приступает к гастрюляции при помещении в раствор соли лития (см. более подробный разбор этого явления в § IV.4); яйцо водоросли фукус в отсутствие естественного поляризующего фактора — света — поляризуется самопроизвольно в случайном направлении.

2. Проблема воспроизводимости морфогенетических структур. Если в первоначальной формулировке проблемы структурообразования в морфогенезе ставился принципиальный вопрос о механизме генерации пространственной неоднородности, то теперь необходимо уяснить, каким образом достигается устойчивое, воспроизводимое формирование надклеточной организации. Такая постановка вопроса вытекает из факта потенциальной множественности различных макросостояний, генерируемых в результате неустойчивости исходного неупорядоченного состояния.

С названным фактом для систем достаточно общего вида, проявляющих способность к самопроизвольному упорядочению, мы неоднократно сталкивались в настоящей работе. Потенциальная множественность упорядоченных макросостояний выявляется и в эксперименте. В частности, в цитированных выше (§ III.7) опытах по трансплантации престолевых клеток в преспоровую область псевдоплазмодия она проявляется в образовании второй морфологической оси. В экспериментах на зародышах насекомых целым рядом неспецифических манипуляций (прокол яйца, ультрафиолетовое облучение, центрифугирование) также удается индуцировать наряду с нормальной полярной организацией личинки биполярные — симметричные структуры (§ I.4). Однако в норме всего этого не происходит и установление паттернов вполне однозначно.

Проблема устойчивого структурообразования возникает и при интерпретации классического явления эмбриональных регуляций. В ходе восстановления правильной структуры — после хирургических операций на зародышах морского ежа — первая фаза регенерационного процесса характеризуется значительной вариабельностью. Лишь завершающий второй этап дает устойчивый результат — эквивалентен (§ IV.4). Аналогично при вос-

становлении правильного пространственного распределения дифференцированных клеток в изолированном фрагменте псевдоплазмодия *D. discoideum* сначала наблюдается более или менее хаотическое распределение (§ III.7).

Обсуждаемая неоднозначность связана со следующим обстоятельством. Как правило, при формировании паттернов клеточной детерминации в однородно компетентной ткани поведение клеток следует закону "все или ничего". Пространственная сегрегация дифференцирующихся клеток разделяет зародыш на геометрические компартменты без каких-либо промежуточных состояний в пограничных областях (например, компартменты в эпидермисе насекомых). Узость переходной области, по отношению к размерам компартментов, делает проблематичным устойчивое воспроизведение паттернов при независимой генерации, ибо клеткам выделяющихся компартментов должно быть безразлично местоположение границ раздела. Тем самым макроскопическая картина пространственной сегрегации клеток оказывается недетерминированной.

Каким образом преодолевается указанная неопределенность? С двумя возможными механизмами такого преодоления мы имели дело в настоящей работе. Один — реализуется при установлении паттерна детерминации клеток в псевдоплазмодии *D. discoideum* (§ III.5, III.6). Суть здесь состоит в разделении механизмов контроля объемных долей дифференцированных клеток и их пространственного упорядочения. Воспроизводимость структуры сегрегации клеток обеспечивается в данном случае асимметрией граничных условий, задающей ось направленных перемещений клеток. Двухморфогенная система регуляции дифференцировки контролирует лишь средние доли клеточных типов, но не их макроскопическое распределение.

Второй путь устойчивой генерации макроскопической упорядоченности опирается на предсуществующую неоднородность (§ IV.4 и п. 1 настоящего параграфа). В данном случае устойчивое формирование паттерна обуславливается устойчивым расположением в зародыше локального триггера механо-химической активности клеток. При этом в теории последний исполняет только роль запуска коллективного процесса клеточной поляризации, который уже сам, в силу отрицательной обратной связи, ограничивает свое распространение. Никакой функции разметки зародышевой ткани фактору внешней стимуляции активности ее клеток не приписывается — описываемый коллективный процесс включает в себя все необходимое и достаточное для самоорганизации в пространстве.

3. Химические градиенты, позиционная информация и механизм самоорганизации пространственного порядка на основе механо-химической активности клеток. Идея о самоорганизующихся химических градиентах, задающих позиционную информацию в морфогенетическом поле, введена в круг ключевых идей теории морфогенеза Тьюрингом. За тридцать лет своего существования эта идея не была опровергнута ни теоретически, ни экспериментально. Тем не менее она переживает кризис. Обнаружить гипотетические морфогены оказалось чрезвычайно сложной экспериментальной задачей. Но даже для тех объектов, где эта задача решена (гидра, псевдоплазмодий *D. discoideum*), прямое участие выделенных морфогенов в пространственной регуляции развития вызывает большие сомнения.

Конкурирующая модель самоорганизации пространственного порядка в клеточных коллективах опирается на механо-химическую активность зародышевых клеток (гл. IV). К достоинствам этой модели мы относим то, что названная активность не является гипотетической, но непосредственно регистрируется в гистологических наблюдениях и характеризуется контролируемыми и экспериментально измеряемыми параметрами. Сопровождающие морфологическую поляризацию клеток локальные и дистантные моды межклеточной связи (контактная поляризация и упругие напряжения соответственно) также надежно документированы в экспериментах.

На этой основе удается построить формальную модель, позволяющую выяснить, каким образом коллективное поведение клеток порождает макроскопическую упорядоченность. Насколько универсален данный механизм? В многочисленных вариантах трансплантационных экспериментов с зародышами убедительно показано, что механизм организации пространственного порядка должен быть общим для различных эмбриональных полей. Это обстоятельство в эмбриологической литературе принято относить на счет универсальности механизма спецификации позиционной информации. Против этого трудно что-либо возразить. Однако мы в проведенном исследовании нигде не сталкивались с необходимостью самого введения гипотезы "позиционной информации".

Вместо этого принималось, что упорядоченное в пространстве включение той или иной формы активности зародышевых клеток является продуктом коллективных процессов в группах взаимодействующих клеток. Здесь есть некоторая разница в логике. Модель позиционной информации ориентирует на поиск и исследование некоторого гипотетического поля — поля "позиционных значений", в которое погружены пассивные при формировании этого поля клетки. Названная альтернативная схема объяснения акцентирует внимание на групповых чертах динамики клеточных коллективов, выводя эти черты из более элементарных свойств клеточного материала. Исследование этих черт завершается построением диаграммы макросостояний (см. примеры в § III.3 и IV.4), которая позволяет указать не только макроскопическую организацию, характерную для естественного развития, но и возможные варианты, могущие реализоваться в экспериментах с зародышами.

Универсальность предложенного механизма пространственной самоорганизации обосновывается наблюдаемым в трансплантационных экспериментах переносом активных деформаций зародышевых клеток между нормально неконтактирующими тканями (рис. 36).

4. Проблема метамерии. С этим распространенным типом пространственного порядка в развивающемся зародыше (сомиты — у позвоночных, сегменты — у насекомых) мы имели дело в § IV.5. Механизм генерации пространственно регулярных структур предполагает неустойчивость с пространственно периодической коллективной модой (тьюрингов тип неустойчивости). Однако и теоретический анализ, и более детальные наблюдения указывают на необходимость определенных дополнений к этому механизму.

В расчетах выяснилось, что требования к воспроизводимости начальных условий и значений параметров для воспроизводимого формирования пространственно периодических паттернов через неустойчивость кол-

лективной моды могут оказаться слишком жесткими [111, 263]. В конкретных численных экспериментах даже малые возмущения начальных условий могли быть причиной существенных отклонений в структуре асимптотического состояния — формировалось 5 или 7 вместо 6 субдоменов. При этом спектр варибельности структур тем шире, чем больше число повторяющихся элементов в структуре [111]. Таким образом, тьюрингов механизм может отвечать требованию воспроизводимости только для относительно малых чисел таких элементов. Числа 12 (сегментов в эпидермисе плодовой мушки) и тем более — 25 (сомитов у зародышей амфибий) лежат явно за пределами указанных ограничений. Тем не менее эти числа генерируются в развитии с высокой воспроизводимостью. Очевидно, такие структуры должны формироваться каким-то иным способом, нежели одноактное возбуждение коллективной моды.

Наблюдения реального развития и коллективы с зародышами проясняют этот вопрос. При сегментации мезодермы показано, что активной сомитообразующей зоной является участок протяженностью лишь в два-три сомита. Эта активная зона перемещается по мере эпителизации стенки сомитов в кранио-каудальном направлении так, что в каждый данный момент времени процесс сегментации охватывает относительно малую долю полного объема сегментирующейся ткани. В пределах этой ограниченной зоны механизм тьюринговой неустойчивости на основе коллективной механо-химической активности клеток (§ IV.5) способен обеспечить воспроизводимое структурообразование.

В другом примере, при сегментации бластодермы зародыша насекомых, членение — также событие не одноактное, но растянутый в развитии ступенчатый процесс [252]. Однако в отличие от сегментации мезодермы, на всех последовательных шагах этого процесса весь зародыш вовлечен в сегментацию. При этом на каждом очередном шаге не осуществляется переход из гомогенного в структурированное состояние, а происходит смена структуры, соответствующая монотонному понижению длины волны тьюринговой моды. Такой ход сегментации также может быть обеспечен необходимой устойчивостью.

5. Дальнейшие задачи теории. В феноменологических моделях настоящего исследования мы ограничивались очень схематичным представлением о механо-химической активности клеток. Способность к спонтанным деформациям выражалась локальной функцией динамики с характерным для бистабильных динамических режимов видом. Такого представления вполне достаточно для тех вопросов, которые ставились в работе. Но, очевидно, что это не более чем простейший вариант формального представления. Очевидно также, что для понимания движущих сил выделенных форм активности индивидуальных клеток необходимо разрабатывать более последовательную теорию. Эти силы должны быть обоснованы теперь уже на микроскопическом уровне.

Уже сейчас мы знаем о микроскопических событиях, сопровождающих активные деформации клеток, значительно больше, чем понимаем. Назовем некоторые существенные факты, проливающие свет на природу механической активности клеток.

Самопроизвольная морфологическая поляризация клеток определено связана с входящим в клетку из окружающей среды кальцием. На этот

счет есть множество экспериментальных данных, полученных как на одиочных клетках [131, 264], так и на зародыше в целом в периоды его повышенной морфогенетической активности [265].

В ряде случаев показано, что морфологическая поляризация сопряжена и, возможно, генерируется их электрической поляризацией [266, 267]. Соответствующая ЭДС возникает вследствие неоднородного распределения мембранных белков, модулирующих транспорт ионов — ионных каналов и АТФ-зависимых ионных насосов [268].

Эти белки латерально подвижны и, будучи заряженными, могут перемещаться при наличии латерального градиента трансмембранного потенциала [269, 270].

Концентрация свободного цитоплазматического кальция регулируется не только трансмембранным переносом, но и, в значительной степени, его обратимым связыванием со специфическими группами ряда белков в цитоплазме [271, 272]. При этом процесс диссоциации имеет автокаталитический характер.

Связывание кальция обуславливает его низкую, по сравнению с другими малыми ионами, диффузионную подвижность и, вследствие этого, возможность поддержания значительных градиентов в пределах клетки.

Элементы цитоскелета высокочувствительны к концентрации свободного кальция в цитоплазме (Са-индуцируемая деградация микрофиламентов и микротрубочек, активируемое кальцием сокращение актинового цитогеля). Поэтому неоднородное распределение кальция может вызывать как реорганизацию цитоскелета, так и локализованную сократительную активность [273, 274].

В совокупности приведенных фактов усматривается наличие в динамике кальция обратных связей. Продуктом этих связей может быть, в частности, и спонтанная электрическая поляризация клетки, а также более сложные пространственно-временные режимы автоволнового поведения, свойственные активным средам. Такие режимы действительно проявляются в отдельных клетках и клеточных коллективах и играют существенную роль в организации развития многоклеточных организмов.

В данной области физическая теория должна прояснить природу различных наблюдаемых форм механо-химической активности клеток, но пока еще предстоит сделать много больше, чем уже сделано.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоусов Л.В. Введение в общую эмбриологию. — М.: Изд-во МГУ, 1980. — 210 с.
2. Дриш Г. Витализм, его история и система. — М.: ИЛ, 1915.
3. Гленсдорф П., Пригожин И. Термодинамическая теория структуры, устойчивости и флуктуаций. — М.: Мир, 1973. — 280 с.
4. Николис Г., Пригожин И. Самоорганизация в неравновесных системах. — М.: Мир, 1979. — 512 с.
5. Хакен Г. Синергетика. — М.: Мир, 1980. — 404 с.
6. Нейфах А.А., Лозовская Е.Р. Гены и развитие. — М.: Наука, 1984.

7. *Garcia-Bellido A., Lawrence P.A., Morata G.* // *Sci. Am.* – 1979. – V. 35. – P. 90–98.
8. *Morata G., Lawrence P.A.* // *Nature.* – 1977. – V. 265. – P. 211–216.
9. *Chan L.N., Gehring W.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1971. – V. 68. – P. 2217–2221.
10. *Kauffman S.A.* // *Science.* – 1973. – V. 181. – P. 310–318.
11. *Kauffman S.A.* // *Phil. Trans. Roy. Soc. London. B.* – 1981. – V. 295. – P. 567–594.
12. *Gehring W., Nöthiger R.* // *Developmental system. Insects* / Eds. S. Couce, C.H. Waddington. – N.Y.: Acad. Press, 1973. – P. 211–290.
13. *Gardner R.L.* // *Genetic Mosaics and Cell Differentiation* / Eds. W. Gehring. – N.Y.; Berlin: Springer Verlag, 1978. – P. 205–241.
14. *Hillman N., Sherman M.L., Graham C.* // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – 1972. – V. 28. – P. 263–278.
15. *Kelly S.I.* // *J. Exp. Zool.* – 1977. – V. 200. – P. 365–376.
16. *Alberts B., Bray D., Lewis J. e.a.* // *Molecular Biology of the Cell.* – N.Y.; London: Garland Publ. Inc., 1983. – P. 1146–1983.
17. *Бодемер Ч.* Современная эмбриология. – М.: Мир, 1971. – 446 с.
18. *Плмensee К.* // *Insect development.* – Oxford: Blackwell, 1970. – P. 76–96.
19. *Hadorn E.* // *Symp. Soc. Devel. Biol.* – 1966. – V. 25. – P. 85–104.
20. *Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернаевский Д.С.* Математическое моделирование в биофизике. – М.: Наука, 1975. – 305 с.
21. *Postlethwait J.H., Schneiderman H.A.* // *Ann. Rev. Genet.* – 1973. – V. 7. – P. 381–444.
22. *Brown D.D.* // *Cell.* – 1984. – V. 37. – P. 359–365.
23. *Дьюкар Э.* Клеточные взаимодействия в развитии животных. – М.: Мир, 1978. – 330 с.
24. *Holtfreter J.* // *Growth Symp.* – 1951. – V. 10. – P. 117.
25. *Holtfreter J., Hamburger V.* // *Analysis of development* / Eds. P.A. Willier, P. Weiss, V.W. Hamburger. – Philadelphia: Sander, 1955. – P. 230–296.
26. *Spemann H., Mangold H.* // *W. Roux Arch.* – 1924. – V. 100. – P. 599–638.
27. *Nieukoop P.D.* // *Acta Biotheoret.* – 1967. – V. 17. – P. 151.
28. *Child C.M.* Individuality in organisms. – Chicago: Univ. Press, 1915.
29. *Waddington C.H.* // *Major problems in developmental biology* / Ed. M. Locke. – N.Y.; London: Acad. Press, 1966. – P. 105–124.
30. *Зуссман М.* Биология развития. – М.: Мир, 1977. – 301 с.
31. *Wolpert L.* // *J. Theoret. Biol.* – 1969. – V. 25. – P. 1–47.
32. *Wolpert L.* // *Curr. Top. Develop. Biol.* – 1971. – V. 6. – P. 183–224.
33. *Stern C.* // *Genetic Mosaics and other essays.* – Cambridge: Harvard Univ. Press, 1968. – P. 135–173.
34. *Tokunaga C.* // *Genetic mosaics and cell differentiation* / Ed. W. Gehring. – B.; N.Y.: Springer Verlag, 1978. – P. 157–204.
35. *Уодингтон К.* Морфогенез и генетика. – М.: Мир, 1964. – 260 с.
36. *Steinberg M.S.* // *J. Exp. Zool.* – 1970. – V. 173. – P. 395–434.
37. *Moscona A.A., Hausmann R.E.* // *Cell and tissue interactions. Society of general physiologists series* / Eds. J.W. Lash, M.M. Burger. – N.Y.: Raven, 1977. – P. 173–185.
38. *Furshpan E.J., Potter D.D.* // *Curr. Top. Develop. Biol.* – 1968. – V. 3. – P. 95–127.
- 39a. *Stachelin L.A., Hull B.E.* // *Sci. Am.* – 1978. – V. 238. – P. 141–152.
- 39b. *Gilula N.B.* // *Cell communications* / Ed. R.P. Cox. – N.Y.: Wiley, 1974. – P. 1–29.
- 39в. *Конец С.В., Мажуль В.М.* Межклеточные контакты. – Минск: Наука, 1977. – 312 с.
40. *Sheridan J.D.* // *Cell surface in animal embryogenesis and development* / Eds. G. Poste, G.L. Nicolson. – Amsterdam: Elsevier, 1977. – P. 409–448.
41. *Warner A.E.* // *British Society of developmental biology Symp.* / Eds. A. Garrod, J. Feldman. – Cambridge: Univ. Press, 1981. – P. 109–127.
42. *Lo C.W., Gilula N.B.* // *Cell.* – 1979. – V. 18. – P. 399–407.
43. *Lo C.W., Gilula N.B.* // *Cell.* – 1979. – V. 18. – P. 411–422.

44. *De Laat S.W., Tertoolen L.G.J., Dorresteijn A.W.C., van der Biggelaar J.A.M.* // *Nature*. – 1980. – V. 287. – P. 546–559.
45. *Warner A.E., Lawrence P.A.* // *Cell*. – 1982. – V. 28. – P. 243–255.
46. *Weir M.P., Lo C.W.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1982. – V. 79. – P. 3232–3240.
47. *Григоров Л.Н., Полякова М.С., Чернавский Д.С.* // *Молекуляр. биология*. – 1967. – Т. 1. – С. 410–418.
48. *Chernavskii D.S., Belousov L.V., Solyanick G.I.* // *Biol. Cybernetics*. – 1980. – V. 37. – P. 9–18.
49. *Lavenda B.H.* // *Quart. Rev. Biophys.* – 1972. – V. 5. – P. 429–480.
50. *Edelstein B.* // *J. Theor. Biol.* – 1972. – V. 37. – P. 221–243.
51. *Yagil G., Yagil E.* // *Biophys. J.* – 1971. – V. 11. – P. 11–23.
52. *Turing A.* // *Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B*. – 1952. – V. 237. – P. 37–72.
53. *Зельдович Я.Б.* // *ЖФХ*. – 1938. – Т. 11. – С. 685–691.
54. *Поллак Л.С., Михайлов А.С.* Самоорганизация в неравновесных физико-химических системах. – М.: Наука, 1983. – С. 283.
55. *Жаботинский А.М.* Концентрационные автоколебания. – М.: Наука, 1974.
56. *Naken H.* // *Z. Phys. B*. – 1975. – V. 21. – P. 105–114.
57. *Prigogine I., Lefever R.* // *J. Chem. Phys.* – 1968. – V. 48. – P. 1695–1700.
58. *Меделунг Э.* Математический аппарат физики. – М.: Физматгиз, 1960. – С. 470.
59. *Sattinger D.H.* Group theoretic methods in bifurcation theory. – В.; N.Y.: Springer Verlag, 1979. – 241 p.
60. *Nitzan A., Ortoleva P.* // *Phys. Rev. A*. – 1980. – V. 21. – P. 1735–1755.
61. *Kuramoto Y., Tsuzuki T.* // *Progr. Theor. Phys.* – 1975. – V. 54. – P. 687–699.
62. *Auchmuty J.F.G., Nicolis G.* // *Bull. Math. Biol.* – 1975. – V. 37. – P. 589–636.
63. *Keener I.P.* // *SIAM J. Appl. Math.* – 1978. – V. 59. – P. 1–23.
64. *Кернер Б.С., Осипов В.В.* // *ЖЭТФ*. – 1978. – Т. 74. – С. 1675–1685.
- 65а. *Кернер Б.С., Осипов В.В.* // *ЖЭТФ*. – 1980. – Т. 79. – С. 2218–2238.
- 65б. *Кернер Б.С., Осипов В.В.* // *Биофизика*. – 1982. – Т. 27. – С. 137–141.
66. *Полежаев А.А.* // *Биофизика*. – 1984. – Т. 29. – С. 465–469.
67. *Полежаев А.А.* // *Биофизика*. – 1984. – Т. 29. – С. 654–659.
68. *Polezhaev A.A., Chernavskii D.S., Ruijgrok T.W.* / Preprint P.N. Lebedev Physical Institute, 1983.
69. *Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернавский Д.С.* Математическая биофизика. – М.: Наука, 1984. – С. 304.
70. *Gierer A., Meinhardt H.* // *Kybernetik*. – 1972. – V. 12. – P. 30–39.
71. *Gierer A., Meinhardt H.* // *Lecture notes on mathematics in the life science*. – 1974. – V. 7. – P. 163–183.
72. *Gierer A.* // *Progr. Biophys. Molec. Biol.* – 1980. – V. 37. – P. 1–47.
73. *Meinhardt H., Gierer A.* // *J. Cell. Sci.* – 1974. – V. 15. – P. 321–346.
74. *Meinhardt H.* Models of biological pattern formation. London; N.Y.: Acad. Press, 1982. – 230 p.
75. *Sander K.* // *Adv. Insect Physiol.* – 1976. – V. 12. – P. 125–238.
76. *Counce S.* // *Developmental system: Insects*. V. 2. – London; N.Y.: Acad. Press, 1973. – P. 1–156.
77. *Meinhardt H.* // *J. Cell Sci.* – 1977. – V. 23. – P. 117–139.
78. *Schubiger G.* // *Devel. Biol.* – 1976. – V. 50. – P. 476–488.
79. *Kalthoff K., Sander K.* // *W. Roux Arch.* – 1968. – V. 161. – P. 129–146.
80. *Kalthoff K.* // *Zool. Anz. Suppl.* – 1971. – Bd 34. – S. 61–65.
81. *Белинцев Б.Н.* // *Онтогенез*. – 1985. – Т. 16. – С. 99–106.
82. *Kauffman S.A., Shymko R.M., Trabert K.* // *Science*. – 1978. – V. 199. – P. 259–270.
83. *Белинцев Б.Н.* // *Онтогенез*. – 1985. – Т. 16. – С. 107–117.
84. *McGinnis W., Garber R.L., Witz J., Kuroiwa A., Gehring W.L.* // *Cell*. – 1984. – V. 37. – P. 403–408.
85. *Hafen E., Kuroiwa A., Gehring W.J.* // *Cell*. – 1984. – V. 37. – P. 833–841.
86. *Shepherd J., McGinnis W., Carrasco A. e.a.* // *Nature*. – 1984. – V. 310. – P. 70–71.

87. *Berking S.* // W. Roux. Arch. — 1979. — V. 186. — P. 189—210.
88. *Schaller H.C.* // J. Embryol. Exp. Morphol. — 1972. — V. 29. — P. 27—38.
89. *Schaller H.C., Bodenmuller M.* // Naturwiss. — 1981. — Bd 68. — S. 252—256.
90. *Schmidt T., Grümmelichuijen G.P., Schaller H.C.* // Devel. and cellular biology of coelenterates / Eds. P. Tardent, R. Tardent. — Amsterdam, N.Y.: Elsevier, 1980. — P. 395—400.
91. *Harris A.K., Stopack D., Wild P.* // Nature. — 1981. — V. 290. — P. 249—251.
92. *Harris A.K., Wild P., Stopack D.* // Science. — 1980. — V. 208. — P. 177—179.
93. *Harris A.K., Stopack D., Warner P.* // J. Embryol. Exp. Morphol. — 1984. — V. 80. — P. 1—20.
94. *Stopack D., Harris A.K.* // Devel. Biol. — 1982. — V. 90. — P. 383—398.
95. *Васильев Ю.М., Гельфанд И.М.* Взаимодействующие нормальные и неопластических клеток со средой. — М.: Наука, 1981. — С. 220.
96. *Oster G.F., Murray J.D., Harris A.K.* // J. Embryol. Exp. Morphol. — 1983. — V. 78. — P. 83—125.
97. *Thorogood P.* // Cartilage. V. 2: Development, Differentiation and Growth. — N.Y.: Acad. Sci. Press, 1983. — P. 223.
98. *Crick F.* // Nature. — 1970. — V. 225. — P. 420.
99. *Белоусов Л.В.* // Математическая биология развития. — М.: Наука, 1982. — С. 102—111.
100. *Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М.* Статистическая физика. М.: Наука, 1976. — С. 583.
101. *Белинцев Б.Н., Лившиц М.А., Волькенштейн М.В.* // Биофизика. — 1979. — Т. 24. — С. 117—123.
102. *Белинцев Б.Н., Лившиц М.А., Волькенштейн М.В.* // Биофизика. — 1978. — Т. 23. — С. 1056—1062.
103. *Камке Э.* Справочник по обыкновенным дифференциальным уравнениям. — М.: Наука, 1976. — С. 576.
104. *Livshits M.A., Gurija G.T., Belintsev B.N., Volkenstein M.V.* // J. Mathem. Biol. — 1981. — V. 11. — P. 295—310.
105. *Арнольд В.И.* Дополнительные главы теории обыкновенных дифференциальных уравнений. — М.: Наука, 1978. — С. 320.
106. *Chaffee N.* // J. Diff. Equat. — 1975. — V. 18. — P. 111—134.
107. *Belintsev B.N., Livshits M.A., Volkenstein M.V.* // Z. Phys. B — Cond. Matter. — 1981. — Bd 44. — S. 345—351.
108. *Белинцев Б.Н., Лившиц М.А., Волькенштейн М.В.* // Докл. АН СССР. — 1981. — Т. 257. — С. 487—491.
109. *Belintsev B.N., Livshits M.A., Volkenstein M.V.* // Phys. Lett. A. — 1981. — V. 82. — P. 375—377.
110. *Belintsev B.N.* // Phys. Lett. A. — 1981. — V. 84. — P. 462—466.
111. *Белинцев Б.Н.* // Успехи физ. наук. — 1983. — Т. 141. — С. 55—101.
112. *Кляцкин В.И.* Статистическое описание динамических систем с флуктуирующими параметрами. — М.: Наука, 1975. — С. 240.
113. *Лэкс М.* Флуктуации и когерентные явления. — М.: Мир, 1974. — С. 299.
114. *Raper K.B.* // J. Agric. Res. — 1935. — V. 50. — P. 135—147.
115. *Loomis W.F.* Dictyostelium discoideum. A developmental system. — N.Y.: Acad. Press, 1975.
116. *Bonner J.T.* // Symp. Soc. Exp. Biol. — 1963. — V. 17. — P. 341—358.
117. *Gerisch G.* // Curr. Top. Dev. Biol. — 1968. — V. 3. — P. 157—197.
118. *Robertson A.D.J., Grutsch J.F.* // Cell. — 1981. — V. 24. — P. 603—609.
119. *Gingle A.R. J.* // Cell. Sci. — 1976. — V. 20. — P. 1—19.
120. *Runion E.H.* // Collecting Net. — 1942. — V. 17. — P. 88—124.
121. *Bonner J.T.* // J. Exp. Zool. — 1947. — V. 110. — P. 259—271.
122. *Konijn T.M., van der Meene J.G.C., Chang Y.Y. e.a.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1967. — V. 58. — P. 1152—1154.
123. *Bonner J.T., Barkley D.S., Hall E.M. e.a.* // Dev. Biol. — 1969. — V. 20. — P. 72—87.
124. *Barkley D.S.* // Science. — 1969. — V. 165. — P. 1133—1134.
125. *Brener M.* // Dev. Biol. — 1978. — V. 64. — P. 210—223.
126. *Klein C.* // FEBS Lett. — 1976. — V. 68. — P. 125—128.
127. *Mato J.M., Konijn T.M.* // Biochim. Biophys. Acta. — 1975. — V. 385. — P. 173—179.
128. *Tomchik K.J., Devreotes P.N.* // Science. — 1981. — V. 212. — P. 443—446.

129. Swanson J.A., Taylor D.L. // Cell. — 1982. — V. 28. — P. 225–232.
130. Mato J.M., Konijn T.M. // Devel. and diff. in the cell. slime molds. / Eds. P. Cappuccinelli, J.M. Ashworth. — Amsterdam: Elsevier, 1977. — P. 93–103.
131. Malchow D., Böhme R., Gras U. // Biophys. of Structure and Mechanisms. — 1982. — V. 9. — P. 131–140.
132. Alcautara F., Monk M. // J. Gen. Microbiol. — 1974. — V. 85. — P. 321–334.
133. Durston A. // Dev. Biol. — 1974. — V. 37. — P. 225–235.
134. Roos W., Nanjundiah V., Malchow D., Gerisch G. // FEBS Lett. — 1975. — V. 53. — P. 139–142.
135. Shaffer B.M. // Nature. — 1975. — V. 255. — P. 549–552.
136. Roos W., Gerisch G. // FEBS Lett. — 1976. — V. 68. — P. 170–172.
137. Roos W., Scheidegger C., Gerisch G. // Nature. — 1977. — V. 266. — P. 259–261.
138. Klein C., Brachet P., Darmon M. // FEBS Lett. — 1977. — V. 76. — P. 145–147.
139. Shaffer B.M. // J. Exp. Biol. — 1956. — V. 33. — P. 645–657.
140. Shaffer B.M. // Science. — 1956. — V. 123. — P. 1172–1173.
141. Chang Y.Y. // Science. — 1968. — V. 161. — P. 57–59.
142. Chassy B.M., Love L.L., Krichevsky M.I. // Fed. Proc. Fedn. Amer. Soc. Expl. Biol. — 1969. — V. 28. — P. 842–851.
143. Klein C., Darmon M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1975. — V. 67. — P. 440–447.
144. Malchow D., Nägele B., Schwartz H., Gerisch G. // Eur. J. Biochem. — 1972. — V. 28. — P. 136–142.
145. Raman P.K. // J. Theor. Biol. — 1976. — V. 59. — P. 491–495.
146. Raman P.K., Hashimoto Y., Cohen M.H., Robertson A. // J. Cell Sci. — 1976. — V. 21. — P. 243–259.
147. Gross J., Kay R., Lax A., Peacey M., Trevan D. EMBO workshop on development and differentiation in cellular slime molds. No 13 / Ed. Cappuccinelli P. — Amsterdam: Elsevier, 1977. — P. 135–148.
148. Shaffer B.M. // Quart. J. Microscop. Sci. — 1958. — V. 99. — P. 103–121.
149. Gerisch G., Fromm H., Huesgen A., Wick U. // Nature. — 1975. — V. 255. — P. 547–549.
150. Gerisch G., Maeda Y., Malchow D. e.a. // Devel. and diff. in the cell. slime molds. / Eds. P. Cappuccinelli, J.M. Ashworth. — Amsterdam: Elsevier, 1977. — P. 105–124.
151. Chung S., Laudfear S.M., Blumberg D.D. e.a. // Cell. — 1981. — V. 24. — P. 785–791.
152. Blumberg D.D., Margolskee J.P., Barklis E. e.a. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1982. — V. 79. — P. 127–131.
153. Lodish H.F., Alton T.H. // Devel. and diff. in the cell. slime molds op. cit. — 1977. — P. 253–272.
154. Mangiarotti G., Ceccarelli A., Lodish H.F. // Nature. — 1983. — V. 301. — P. 616–618.
155. Bonner J.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1970. — V. 65. — P. 110–113.
156. Town C.D., Gross J.D., Kay R.R. // Nature. — 1976. — V. 262. — P. 717–720.
157. Kay R.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1982. — V. 79. — P. 3228–3231.
158. Takeuchi I., Hayashi M., Tasaka M. // Devel. and diff. in the cell. slime molds. op. cit. — 1977. — P. 1–16.
159. Garrod D.R., Forman D. // Nature. — 1977. — V. 265. — P. 144–150.
- 160a. MacWilliams H.K., Bonner J.T. // Diff. — 1979. — V. 14. — P. 1–22.
- 160b. Morrissey J. // Development of D. discoideum / Ed. W.F. Loomis. — L.: Acad. Press, 1982. — P. 28–45.
161. Matsukuma S., Durston A.J. // J. Embryol. Exp. Morphol. — 1979. — V. 50. — P. 243–251.
162. Sternfeld J., David C. // Diff. — 1981. — V. 20. — P. 10–21.
163. Pan P., Bonner J.T., Weidner H.J., Parker C.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1974. — V. 71. — P. 1623–1625.
164. Brener M. // J. Biol. Chem. — 1977. — V. 252. — P. 4073–4077.
165. Durston A.J., Vork F.A. // J. Cell Sci. — 1979. — V. 36. — P. 261–280.
166. Kay R.R., Jermyn K.A. // Nature. — 1983. — V. 303. — P. 242–243.
167. Sussman M., Schindler J., Kim H. // Devel. and diff. in the cell. slime molds, op. cit. — 1977. — P. 31–50.
168. Sussman M., Schindler J. // Diff. — 1978. — V. 10. — P. 1–5.

169. *Gross J.D., Bradbury J., Kay R.R., Peacey M.J.* // *Nature*. – 1983. – V. 303. – P. 244–248.
170. *Bonner J.T.* // *Amer. J. Biol.* – 1952. – V. 31. – P. 175–182.
171. *Bonner J.T.* // *Quart. Rev. Biol.* – 1957. – V. 32. – P. 232–246.
172. *Durston A.J.* // *Nature*. – 1976. – V. 263. – P. 126–129.
173. *Rubin J., Robertson A.* // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – 1975. – V. 33. – P. 227–241.
174. *Keller E.F., Segel L.A.* // *J. Theor. Biol.* – 1971. – V. 30. – P. 225–234.
175. *Keller E.F., Segel L.A.* // *J. Theor. Biol.* – 1970. – V. 26. – P. 399–413.
176. *Cohen M.S.* // *J. Theor. Biol.* – 1977. – V. 69. – P. 57–86.
177. *Иваницкий Г.Р., Кринский В.И., Сельков Е.Е.* Математическая биофизика клетки. – М.: Наука, 1978. – С. 310.
178. *Gross J.D., Peacey M.J., Trevan D.J.* // *J. Cell Sci.* – 1976. – V. 22. – P. 645–656.
179. *Hagan P.S., Cohen M.S.* // *J. Theor. Biol.* – 1981. – V. 93. – P. 881–908.
180. *Жаботинский А.М., Заикин А.Н.* // Колебательные процессы в биологических и химических системах. Т. 2. / Пушинский научный центр. 1971. – С. 279–283.
181. *Rubinow S.I., Segel L.A., Ebel W.* // *J. Theor. Biol.* – 1981. – V. 91. – P. 99–114.
182. *MacWilliams H.K.* // *Developmental order: Its origin and regulation*. 40 Symp. Soc. Dev. Biol. – N.Y.: Alan. Liss, 1982. – P. 463–483.
183. *MacKay S.A.* // *J. Cell. Sci.* – 1978. – V. 33. – P. 1–16.
184. *Белинцев Б.Н.* // Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1984. – Т. 6. – С. 923–932.
185. *Sattinger D.H.* // *Arch. Rational Mech. Anal.* – 1971. – V. 43. – P. 154–166.
186. *Futrelle R.P., Trauf J., McKee W.G.* // *J. Cell Biol.* – 1982. – V. 92. – P. 807–821.
187. *Юдин И.Д., Константинов А.Б., Белинцев Б.Н.* // *Биофизика*. – 1985. – Т. 30. – С. 341–346.
- 188а. *Белинцев Б.Н., Юдин И.Д.* // Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1985. – Т. 3. – С. 352–361.
- 188б. *Belintsev B.N.* // *Self-organization Autowaves and Structures* / Ed. V. Krinsky. – Springer, 1984. – P. 209.
189. *Белинцев Б.Н., Юдин И.Д., Волькенштейн М.В.* // Докл. АН СССР. – 1985. – Т. 285. – С. 470–474.
190. *Belintsev B.N.* // *J. Theor. Biol.* – 1984. – V. 108. – P. 123.
191. *Юдин И.Д., Белинцев Б.Н., Лившиц М.А., Тальянский М.И., Волькенштейн М.В.* // Докл. АН СССР. – 1984. – Т. 277. – С. 987–991.
192. *Durston A.J., Vork F.* // *Devel. and diff. in the cell. slime molds* / Eds. P. Cappuccinelli, J.M. Ashworth. – Amsterdam: Elsevier – North-Holland, 1977. – P. 17–26.
193. *Müller W.A.* // *Differ.* – 1982. – V. 22. – P. 141–150.
194. *Moinhardt H.* // *Differ.* – 1983. – V. 24. – P. 191–202.
195. *Tazaka M., Takeuchi I.* // *Differ.* – 1981. – V. 18. – P. 191–196.
196. *Farnsworth P.* // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – 1974. – V. 31. – P. 435–451.
197. *Wessels N.K.* // *Evolution and Development* / Eds. J.T. Bonner. – Berlin; N.Y.: Springer Verlag, 1982. – P. 115–154.
198. *Nardi J.B.* // *Differ.* – 1981. – V. 20. – P. 97–103.
- 198а. *Wessels N.K.* *Tissue Interactions and Development*. – W.A. Benjmin, Menlo Park, 1977.
199. *Гурвич А.Б.* Атлас и очерк эмбриологии позвоночных и человека. – Спб.: Практическая медицина, 1909. – С. 340.
- 200а. *Исаинова-Казас О.М.* Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Неполноусые. – М.: Наука, 1981. – С. 208.
- 200б. *Исаинова-Казас О.М.* Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Членистоногие. – М.: Наука, 1979. – С. 224.
201. *Белинцев Б.Н., Белоусов Л.В., Зарайский А.Г.* // *Онтогенез*. – 1985. – Т. 16. – С. 437–449.
202. *Белоусов Л.В., Dorfman Я.Г., Черданцев В.Г.* // *Онтогенез*. – 1974. – Т. 5. – С. 323–333.
203. *Belousov L.V., Dorfman Ja.G., Cherdantsev V.G.* // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – 1975. – V. 34. – P. 559–574.
204. *Белоусов Л.В., Лучинская Н.Н.* // *Цитология*. – 1984. – Т. 25. – С. 939–944.
205. *Лучинская Н.Н., Белоусов Л.В.* // *Онтогенез*. – 1977. – Т. 8. – С. 263–268.
206. *Spooner B.S.* // *Bioscience*. – 1975. – V. 25. – P. 440–451.

207. Weigel P.H., Schaar R.L., Kühlenschmidt M.S. e.a. // J. Biol. Chem. – 1979. – V. 254. – P. 10830–10838.
208. Петров К.В., Белоусов Л.В. // Онтогенез. – 1984. – Т. 15. – С. 643–648.
209. Edelman C.H. // Science. – 1983. – V. 219. – P. 450–457.
210. Poo M.-M., Poo W.-J., Lam J.W. // J. Cell Biol. – 1978. – V. 76. – P. 483–501.
211. Bell G.L., Dembo M., Bongrand P. // Biophys. J. – 1984. – V. 45. – P. 1051–1064.
212. Bongrand P., Capo C., Depieds R. // Progr. Surf. Membr. Sci. – 1982. – V. 12. – P. 217–285.
213. Белоусов Л.В., Богдановский С.Б. // Онтогенез. – 1980. Т. 11. – С. 467–475.
214. Belousov L.V. // W. Roux Arch. – 1980. – V. 188. – P. 1–7.
215. Ивене И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран. – М.: Мир, 1982. – С. 304.
216. Белинцев Б.Н., Белоусов Л.В., Зарайский А.Г. // Онтогенез. – 1985. – Т. 16. – С. 5–14.
217. Черданцев В.Г. // Онтогенез. – 1977. – Т. 8. – С. 335–360.
218. Middleton C.A. // Exp. Cell Res. – 1977. – V. 109. – P. 349–359.
219. Yamada K.M., Olden K., Hahn L.-H. // The Cell Surface: Mediator of Developmental Processes. / Eds. S. Subtelny, N.K. Wessels. – London; N.Y.: Acad. Press, 1980. – P. 43–48.
220. Белинцев Б.Н., Белоусов Л.В., Зарайский А.Г., Волькенштейн М.В. // Докл. АН СССР. – 1985. – Т. 281. – С. 708–711.
221. Белинцев Б.Н. // Природа. – 1989. – Т. 2. – С. 81–89.
222. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теория упругости. – М.: Наука, 1965.
223. Франк-Каменецкий Д.А. Диффузия и теплоперенос в химической кинетике. – М.: Наука, 1967. – С. 491.
224. Белинцев Б.Н., Савич Д. // Биофизика. – 1985. – Т. 30. – С. 284–291.
225. Schlögl F. // Z. Phys. – 1972. – Bd 253. – S. 147–159.
- 226а. Belintsev B.N., Livshits M.A., Volkenstein M.V. // Z. Phys. B. – 1978. – Bd. 30. – S. 211–218.
- 226б. Белинцев Б.Н., Дибров Б.Ф., Лившиц М.А., Волькенштейн М.В. // Биофизика. – 1978. – Т. 23. – С. 864–870.
- 226в. Белинцев Б.Н., Лившиц М.А., Гурия Г.Т., Волькенштейн М.В. // Докл. АН СССР. – 1979. – Т. 244. – С. 1239–1243.
227. Завалишина Л.Э., Белоусов Л.В., Остроумова Т.В. // Онтогенез. – 1980. – Т. 11. – С. 492–499.
228. Ven-Zeev e.a. // Cell. – 1980. – V. 21. – P. 365–372.
229. Ashall F., Puck T.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1984. – V. 81. – P. 1545–1549.
230. McAvoy J.W. // J. Embryol. Exp. Morphol. – 1978. – V. 45. – P. 271–286.
231. Spigelman B.M., Ginty C.A. // Cell. – 1983. – V. 35. – P. 657–666.
232. Белоусов Л.В., Петров К.В. // Онтогенез. – 1983. – Т. 14. – С. 21–29.
233. Yamada T. // Netherl. J. Zool. – 1981. – V. 31. – P. 78–98.
234. Holtfreter J. // J. Exp. Zool. – 1947. – V. 106. – P. 197–214.
235. Holtfreter J. // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1948. – V. 49. – P. 70–93.
236. Deuchar E.M. // Exptl. Cell Res. – 1970. – V. 35. – P. 341–343.
237. Leder A., Leder P. // Cell. – 1975. – V. 5. – P. 319–325.
238. Othmer H.G., Pate E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1980. – V. 77. – P. 4180–4184.
239. Lacalli T.G., Harrison L.G. // J. Theor. Biol. – 1978. – V. 70. – P. 273–296.
240. Hörstadius S. // Pubbl. Staz. Zool. Napoli. – 1935. – Bd 14. – S. 253–474.
241. Ubišch L. // W. Roux Arch. – 1936. – Bd 134. – S. 599–643.
242. Кларксон Д. Транспорт ионов и структура растительной клетки. – М.: Мир, 1978. – С. 368.
243. Лопашов Г.В. Механизмы развития зачатков глаз в эмбриогенезе позвоночных. – М.: Изд-во АН СССР, 1960. – С. 224.
244. Строева О.Г. Морфогенез и врожденные аномалии глаза млекопитающих. – М.: Наука, 1971. – С. 242.
245. Науmidi И.И., Белоусов Л.В. // Онтогенез. – 1981. – Т. 12. – С. 154–160.
246. Belousov L.V., Naumidi I.I. // Cell Differ. – 1983. – V. 12. – P. 191–204.
247. Cooke J., Zeeman E.C. // J. Theor. Biol. – 1976. – V. 58. – P. 455–476.

248. *Stubblefield E.A.* // *J. Theor. Biol.* — 1986. — V. 118. — P. 129–143.
249. *Whittaker J.R.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1973. — V. 70. — P. 2096–2100.
250. *Sato N., Ikegami S.* // *J. Embryol. Exp. Morphol.* — 1981. — V. 61. — P. 1–13.
251. *Lewis E.B.* // *Nature.* — 1978. — V. 276. — P. 565–570.
252. *Weir M.P., Kornberg T.* // *Nature.* — 1985. — V. 318. — P. 433–439.
253. *Goodwin B.C.* // *Bioessays.* — 1985. — V. 3. — P. 32–36.
254. *Бор Н.* Избранные научные труды. Т. 2. — М.: Наука, 1971. — С. 519.
255. *Bryant P.U., Bryant S.V., French V.* Biological regeneration and pattern formation. — *Sci. Am.*, 1977. — P. 67–81.
256. *Plickert G.* // *Developmental and cellular biology of Coelenterates.* / Eds. P. Tardent, R. Tardent. — Elsevier — North-Holland, 1980. — P. 185–193.
257. *Sengel P.* Morphogenesis of skin. — Cambridge: Camb. Univ. Press, 1976.
258. *Лившиц М.А.* // *Биофизика.* — 1984. — Т. 29. — С. 699–705.
259. *Балабеков Б.Ч.* Диссипативные структуры в колонии бактерий / Дипл. работа ФТИ. — М., 1986.
260. *Davidson D.* // *J. Embryol. Exp. Morphol.* — 1983. — V. 74. — P. 261–273.
261. *Braverman M.* // *Amer. Zool.* — 1974. — V. 14. — P. 673–689.
262. *Зарайский А.Г.* Морфологическая поляризация клеток при разметке морфогенеза в раннем развитии амфибий. (Частное сообщение.)
263. *Lacalli T.G., Harrison L.G.* // *J. Theor. Biol.* — 1979. — V. 76. — P. 419–431.
264. *Livshitz M.A., Bereiter-Halm J.* // *Exptl Cell Res.* — 1984. — V. 154. — P. 412–420.
265. *Stamsstreet M., Yumah H.* // *Life Sciences.* — 1983. — V. 33. — P. 1433–1441.
266. *Jaffe L.* // *Phil. Trans. Roy. Soc. (London).* — 1981. — V. B295. — P. 553–566.
267. *Nuccitelli R.* // *Modern Cell Biology* / Ed. A.R. Liss. — N.Y., 1983. — P. 451–481.
268. *Stern C.D.* // *J. Theor. Biol.* — 1984. — V. 107. — P. 229–242.
269. *McCloskey M.A.* // *J. Cell Biol.* — 1986. — V. 102. — P. 2185–2196.
270. *Jaffe L.* // *Biological structures and coupled flows* / Eds. A. Oplatka, M. Balaban. — N.Y.; London; Sydney; Toronto: Acad. Press, 1983. — P. 445–456.
271. *Eisen A., Reynolds G.T.* // *J. Cell Biol.* — 1985. — V. 100. — P. 1522–1527.
272. *Larter S., Ortoleva P.* // *J. Theor. Biol.* — 1982. — V. 96. — P. 175–200.
273. *Weeds A.* // *Nature.* — 1982. — V. 296. — P. 811–816.
274. *Helwell S.B., Taylor D.L.* // *J. Cell Biol.* — 1979. — V. 83. — P. 633–648.
275. *Нейфах А.А.* // *Онтогенез.* — 1985. — Т. 16. — С. 15–25.

ДОПОЛНЕНИЕ

ФОРМИРОВАНИЕ ОСНОВНОГО ПЛАНА СТРОЕНИЯ В РАННЕМ РАЗВИТИИ НАСЕКОМЫХ *)

1. Обзор экспериментальных данных и теоретических моделей

С самых общих позиций проблема эмбриональной дифференцировки имеет два фундаментальных аспекта. Первый аспект — локальный. Здесь главный вопрос — это вопрос о специфической активации и репрессии генов в клетках специализированных тканей. Второй аспект — глобальный. Необходимо выяснить механизмы координации активности индивидуальных клеток во времени и в пространстве. Сюда относится проблема формирования плана строения (паттернов) — расположения структур надклеточного уровня, в которых различные типы специализированных клеток распределены по упорядоченным в пространстве доменам [1]. Именно этого аспекта касается настоящий раздел.

*) См. Онтогенез. — 1985. — Т. 16, № 2. — С. 99–117.

Становление надклеточной организации в развивающемся организме однозначно детерминировано, с одной стороны, информацией, закодированной в геноме, с другой — условиями, в которых протекает развитие. Как мутации, так и ряд простых физических воздействий, не затрагивающих генетического аппарата (но влияющих на условия развития), дают воспроизводимые дефекты морфогенеза.

Обобщение обширного экспериментального материала содержится в идее Вольперта о позиционной информации [2]. Постулируется, что физические факторы (факторы внешней среды плюс такие, например, как размеры зародыша или его геометрия) и факторы, непосредственно контролируемые генами, участвуют в различных, разделенных во времени фазах процесса формирования паттерна. А именно — первым отводится роль в спецификации пространственной "разметки" будущей структуры, или в установлении позиционной информации. Видимая морфогенетическая структура возникает в результате детерминации пути развития клеток при трансляции позиционной информации. Эта фаза процесса предполагает контролируемую генами реакцию клеток на позиционную информацию. Ее продукт в отличие от продукта первой фазы зависит не только от генетической конституции клеток, но и от пройденного пути развития.

В представленную схему хорошо вписываются данные по генетическим мозаикам [3, 4] и ряд других экспериментальных результатов [2, 5, 6]. Дальнейшая задача состоит в конкретизации этой слишком общей картины. Для ее решения необходима подходящая экспериментальная модель.

Среди высокоразвитых многоклеточных наиболее изученными и методически удобными объектами являются зародыши насекомых. Они доступны для прямого наблюдения формирования основного плана строения взрослого насекомого. Здесь можно получать мутации, нарушающие строение взрослого насекомого и проявляющиеся в раннем развитии — при формировании паттернов. В литературе имеется много данных относительно нарушений пространственной организации зародыша, индуцируемых физическими воздействиями. Это в основном количественные данные, и их можно использовать в качестве теста для теоретических моделей.

В разделе 1 мы дадим краткий обзор результатов исследований процесса регионализации в раннем развитии насекомых. Приводимые результаты и выводы служат основой для построения теоретической модели. Она будет представлена в следующем разделе. Там же приводится интерпретация с единых позиций разнородного экспериментального материала по индуцируемым дефектам морфогенеза.

а) Экспериментальные данные. После оплодотворения яйцеклетки и ряда синхронных делений ядер в результате их миграции к периферии яйца образуется ядерный монослой. Далее между поверхностными ядрами постепенно формируется мембрана. Сформировавшийся монослой клеток называется "клеточной бластодермой". Основной план строения взрослого насекомого становится доступным для прямого наблюдения на стадии зародышевой полоски (рис. 53). Он устанавливается в виде линейной последовательности сегментов, показанной на рис. 53г. Зародышевая полоска — наиболее ранний этап развития зародыша, когда все сегменты и придатки тела насекомого могут быть узнаны. Для многих видов это также последний этап, поскольку следующие шаги развития

включают сложные морфогенетические движения, которые вуалируют первичный план строения.

Дефекты развития, происходящие от нарушения основного плана строения, также регистрируются на стадии зародышевой полоски. Благодаря этому мы имеем возможность контролировать наше понимание механизмов установления плана строения (см. раздел 2).

Интересный для нас период развития продолжается на протяжении дробления и формирования бластодермы. Именно в этот период клетки

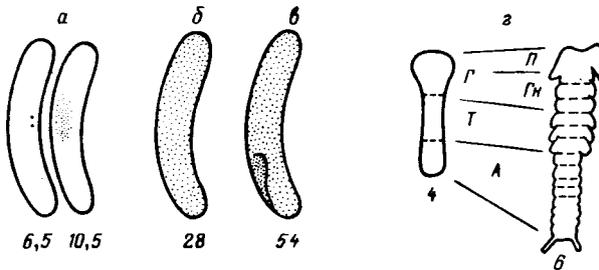


Рис. 53. Эмбриогенез сверчка *Acheta domesticus* [7]. Приведены часы развития после оплодотворения: а – дробление ядер, б – однородная бластодерма, в – зародышевое пятно, г – зародышевая полоска через 4 и 6 дней развития; А – abdomen, Г – голова, Гн – гнатоцефалон, П – процефалон, Т – торакс

”получают инструкции” к выбору направления дальнейшей специализации [7–9]. Перечислим некоторые особенности данного этапа развития.

Постепенная трансформация от глобальной регуляции (в масштабах всего яйца) к полной мозаичности [7]. Проиллюстрировать это можно результатами опытов по наложению лигатур [7, 10].

На ранних стадиях дробления поперечная лигатура нарушает всю картину сегментации зародышевой полоски. На более поздней стадии дробления эффект локальной лигатуры ограничен меньшей долей сегментов. Наконец, на стадии бластодермы лигатура вообще не сказывается на картине сегментации зародышевой полоски. Кроме общего вывода, уже высказанного выше, отсюда следует также, что дифференциация сегментов не отражает фиксированную организацию, предсуществующую в неоплодотворенном яйце [11]. ”Разметка” для сегментарной организации зародышевой полоски происходит в раннем развитии. В период дробления и формирования бластодермы она осуществляется в поверхностном слое яйца.

Сегрегация независимых клеточных линий [9, 12, 13]. Опыты по трансплантации показали, что ядра дробления типопотентны. Однако когда они выходят в кортикальную цитоплазму и позднее формируют бластодерму, клетки оказываются ограниченными в потенциях формировать личиночные структуры [14]. При этом будущая судьба клеток в развитии коррелирует с их пространственным положением [15].

Компартментационный путь развития – разделение яйца на ряд геометрических доменов с последующим предписанием им различных типов детерминации [9, 11–13]. Информацию о детерминации в раннем развитии доставляет метод митотических рекомбинаций [16].

Компартменты охватывают группы клеток различного клонального происхождения (поликлоны) и устанавливают их определенную тождественность [9, 11, 17]. Эта тождественность проявляется в том, что любая клетка данного компартмента может принять участие в будущем формировании любой специфической для него структуры. Таким образом, компартменты являются анатомическими единицами однородной клеточной детерминации [9, 17].

Последовательная ступенчатая детерминация. Процесс сегрегации независимых клеточных линий не является одноактным событием, а включает ряд последовательных детерминационных шагов [9, 18]. Для отдельного шага мы будем употреблять термин "субдетерминация".

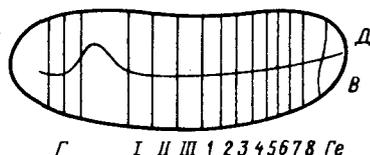
На стадии ранней бластодермы обнаруживается лишь грубая сегрегация передней и задней половин яйца [19, 20]. В зрелой бластодерме уже можно указать презумптивные зоны сегментов головы, трех грудных сегментов и ряда брюшных [21–23]. Наконец, несколькими часами позднее стадии бластодермы все указанные сегменты продольного паттерна расщепляются на дорсальную и вентральную половины (рис. 54).

Наиболее ясная картина последовательной региональной детерминации получена для отдельных имагинальных дисков, в частности имагинального диска крыла [12, 13, 24, 25]. Характерной чертой здесь является последовательное бинарное расщепление гомогенных клеточных популяций на субпопуляции – компартменты, приобретающие различные потенциалы развития [11]. Вероятно, такой же механизм является средством прогрессивной регионализации в развитии личинки в целом [9, 11].

Коммуникационная компартментация. К физическим факторам, влияющим на процесс регионализации, относится диффузия сигнальных молекул. Прямые данные на этот счет получены в последнее время при исследовании межклеточной диффузии молекул красителей [26, 27].

Выяснилось, что в то время, как молекулы красителей (использовали красители с молекулярными массами 450 и 374) свободно диффундируют между клетками одного сегмента, через границу, разделяющую сегменты, они не проникают [26]. Таким образом, межсегментарная граница

Рис. 54. Схематическое представление организации зародыша на стадии бластодермы [11]. Обозначены приблизительные положения презумптивных сегментов личинки; I–III – сегменты торакса; I–7 – брюшные сегменты; Г – голова; Ге – гениталии; Д – дорсальная, В – вентральная половины



устанавливает пределы межклеточной коммуникации, по крайней мере по такому важному ее каналу, как обмен химическими агентами с молекулярной массой ≥ 400 , т.е. такими, для которых наиболее вероятна роль морфогена. Следует оговориться, что указанные коммуникационные барьеры не препятствуют электрической связи клеток, т.е. переносу низкомолекулярных ионов [26].

Важно, что обнаруженные коммуникационные компартменты анатомически совпадают с детерминационными [26, 27]. Хотя, возможно, преж-

двременно делать общие выводы: имеющиеся данные указывают на то, что возникновение и поддержание независимо развивающихся клеточных линий (детерминационная компартментация) сопровождаются установлением коммуникационных барьеров между соответствующими пространственными доменами зародыша.

Генетический контроль регионализации развития. Два обстоятельства из уже отмеченных, касающихся компартментационного пути развития, позволяют сделать некоторые предположения о генетическом контроле на ранних этапах эмбриогенеза насекомых. Дискретность и, в частности, бинарность компартментационного процесса наводят на мысль о том, что каждая альтернатива путей развития, возникающая при сегрегации гомогенной клеточной популяции, связана с генетическим выбором [24, 25, 28, 29]. Конкретнее — некоторый ген, например ген-селектор по Гарсия-Белидо [24, 25], управляющий экспрессией целой батареи зависимых структурных генов, оказывается активированным в одной из порожденных клеточных линий и репрессированным — в комплементарной. Фенотипические свойства, соответствующие тому или иному типу детерминации, определяются продуктами экспрессии этих структурных генов. Но выражены они могут быть лишь в зависимости от состояния активности управляющего гена-селектора. Подобная триггерная генетическая система известна в более простой системе — бактериофаге λ .

Гомологичная компартментация в различных областях зародыша (например, разделение на дорсальную и вентральную половины всех сегментов продольного паттерна поздней бластодермы) может в этом контексте означать, что тождественный генетический выбор осуществляется одновременно в нескольких компартментах [9, 11].

Эти предварительные суждения подтверждаются результатами по гомеозисным трансформациям. Гомеозисные мутации происходят в единичных генетических локусах и приводят к заменам одних структур взрослого насекомого другими, — его же, но нормально формирующимся в иных частях тела. Эти мутации, как правило, проявляются в раннем развитии при детерминации различных клеточных линий [24, 25]. Они специфически затрагивают одни компартменты и оставляют инвариантными другие [24, 25]. Выяснилось также, что двойные мутации вызывают аддитивные трансформации [9].

Все сказанное выше, по-видимому, наиболее рационально трактуется в рамках гипотезы о комбинаторном коде детерминации [28, 29]. Ее содержание таково: детерминация различных личиночных имажинальных структур определяется комбинациями состояний в независимых генетических подсистемах, каждая из которых подчинена своему управляющему гену. Последний имеет два дискретных стабильных состояния: в одном подчиненные гены экспрессируются, в другом — нет.

В рамках этой гипотезы прогрессивная ступенчатая детерминация трактуется как последовательность реализации генетического выбора для ряда управляющих генов. Каждый шаг в этой последовательности не зависит от других и запоминается в последующем развитии. Пределы однородной реализации выбора задаются компартментационными границами.

Существует обширная серия экспериментальных данных, могущих обеспечить независимый тест для гипотезы о комбинаторном коде детер-

минации. Речь идет о спонтанной трансдетерминации имагинальных дисков [28, 30]. На основании установленной стандартной последовательности трансдетерминационных сдвигов можно предложить формальное представление для различных типов детерминации.

Для имагинальных дисков *Drosophila* это было проделано Кауффманом [18, 28, 29]. Основные типы детерминации имагинальных дисков формально кодируются четырехразрядными комбинациями генетических выборов. При этом в каждом из разрядов указано нулем или единицей одно из двух альтернативных состояний бинарного детерминационного цикла. Например, тип детерминации, соответствующий имагинальному диску мезоторакса, представляется комбинацией 1111, антенны — 1110 и т.д. [29].

Предполагается, что как отдельная гомеозисная мутация, так и трансдетерминационный шаг затрагивают состояние в одном из субдетерминационных циклов, переводя состояние в нем из "0" в "1" или обратно.

Набор данных о гомеозисных мутациях и спонтанной трансдетерминации имагинальных дисков существенно шире необходимого минимума для идентификации кодирующих комбинаций описанного типа. Благодаря этому имеется возможность проверить справедливость как конкретного выбора кодирующих комбинаций, так и гипотезы о комбинаторном коде в целом. Такая проверка дала в общем положительный результат [18], чем сообщила значительный вес гипотезе.

б) Теоретические модели. *Модели единого монотонного градиента.* Предполагается, что позиционная информация устанавливается в кортексе яйца в виде монотонного профиля концентраций морфогена с максимумом и минимумом соответственно на постериорном и антериорном полюсах [31]. Такое распределение возникает в результате самопроизвольной дегомогенизации исходно однородного состояния по известному механизму диффузионной неустойчивости [31, 32]. Химические взаимодействия достаточно общего вида (включающие авто- и кросс-катализ и ингибирование) наряду с диффузией двух или большего числа агентов в принципе достаточны для возникновения ожидаемой неустойчивости [33].

Как и в любой модели, опирающейся на идею позиционной информации, считается, что клетки бластодермы детерминируются в дальнейшем развитии в соответствии с локальным уровнем концентрации морфогена (его роль может исполнять один из упоминавшихся реагентов). Характерный набор типов детерминации "транслируется" с единого монотонного профиля концентрации благодаря существованию "градиента порогов" включения различных направлений специализации. Наивысшим порогом обладают терминальные сегменты брюшка, наименьшими — передние головные сегменты [31].

Концентрационный профиль, полученный из расчета теоретической модели, и разметка бластодермы на зоны презумптивных сегментов, полученная в опыте, дают градуировку шкалы концентрации морфогена [31]. Далее ее можно использовать при интерпретации индуцированных физическими манипуляциями аномалий в сегментарной организации.

Такие воздействия, как лигатура, УФ-облучение, прокол яйца, очевидно, не затрагивают порогов детерминации, но искажают задающий позиционную информацию концентрационный профиль. Это искажение мо-

жет быть предсказано теоретически. Затем на основании уже имеющейся градуировки восстанавливается аномальная сегментарная организация.

Таким образом, можно количественно описать эффект лигатуры, наложенной на стадии дробления: уменьшение числа сегментов в каждом из фрагментов за счет расширения терминальных сегментов (см. [7]). Модель также позволяет дать естественное объяснение развитию симметричных двубрюхих личинок при УФ-облучении на ранних этапах и аналогичному эффекту прокола [31].

Вместе с тем гипотеза о монотонном градиенте порогов детерминации вызывает серьезные возражения. В частности, к ее недостаткам относится пренебрежение данными о компартментационном пути развития. Игнорируются также данные о спонтанной трансдетерминации, позволяющие установить код детерминации, не зависящий от наличия и конкретного вида концентрационного градиента. Более того, можно указать на противоречие предсказаний данной модели упомянутым выше экспериментальным данным [29]. Из последних следует, что структуры, прелокализованные на противоположных полюсах бластодермы (гениталии и антенна), имеют близкие программы развития (разделены одним трансдетерминационным шагом). Это обстоятельство никак не укладывается в гипотезу о монотонном градиенте порогов детерминации. Согласно последней, анатомически удаленные структуры личинки должны быть разделены относительно большим числом промежуточных типов детерминации.

Модель формирования паттернов на основе комбинаторного кода детерминации. Модель Кауффмана, опирающаяся на комбинаторный код детерминации, лишена отмеченных недостатков [18]. В этой модели пространственные домены с различной субдетерминацией также определяются на основе концентрационных профилей морфогена. Однако в отличие от предыдущей модели здесь это не единственный для всех детерминационных шагов химический градиент, а их последовательность. Определенная закономерная смена концентрационных профилей возникает, согласно Кауффману, вследствие падения латеральной диффузионной подвижности сигнальных молекул, вызванного целлюляризацией в ходе формирования бластодермы [18]. Каждый акт реорганизации химического градиента включает детерминацию состояния в очередном субдетерминационном цикле.

Данная модель процесса региональной детерминации путем последовательной компартментации хорошо приспособлена к объяснению данных по трансдетерминации и гомеозисным мутациям. Кауффман продемонстрировал это на примере *Drosophila*.

Однако у нее есть тот недостаток, что общая тенденция раннего эмбриогенеза насекомых — "от глобальной регуляции к полной мозаичности" — в данной модели не отражена. По Кауффману [18], четвертый компартментационный шаг, так же как и первый, осуществляется концентрационным профилем, генерируемым диффузионной неустойчивостью на полной длине яйца. Поэтому локальные воздействия, например лигатура, должны давать дальнедействующий эффект как на начальных, так и на более продвинутых этапах компартментационного процесса. На самом деле, как уже говорилось, этого не происходит. Таким образом, модель сталкивается с трудностями при попытке интерпретации дефектных паттернов, индуцируемых экспериментальными манипуляциями.

Преодоление этих трудностей и будет главной целью следующего раздела. Как и в только что изложенной модели, мы опираемся на комбинаторный код детерминации. Однако новым элементом, введенным в рассмотрение, будет диффузионная изоляция между детерминационными компартаментами. Эвристический момент здесь состоит в экстраполяции экспериментальных данных по коммуникационной компартиментации на более раннюю стадию развития (чем та, на которой это наблюдалось). Это главное наше предположение, в принципе, доступно прямой экспериментальной проверке.

2. Теоретическая модель

Реакции в многокомпонентных химических смесях в условиях, далеких от химического равновесия, могут самопроизвольно порождать пространственное расслоение реагентов. Этот фундаментальный вывод, впервые сформулированный Тьюрингом в 1952 г. [32], служит с тех пор отправной точкой поиска физико-химического обоснования самоорганизации морфогенетических паттернов.

Ни в соответствующих химических, ни тем более в биологических системах мы не знаем в настоящее время реальных схем молекулярных превращений, приводящих к наблюдаемым эффектам макроскопической самоорганизации. Однако теория утверждает, что поведение в окрестности порога спонтанного расслоения должно быть нечувствительным ко многим деталям молекулярных механизмов [33, 34].

Это свойство позволяет качественно исследовать особенности поведения при формировании химических диссипативных структур, опираясь на простейшие "базовые модели" [33]. Таковыми являются двухкомпонентные системы типа реакция – диффузия (РД), параметры которой допускают существование и достижение порога спонтанного расслоения. Соответствующая "минимальная" математическая модель имеет вид

$$\begin{aligned} T_a \frac{\partial a}{\partial t} &= \varphi(a) - h + R_a^2 \frac{\partial^2 a}{\partial x^2}, \\ T_h \frac{\partial h}{\partial t} &= a - h + R_h^2 \frac{\partial^2 h}{\partial x^2}. \end{aligned} \quad (1)$$

Система кинетических уравнений (1) описывает эволюцию распределения концентраций двух реагентов a и h ; T_a и T_h – характерные времена изменения a и h . За уровень отсчета концентраций приняты их значения в исходном гомогенном стационарном состоянии. Вся нелинейность химических взаимодействий в данной системе сосредоточена в уравнении движения лишь для одной (автокаталитической) компоненты a (функция $\varphi(a)$).

Область значений параметров, в которую попадает порог спонтанного расслоения, определяется неравенствами [35]

$$T_a > T_h, \quad R_a < R_h.$$

В системах с ограниченным размером L существенна также величина безразмерного параметра R/L – отношения масштаба диффузионного

перемешивания к полной длине ($L/R \equiv \mu$). Очевидно, для поддержания неоднородности концентрации этот параметр должен быть достаточно малым — на малых длинах или при больших коэффициентах диффузии расслоение невозможно из-за диффузионного перемешивания. В нашей модели, как и у Кауффмана [18], именно этот параметр контролирует пространственную организацию в химической системе, описываемой уравнениями (1).

Опуская многие промежуточные этапы анализа, мы приведем лишь результат в виде диаграммы стационарных состояний в системе (рис. 55). Диаграмма получена с использованием близости к порогу расслоения в исходно гомогенной системе. Неоднородные стационарные распределения в этом случае представляются в виде суперпозиции косинусоидальных волн — 1-й и 2-й гармоник. Их относительные веса можно легко вычислить.

Использованный вид нелинейной функции $\varphi(a)$ приведен на рис. 56. Эта конкретная форма придает локальной динамике триггерный, бистабильный характер. В системе с диффузией это приводит к появлению дополнительной ветви однородных состояний (рис. 55, ветвь 3). Дополнительное однородное распределение не связано с неустойчивостью исходного состояния; при малых значениях параметра μ оба названных состояния могут реализовываться как альтернативные стационарные режимы — выбор одного из них определяется начальными условиями.

Существенной чертой приведенной диаграммы является потенциальная множественность неоднородных концентрационных профилей. Как видно из рис. 55, в области b значений параметра наряду с названной парой гомогенных распределений устойчивым оказывается также монотонный концентрационный градиент (ветвь 2). В области g добавляется симметричный биполярный профиль (ветвь 4). Общая тенденция при увеличении значения μ состоит в расширении спектра устойчивых негомогенных распределений за счет добавления все более коротковолновых гармоник. По мере этого длинноволновые профили становятся неустойчивыми (рис. 55, ветвь 2, область d).

Здесь устойчивость означает, что малые внешние возмущения (например, естественные флуктуации) не способны увести систему из соответствующего состояния. Однако возмущения достаточно большой амплитуды способны сделать это. Например, если в стационарном состоянии системы (1) на ветви 2 в области b создано локальное возмущение в определенный момент времени, то далее система вместо того, чтобы восстанавливать исходный профиль, эволюционирует к однородному состоянию. Осуществляется переход с ветви 2 на ветвь 1. При этом имеет значение локализация начального возмущения; перехода в новое состояние не происходит и система релаксирует к исходному состоянию, если такое же, как в предыдущем случае, возмущение приложено в центральной части профиля $a^{st}(x)$. Мы еще будем ссылаться на этот результат при обсуждении опытов по УФ-облучению яиц *Smittia*.

Изменение характера распределения концентрации осуществляется не только в результате переходов между устойчивыми ветвями. Например, оставаясь в пределах одной ветви 2, макроскопическое состояние претерпевает непрерывные изменения с ростом параметра μ . Как видно из рис. 55, профиль концентрации искажается от монотонного (в об-

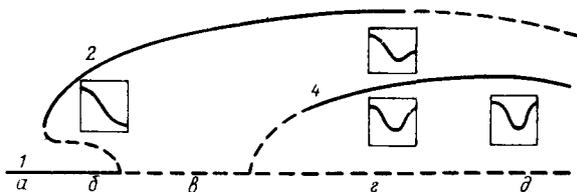
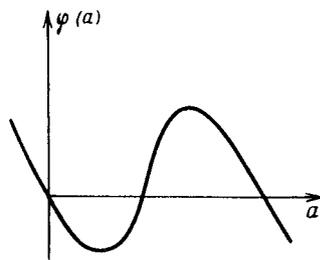


Рис. 55. Диаграмма стационарных состояний системы уравнений (1). Жирные линии – стабильные концентрационные профили, штриховые – нестабильные профили. На врезках приведены соответствующие формы стационарных распределений $\bar{a}(x)$. По горизонтальной оси $-\mu \equiv L/R$. Остальные обозначения см. в тексте

Рис. 56. Постулированная форма нелинейной реакционной составляющей в системе реакция – диффузия уравнения (1)



ласти б) к распределению с экстремумом (в области ε). Это происходит вследствие роста относительного веса 2-й гармоники с уменьшением масштаба диффузионного перемешивания или увеличения размера системы.

Важным является вопрос о том, в какой мере понижение пространственной симметрии состояния, имеющее место при расслоении, порождается только внутренними свойствами РД-системы. Уравнения движения (1), очевидно, симметричны по отношению к замене x на $-x$, т.е. к зеркальному отражению. Отсюда следует, что наряду с любым макросостоянием, обладающим полярной асимметрией, всегда может возникать его зеркальный антипод. В уравнениях не содержится никаких факторов предпочтения одного из двух таких состояний.

Если дегомогенизация в химической системе не контролируется извне, то за порогом стабильности однородного распределения с равной вероятностью может реализоваться каждый из двух профилей концентрации. Данная неоднозначность недопустима в нормальном развитии. Единственным средством ее устранения может быть внешняя асимметрия.

Факторы внешней асимметрии, по-видимому, всегда наличествуют при нормальном морфогенезе. В принципе, любая локальная неоднородность содержимого яйца на одном из полюсов может повлиять на выбор одного из двух альтернативных макросостояний РД-системы, функционирующей в кортикальной цитоплазме. Но при этом сама возможность формирования химического градиента никак не связана с существованием предполагаемого фактора внешней асимметрии. Эта возможность является следствием внутренних свойств системы, а именно – потери устойчивости однородного распределения. Направление полярной оси, генерируемой химическим градиентом, определяется, строго говоря, извне названными факторами внешней асимметрии. Это направление может быть изменено также и внешними воздействиями. Такое случается при переносе материала постериорного полюса в опытах с яйцами *Euscelis*, о чем речь пойдет ниже.

а) **П о с т у л а т ы** м о д е л и. 1. Будем формально представлять типы детерминации клеток на стадии бластодермы, пользуясь комбинаторным кодом (см. [36]). При этом необходимо задать состояния ряда независимых бинарных детерминационных циклов.

На стадии бластодермы, до прохождения дорсовентральной сегрегации, можно ограничиться трехразрядными комбинациями типа 101, 010 и т.д. Конкретное представление в такой форме для типов детерминации, соответствующих различным сегментам, будет установлено после сопоставления естественной сегментарной структуры зародышевой полоски с пространственной разметкой, выводимой из модели. Так, определенное правило трансляции комбинаторного кода сохраняется при дальнейшей интерпретации аномальных структур, генерируемых физическими воздействиями.

2. Примем, что осуществление той или иной комбинации реализуется путем независимого последовательного выбора (субдетерминации) состояний в трех бистабильных циклах. Каждый акт субдетерминации контролируется локальным уровнем морфогена. При этом считается определяющим отношение концентрации морфогена к фиксированному порогу. А именно: при превышении порога реализуется выбор "1", в противном случае – "0". Пороговый уровень морфогена – a в РД-системе уравнений (1) – соответствует его концентрации в исходном гомогенном состоянии или – для уравнений (1) – значению $a = 0$.

3. Профиль концентрации морфогена $a^{st}(x)$, задающий позиционную информацию, устанавливается самопроизвольно как устойчивое стационарное состояние кинетической системы уравнений (1) – независимо для каждого из трех субдетерминационных актов.

Пространство, доступное для диффузии реагентов, ограничивается кортикальным слоем цитоплазмы. Координата x в уравнениях движения (1) отсчитывается вдоль длинной оси яйца. Симметрия распределения $a(x)$, $h(x)$ в перпендикулярной плоскости в рассматриваемый интервал развития не нарушается.

Фактором развития, управляющим эволюцией состояния РД-системы, является коэффициент латеральной диффузии. Предполагается, что этот коэффициент монотонно уменьшается в ходе формирования бластодермы. За падение коэффициента диффузии может быть ответственна целлюляризация, сопровождающая этот процесс. Идея о том, что процесс целлюляризации может таким способом управлять формированием пространственной "разметки" в кортексе, принадлежит Кауффману [18].

4. Достижение компетенции к очередной субдетерминации считается событием, не зависящим от состояния управляющей РД-системы. В соответствии с этим для реализации выбора "1" – "0" не необходимо предварительное расслоение в этой системе. Если к моменту приобретения компетенции такое расслоение сложилось, то детерминация состояния в очередном цикле приведет к расщеплению гомогенной клеточной популяции на субпопуляции. Если включение соответствующего детерминационного цикла застало РД-систему в гомогенном состоянии, то на данном шаге детерминации все клетки соответствующего пространственного домена испытывают однородную детерминацию. К такой ситуации, как мы считаем, приводят различные экспериментальные манипуляции. Об этом речь ниже.

5. Расщепление гомогенной популяции на компартменты и завершение акта субдетерминации сопровождается установлением диффузионного барьера вдоль границы раздела компартментов. Из-за уменьшения размеров области это сразу переводит РД-систему в область a на стационарной диаграмме (рис. 55), т.е. туда, где стабильны лишь гомогенные состояния. Продолжающаяся целлюляризация (рост параметра μ) вновь возвращает систему к порогу расслоения и к очередному расщеплению.

6. Однозначность концентрационного профиля за порогом спонтанного расслоения обеспечивается локальным фактором. Его физическая природа для нас не важна. По крайней мере, в некоторых случаях есть основание полагать, что названный асимметризирующий фактор локализован в районе постериорного полюса яйца. Повод так считать дают опыты по переносу материала постериорного полюса, проводившиеся на яйцах *Euscelis*.

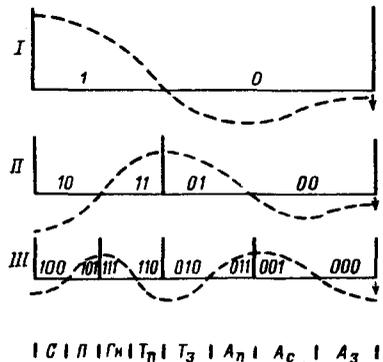
б) Н о р м а л ь н а я с е г м е н т а ц и я. Исходным состоянием для контролирующей РД-системы является гомогенное распределение реагентов в поверхностном слое яйца (стадия дробления). Первый акт регионализации (рис. 57, I), обнаруживаемый как anterioposteriорная сегрегация на стадии ранней бластодермы, следует за спонтанным расслоением РД-системы. Негомогенный профиль концентрации соответствует первой стабильной бифуркационной ветви (рис. 55, ветвь 2, область b).

Вдоль границы раздела доменов однородной реализации выбора, т.е. в узловой точке концентрационного профиля, устанавливается диффузионно непроницаемый барьер (рис. 57, II). Вследствие этого в каждом из однородного детерминированных фрагментов яйца вновь устанавливается однородное распределение морфогена.

Следующий акт субдетерминации, фиксирующий состояние во втором детерминационном цикле, протекает по той же логической схеме теперь уже независимо в каждом из двух компартментов (рис. 57, II). После третьего компартментационного события имеем однозначно определенные трехразрядные комбинации для восьми продольных компартментов (рис. 57, III). Кодирующий смысл этих комбинаций выясняется после сопоставления с сегментарной организацией зародышевой полоски.

в) А н о м а л ь н а я с е г м е н т а ц и я в опытах на зародышах. Обстоятельный обзор экспериментальных результатов по индуцируемым на ранних этапах развития нарушениями процесса сегментации имеется в работе Сандера [7].

Рис. 57. Теоретическая схема последовательной компартментации, сопровождающей формирование бластодермы. I—III — последовательные шаги субдетерминации. Штриховая линия — профиль распределения $\bar{a}(x)$. Вертикальные линии обозначают диффузионную изоляцию. Стрелки показывают расположение локального фактора, управляющего выбором направления градиента концентрационного профиля $\bar{a}(x)$. Презумптивное значение зон бластодермы: A_{II} , A_C , A_3 — передний, средний и задний сегменты абдомена; G_{II} — гнатоцефалон; II — процефалон; C — сероза; T_{II} и T_3 — передний и задний сегменты торакса



Обращает на себя внимание одно обстоятельство, общее для всех серий опытов. А именно то, что любая манипуляция с яйцами приводит к неполностью детерминированному результату. Хотя всегда можно указать на наиболее типичный продукт экспериментального воздействия, с определенной вероятностью возникают различные отклонения в дефектной организации зародышевой полоски. Так, при наложении лигатуры на дробящееся яйцо сверчка в заднем фрагменте наиболее вероятно развитие частичного паттерна сегментов. Однако в том же фрагменте обнаруживают и полные последовательности сегментов, хотя и с низкой частотой.

Мы можем интерпретировать данное обстоятельство как отражение факта множественности стабильных макросостояний в управляющей РД-системе (см. рис. 55). В этом множестве всегда можно указать на одно стабильное (обладающее наибольшей областью притяжения в соответствующем фазовом пространстве) и ряд метастабильных состояний. В соответствии с этим можно говорить о более или менее вероятных результатах. Вероятностный характер эффектов физических воздействий в экспериментах с ранними зародышами насекомых может быть следствием множественности диссипативных структур, вытекающей из теории.

Обсудим далее некоторые конкретные эксперименты.

Лигатура. Опыты по фрагментации путем наложения поперечной перетяжки проводились на ранних стадиях развития (до бластодермы включительно) для различных групп насекомых [7]. Результаты оценивали по характеру сегментарной структуры зародышевой полоски. Общий вывод таков: на стадии, предшествующей бластодерме (дробление и миграция ядер), локальная лигатура приводит к дальнедействующим эффектам — развиваются частичные паттерны. Например, в заднем фрагменте формируется меньшее число сегментов, но каждый из них крупнее обычного. В результате в совокупном паттерне не достает целого ряда сегментов из основного плана строения личинки.

При этом оказывается, что спектр частичных паттернов зависит от момента наложения лигатуры, так что среднее число элементов нормальной последовательности, содержащихся в неполных зародышевых полосках, растет с возрастом, на котором осуществлена фрагментация [7]. Это общие выводы. Конкретная количественная иллюстрация на примере яиц *Smittia* и *Euscelis* приведена на рис. 58. В одном и том же месте — примерно на границе раздела презумптивной головы и торакса — накладывалась лигатура на стадиях дробления и бластодермы [37]. В обоих случаях в переднем фрагменте формировался один и тот же набор сегментов. В заднем фрагменте число отсутствующих сегментов было больше при ранней фрагментации. А именно, в первом случае по сравнению со вторым не хватало сегментов торакса [37].

С позиции описанной модели естественно считать главным эффектом лигатуры установление непроницаемого для латерального диффундирующих агентов барьера. Из рис. 58 видно, что результат этой процедуры должен оказаться различным при осуществлении ее на разных этапах компартментационного процесса.

Ранняя лигатура. На стадии дробления устанавливается антериопостериорное расслоение в управляющей химической системе. Однако пока

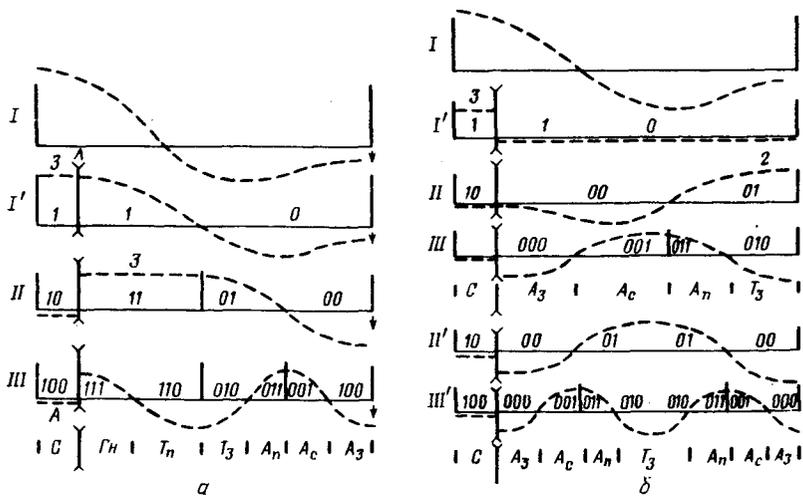


Рис. 58. Теоретическая схема компартментационного процесса при наложении лигатуры между презумптивной головой и тораксом на стадии дробления (а) и на более поздней стадии развития (б) у *Smittia* и *Euscelis* [37]: *Л* – место наложения лигатуры, *I–III* – последовательные шаги детерминации, *I'* – результат первого, *II'* – второго шагов субдетерминации. Остальные обозначения см. на рис. 55 и 57

нет клеток в кортикальном слое, задаваемая концентрационным профилем позиционная информация не транслируется.

Лигатура на этой стадии разделяет яйцо на два более коротких фрагмента (рис. 58а, *I'*), которые тем самым оказываются сдвинутыми в область стабильности однородных распределений. Теперь эволюция распределения $a(x, t)$ в двух фрагментах протекает независимо и определяется начальными условиями в них. В среднем высокие начальные концентрации в переднем фрагменте переводят состояние в нем на ветвь 3. В заднем фрагменте – здесь в начальный момент средняя концентрация $\bar{a} < 0$ – восстанавливается исходное однородное распределение (рис. 58а, *I'*). Это положение отражается в первом акте субдетерминации.

К моменту приобретения компетенции к очередному выбору передний фрагмент еще слишком короток для возникновения расслоения в нем. Более длинный задний фрагмент уже может расслоиться (рис. 58а, *II*). Третий детерминационный шаг приводит к расщеплению всех трех ранее сложившихся доменов (рис. 58а, *III*). В результате предсказывается последовательность сегментов, приведенная на рис. 58а. Укажем на отсутствие в ней сегментов гнатоцефалона и передних сегментов торакса, что соответствует данным наблюдения [37].

Здесь и ниже мы приводим лишь качественные объяснения, хотя модель позволяет провести и соответствующие количественные оценки.

Поздняя фрагментация. После завершения первого субдетерминационного акта и установления соответствующего коммуникационного барьера (рис. 58б, *II*) лигатура сказывается лишь на состоянии РД-системы в переднем компартменте. Задний фрагмент вообще не испытывает влияния лигатуры, поскольку отделен от нее диффузионным барьером.

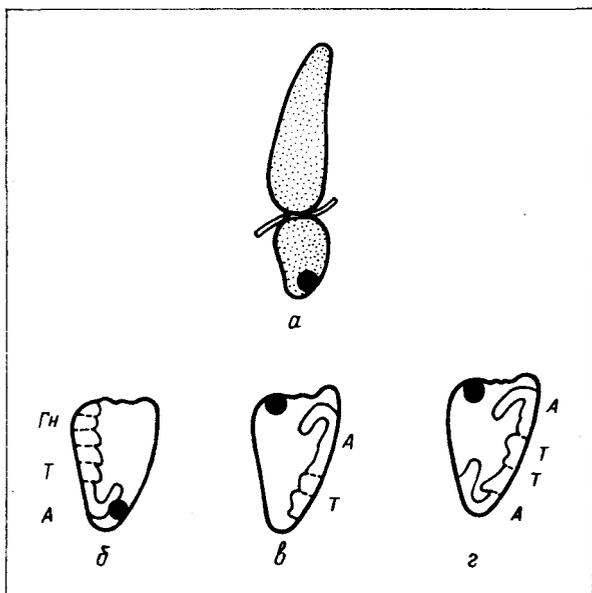


Рис. 59. Частичные паттерны зародышевых полосок из фрагментированных яиц *Euscelis* [37, 39]: а – схема опыта наложения лигатуры, б – паттерн заднего фрагмента, в, з – паттерн заднего фрагмента после перенесения материала постериорного полюса; А – abdomen, Гн – гнатоцефалон, Т – торакс

Судьба оказавшегося фрагментированным переднего компартамента объясняется так же, как и в предыдущем случае, и представлена на рис. 58 б. Модель предсказывает развитие паттерна с недостающим сегментом гнатоцефалона, что соответствует данным по лигатуре на стадии бластодермы [37].

Изложенное выше может служить объяснением расширения спектра частичных паттернов с возрастом фрагментации. Напомним: это явление отражает общую тенденцию раннего развития – от глобальной регуляции к полной мозаичности.

Опыты по перенесению постериорного материала [37–39]. Удобным объектом для этих опытов оказались яйца *Euscelis*. Область постериорного полюса в них отмечена присутствием симбионта, который переносили в передний отдел яйца на стадии дробления. Схема одного из таких опытов и его результат представлены на рис. 59. Операции переноса предшествовала лигатура в районе презумптивных передних сегментов (рис. 59а). Показаны два наиболее типичных результата наложения лигатуры и переноса материала яйца. Задний фрагмент яйца формирует редуцированную зародышевую полоску с нормальными задними сегментами, но ориентированными с обратной по отношению к нормальной полярности – в одном случае (рис. 59б, в); в другом (рис. 59з) формируются зеркально-симметричные паттерны, представляющие собой дублированные последовательности предыдущего случая. Отмечается также, что частичные паттерны, форми-

рующиеся в переднем фрагменте после лигатуры, но без последующего перенесения заднего материала, имеют, во-первых, нормальную полярность и, во-вторых, включают в среднем большее число сегментов (с дополнительными более передними сегментами), чем полярные структуры после наложения лигатуры и перенесения материала [37–39].

Рис. 60 поясняет описанные результаты на основе модели. Лигатура в передней области зачатка зародыша хотя и сохраняет полярный концентрационный профиль в заднем фрагменте (рис. 60а, I'), однако из-за уменьшения размера зародыша делает это состояние метастабильным. Это означает, что дополнительное возмущение может перевести РД-систему в стабильное в данных условиях гомогенное состояние. Необходимое возмущение вносит процедура переноса постериорного материала. Результатом является гомогенная субдетерминация в заднем фрагменте на первом шаге детерминации (рис. 60б, I'). Размер этого фрагмента превышает размеры двух компартов после первого шага компартиментации в полном яйце и в заднем фрагменте на рис. 60а, I'.

Поэтому к моменту достижения компетенции ко второй субдетерминации значения параметра μ в этой области оказываются в интервале ε (рис. 55), т.е. там, где уже стабильна ветвь четырех симметричных биполярных распределений и еще стабильна ветвь двух монотонных градиентов. Соответственно могут реализоваться два варианта расслоения, показанные на рис. 60б. Первый из них дает в итоге инверсию полярности в зад-

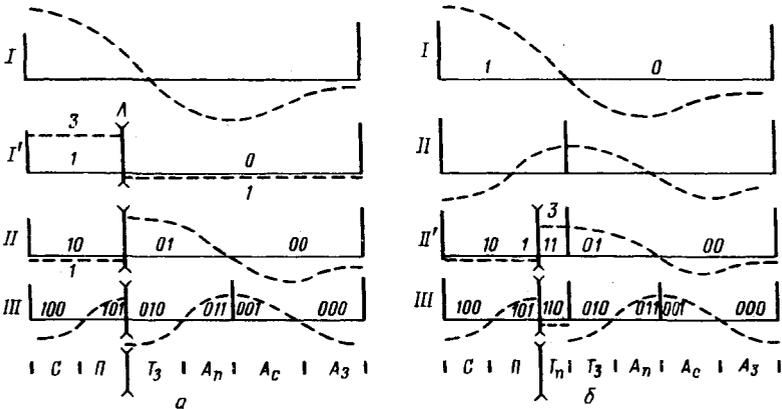
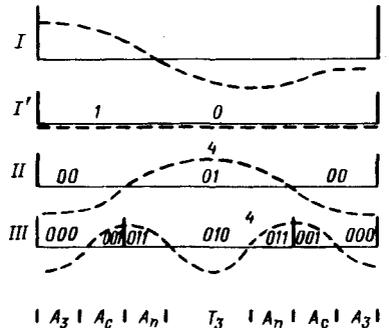


Рис. 60. Теоретическая схема компартиментационного процесса при наложении лигатуры между презумптивным процефаломом и серозой (а) с последующим перенесением постериорного материала (б) (ср. рис. 59). III' – результат третьего шага субдетерминации. Остальные обозначения см. в тексте и на рис. 55, 57, 58

Рис. 61. Формирование паттерна зародышевой полоски при сохранении гомогенности после первого шага субдетерминации. Обозначения см. на рис. 55, 57



нем фрагменте (рис. 60б, III); второй — удвоение задних структур (рис. 60б, III'). Как видно из рис. 60а, расщепление на субпопуляции в результате первого детерминационного шага приводит в конечном итоге к большему числу сегментов в постериорном фрагменте, чем в случае, когда этого расщепления не происходит.

Прокол и УФ-облучение яиц Smittia Эффекты от обоих воздействий, осуществлявшихся на стадии дробления, оказываются совпадающими. Эффект состоит в развитии зеркально-симметричных двубрюхих личинок [40, 41]. Снова будем относить наблюдаемые дефекты в основном плане строения к нарушениям макросостояния в управляющей РД-системе.

Прямыми следствиями прокола, очевидно, являются как частичное вытекание цитоплазмы из яйца и за счет этого уменьшение его размера, так и локальный отток морфогена [31].

Вероятно, УФ-облучение также локально обедняет РД-систему реакционно-активными агентами [31]. Более специфическое действие УФ-облучения здесь трудно предположить хотя бы потому, что вообще никаких искажений в пространственной организации зародышевой полоски не наблюдалось, если облучению подвергался центральный участок яйца.

На состояние управляющей РД-системы указанные воздействия влияют вполне понятным образом. Уменьшение длины переводит параметр μ в область меньших значений, где полярный профиль метастабилен или вообще отсутствует как стационарное состояние. Локальный отток морфогена вносит в начальное полярное распределение возмущение типа обсуждавшегося выше. Дальнейшая эволюция состояния приводит, как уже отмечалось, к стабильному однородному распределению (рис. 61, I'), если внесенное возмущение локализовано вблизи полюса. На рис. 61 показан предсказываемый результат трех детерминационных шагов в этом случае. Ожидаемое развитие зеркально-симметричных двубрюхих личинок действительно имеет место в эксперименте [40–42]. В рамках модели нетрудно понять также отсутствие какого-либо морфогенетического эффекта при облучении той же дозой ультрафиолетового света центральной области яйца [40, 41]. Напомним, что полярный профиль концентрации $a(x)$ при локальном возмущении оказывается более устойчивым по отношению к переходу в однородное распределение, когда такое возмущение приложено в центральной части профиля, чем при локализации возмущения вблизи границ. Это обстоятельство объясняет, почему при равной дозе облучения в одном случае нормальное развитие паттернов не нарушается, а в другом возникают описанные отклонения.

З а к л ю ч е н и е. Предложенная трактовка раннего эмбриогенеза насекомых опирается на ряд конкретных постулатов, каждый из которых может повлечь за собой вполне законные вопросы. Некоторые из них (не оригинальные для данной работы) уже обсуждались ранее, в частности вопросы, касающиеся комбинаторного кода детерминации [29]. Другие введены впервые.

Мы должны признать, что пока у нас нет прямых данных, подтверждающих законность сделанных допущений, и нет оснований отвергать альтернативные пути самоорганизации пространственного порядка в ходе ранней детерминации зародыша. Тем не менее мы решились строить теоретическую модель, поскольку думаем, что конструктивные гипотезы, осно-

вания и следствия которых можно проверить в эксперименте, следует выдвигать.

Первую апробацию предложенной модели можно считать уже состоявшейся. Опыты, в которых разнообразными физическими манипуляциями индуцировали морфогенетические аберрации, никак не учитывались при построении модели. Поэтому их законно рассматривать как тест для теории. Конечно, подобные тесты не могут заменить прямой проверки заложенных посылок теории. Одним из сильных сделанных предположений является предположение о диффузионных барьерах, разделяющих детерминационные компартменты в бластодерме. Кажется возможным попытаться исследовать этот вопрос, например с помощью красителей, вводимых в кортикальный слой яйца.

Следует отметить, что модель в том виде, как она представлена, не полна. Она способна трактовать лишь более или менее универсальные моды развития паттернов (общие для разных групп насекомых). К таковым относится, например, развитие фрагментированных яиц, качественно сходное в разных группах насекомых. Вместе с тем имеются и специфические моды. Например, довольно легко получить симметричные двубрюхие личинки у хирономид [40–42], тогда как у дрозофилы физическими манипуляциями это сделать не удастся. Объяснить подобную специфичность с позиций модели также можно, но уже привлекая некоторые дополнительные постулаты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Уоддингтон К. Морфогенез и генетика. — М.: Мир, 1964. — 258 с.
2. Wolpert L. // J. Theor. Biol. — 1969. — V. 25. — P. 1–47.
3. Stern C. // Genetic mosaics and other essays. — Cambridge: Harvard Univ. Press, 1968. — P. 135–173.
4. Tokunaga C. // Genetic mosaics and cell differentiation. — B.; N.Y.: Springer, 1978. — P. 157–204.
5. Summerbell D., Lewis J.H., Wolpert L. // Nature. — 1973. — V. 244. — P. 492–496.
6. Tickle C., Summerbell D., Wolpert L. // Nature. — 1975. — V. 254. — P. 199–204.
7. Sander K. // Adv. Insect. Physiol. — 1976. — V. 12. — P. 125–238.
8. Counce S. // Developmental systems: Insects. V. 2. — L.; N.Y.: Acad. Press, 1973. — P. 1–156.
9. Morata G., Lawrence P.A. // Nature. — 1977. — V. 265. — P. 211–216.
10. Schubiger G. // Develop. Biol. — 1976. — V. 50. — P. 476–488.
11. Garcia-Bellido A., Ripoll P. // Genetics mosaics and cell differentiation. — N.Y.; B.: Springer, 1977. — P. 119–156.
12. Carcia-Bellido A., Ripoll P., Morata G. // Nature New Biol. — 1973. — V. 245. — P. 251–253.
13. Garcia-Bellido A., Ripoll P., Morata G. // Develop. Biol. — 1976. — V. 48. — P. 132–147.
14. Illmensee K. // Insect Development. — Oxford: Blackwell, 1970. — P. 76–96.
15. Janning W. // Genetic mosaics and cell differentiation. — N.Y.; B.: Springer, 1977. — P. 1–28.
16. Gehring W., Nöthinger R. // Developmental systems: Insects. — N.Y.: Acad. Press, 1973. — P. 161–180.
17. Crick F.H.C., Lawrence P.A. // Science. — 1975. — V. 189. — P. 340–347.
18. Kauffman S.A., Shymko R.M., Trabert K. // Science. — 1978. — V. 199. — P. 259–270.

19. *Chan L.-N., Gering W.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1971. – V. 68. – P. 2217–2221.
20. *Illmensee K.* // Roux' Arch. Entwicklunqsmech. Organismen. – 1972. – V. 170. – P. 267–298.
21. *Wieschaus E., Gehring W.* // Develop. Biol. – 1975. – V. 50. – P. 249–263.
22. *Steiner E.* // Roux' Arch. Entwicklungsmech. Organismen. – 1976. – V. 180. – P. 9–30.
23. *Lawrence P.A., Morata G.* // Develop. Biol. – 1977. – V. 56. – P. 40–51.
24. *Garcia-Bellido A.* // Developmental Biology ICN-UCLA Symposia. – L.: Benjamin Press, 1975. – P. 118.
25. *Garcia-Bellido A.* // Cell patterning. – Amsterdam: Elsevier, Ciba Found. Symp. – 1975. – V. 29. – P. 161–182.
26. *Warner A.E., Lawrence P.A.* // Cell. – 1982. – V. 28. – P. 243–250.
27. *Weir M.P., Lo C.W.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1982. – V. 79. – P. 3232–3235.
28. *Kauffman S.A.* // Science. – 1973. – V. 181. – P. 310–318.
29. *Kauffman S.A.* // Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B. – 1981. – V. 295, № 1078. – P. 567–594.
30. *Hadorn E.* // Major problems in develop. biol. – L.: Acad. Press, 1966. – P. 85–104.
31. *Meinhardt H.* // J. Cell. Sci. – 1977. – V. 23. – P. 117–139.
32. *Turing A.* // Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser B. – 1952. – V. 237. – P. 32–72.
33. *Белинцев Б.Н.* // Успехи физ. наук. – 1983. – Т. 141. – С. 55–101.
34. *Хакеи Г.* Синергетика. – М.: Мир, 1980. – 300 с.
35. *Belontsev B.N., Livshits M.A., Volkenstein M.V.* // Z. Phys. Ser. B. – 1981. – Bd 44. – S. 345–352.
36. *Белинцев Б.Н.* // Онтогенез. – 1985. – Т. 16, № 2. – С. 99–106.
37. *Sander K.* // Roux' Arch. Entwicklungsmech. Organismen. – 1969. – V. 151. – P. 660–707.
38. *Sander K.* // Roux' Arch. Entwicklungsmech. Organismen. – 1959. – V. 151. – P. 430–497.
39. *Sander K.* // Sump. Germinal Cells and Development, Rome: Inst. Internat. Embryol., Fondazione Baselli, 1961. – P. 338–353.
40. *Kalthoff K., Sander K.* // Roux' Arch. Entwicklungsmech. Organismen. – 1968. – V. 161. – P. 129–146.
41. *Kalthoff K.* // Zool. Anz. Suppl. – 1971. – Bd 34. – S. 61–65.
42. *Schmidt O., Zissler D., Sander K., Kalthoff K.* // Develop. Biol. – 1975. – V. 46. – P. 216–221.

**КЛЕТОЧНАЯ АДГЕЗИЯ. ФИЗИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ,
ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТКИ
С СУБСТРАТОМ *)**

Целый ряд форм клеточной активности обусловлен контактным взаимодействием клетка—клетка и клетка—субстрат. От способности клеток прикрепляться к субстрату или поверхности другой клетки существенно зависят морфологические изменения, локомоция и деление клеток [1, 2], а в ряде случаев и цитодифференцировка [3, 4].

Со стороны клетки во взаимодействии с внешним субстратом участвуют интегральные мембранные белки (рецепторы) с экспонированными наружу участками, содержащими углеводный компонент [5]. Это взаимодействие специфично: данному клеточному рецептору соответствует вполне определенный партнер, связь с которым обеспечивает прикрепление клетки к субстрату или поверхности другой клетки [6, 7].

Помимо молекулярно-биологического есть и другой аспект проблемы. До образования контакта соответствующие рецепторы, диффундируя в плоскости мембраны и не проявляя никаких признаков взаимодействия, распределены однородно по всей поверхности клетки. Прикрепление клетки к субстрату имеет пороговый, кооперативный характер [8, 9] и сопровождается аккумуляцией рецепторов в контактной зоне [10], но аккумуляцией не в одну непрерывную область, а в дискретный набор пятен — фокальных и плотных контактов [11–13]. Именно макроскопические черты клеточной адгезии, и прежде всего указанная дискретность, являются предметом рассмотрения в данном разделе.

Кроме специфического взаимодействия, обеспечивающего сцепление клеточной поверхности с внешним субстратом, в адгезию вовлечены неспецифические силы. Речь идет о взаимодействии, опосредованном внешним полисахаридным покрытием клетки — гликокаликсом [14]. Этот слой с его распределенным зарядом и гидрофильностью создает "отталкивательный" барьер, препятствующий сближению поверхности клетки с субстратом. Если мембрана прижата к субстрату уже образовавшимися связями, то образование новых таких связей не требует совершения работы против указанных неспецифических сил отталкивания. По этой причине добавление новых связей облегчено по сравнению с появлением первых, чем и обусловлена кооперативность процесса. Более строгий анализ адгезии, основанный

*) См. Биологические мембраны. — 1988. — Т. 5, № 10. — С. 1100–1107.

на этих качественных соображениях, проведен в работе Белла и соавторов [14].

В отличие от [14] в данной работе процесс специфического связывания рецепторов с иммобилизованными молекулами подложки трактуется в рамках кинетического, а не термодинамического подхода. Но более существенно то, что мы предполагаем размороженной дополнительную степень свободы. А именно, допускается неоднородное сближение мембраны с подложкой за счет изгибной деформации первой. Те же причины, которые делают процесс адгезии кооперативным, как показано, оказываются достаточными для спонтанного, неоднородного искривления мембраны в контактной зоне. Такое искривление сопровождается латеральным перераспределением рецепторов — их локальными скоплениями в местах более тесного контакта.

Ф о р м у л и р о в к а м о д е л и. Адгезия клетки к субстрату в предлагаемой модели является результатом воздействия двух подсистем — химической и механической. Рецепторы — погруженные в мембрану гликопротеины — и специфические лиганды к ним, иммобилизованные на поверхности подложки, составляют химическую подсистему. Рецепторы взаимодействуют с лигандами, образуя специфический комплекс, закоренный подложкой.

Вторым участником адгезии является клеточная мембрана. По отношению к рецепторам мембрана представляет собой ограничивающую связь. Согласно многочисленным наблюдениям, рецепторы способны перемещаться относительно мембраны только в латеральном направлении. Именно латеральная диффузия обеспечивает аккумуляцию рецепторов в контактной зоне [10]. Нормальные же движения рецепторов, обеспечивающие нужную для образования связи близость с субстратом, возможны только вместе с самой мембраной (рис. 62).

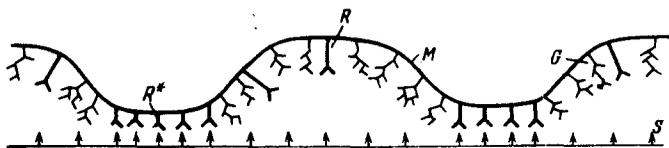


Рис. 62. Схематическое представление адгезионного контакта клетка — субстрат: R — рецепторы, обеспечивающие прикрепление клетки к субстрату, R^* — адгезионные комплексы, G — молекулы гликокаликса, M — мембрана, S — иммобилизованный лиганд

Таким образом, рецепторы, которым термодинамически выгодно образовать связь с молекулами на подложке, создают силу, прижимающую к ней мембрану.

Если l_0 — ширина зазора между мембраной и подложкой, соответствующая равновесной конфигурации комплекса, то ширине этого промежутка ξ , отличной от l_0 , соответствует избыточная энергия комплекса $\varphi(\xi)$. В упругом приближении $\varphi(\xi)$ выражается как [14]

$$\varphi(\xi) = \varphi(l_0) + \alpha(\xi - l_0)^2. \quad (1)$$

Здесь феноменологический коэффициент α не следует отождествлять с

жесткостью непосредственной связи рецептор—лиганд. Он определяется жесткостью наиболее гибкого звена всего комплекса мембрана — рецептор — лиганд — подложка. Таким звеном, в частности, могут быть участки молекул рецептора и лиганда, лишенные вторичной структуры (см. соответствующие оценки в "Приложении"). В приближении (1) нормальная, прижимающая мембрану к подложке сила $f_{сп}$ (на один рецептор) выражается в виде

$$f_{сп} = -\partial\varphi/\partial\xi = -2\alpha(\xi - l_0). \quad (2)$$

Этой силе противодействует нормальное давление в слое гликокаликса. Образующий кислыми полисахаридами этот слой дает два вклада в сопротивление сжатию:

$$f_{от} = f_{эл} + f_{см}. \quad (3)$$

Первый связан с электростатическим отталкиванием отрицательно заряженных сегментов и оценивается величиной осмотического давления малых ионов раствора, компенсирующих заряд сегментов в соответствии с донанновским равновесием [15]. Вторая компонента отталкивания связана с гидрофильностью молекул гликокаликса — замещение контактов сегмент — растворитель контактами сегмент — сегмент при сжатии термодинамически невыгодно [16]. Согласно оценкам, сделанным в работе Абни и соавторов [17], доминирует второй вклад. Соответствующее ему выражение для свободной энергии на единицу площади как функция толщины слоя $G(\xi)$ может быть представлено в виде [16]

$$G = 2\kappa T(V_s^2/V_1)(\frac{1}{2} - \chi)\sigma^2 \int \rho^2 dz + 2\kappa T\nu[(\delta^2 - 1)/2 - \ln \delta], \quad (4)$$

где V_s — объем сегмента молекул гликокаликса, V_1 — объем молекул растворителя, σ — число сегментов, приходящееся на единицу площади мембраны, $\rho(z)$ — функция распределения плотности сегментов по нормальной координате, δ — степень сжатия гликокаликса: $\delta = \xi/L$.

За счет изгиба мембраны сближение ее с подложкой может быть неоднородным. Но при этом должна быть совершена дополнительная работа, связанная с изгибной жесткостью мембраны и с тангенциальным натяжением в ней. Однако эта работа может оказаться меньше, чем работа при однородном сближении в поле неспецифических сил. Это и выясняется ниже.

Влияние деформации мембраны на реакцию взаимодействия рецептора с лигандом вытекает из зависимости энергии связи от ширины зазора между мембраной и подложкой $\varphi(\xi)$ [14]. Для константы равновесия этой реакции имеем

$$K(\xi) = K(l_0) \exp[-\alpha(\xi - l_0)^2/\kappa T]. \quad (5)$$

Мы ограничим пока рассмотрение той частью поверхности клетки, которая прилегает к поверхности субстрата, и, находясь в которой, рецепторы могут образовывать связь с лигандом (контактная зона). Площадь этой части считается неизменной (т.е. распластывание в процессе адгезии, как относительно медленный процесс, не учитывается). Наличие дорсальной части клетки, в пределах которой рецепторы свободно диффундируют, ни с чем не взаимодействуя, должно отразиться в граничных условиях, пока для нас не существенных.

Образование связи рецептора (R) с лигандом (S) будем рассматривать как обратимый химический акт согласно схеме



Оставляя за буквами R , S , R^* значения соответствующих концентраций (на единицу поверхности) и учитывая диффузию свободных рецепторов, имеем кинетическую систему, соответствующую схеме (6):

$$\begin{aligned} \frac{\partial R}{\partial t} &= -k_1 SR + k_2 R^* + D \nabla^2 R, \\ \frac{\partial R^*}{\partial t} &= k_1 SR - k_2 R^*. \end{aligned} \quad (7)$$

Для определенности все изменение константы равновесия реакции (6) $K = k_1/k_2$, связанное с избыточной энергией $\varphi(\xi)$ комплекса R^* , мы будем целиком относить за счет лишь одной константы скорости k_1 . Все последующие результаты качественно не изменяется как в обратном предельном случае, когда вся зависимость от ξ в (5) относится только к k_2 , так и в промежуточных случаях, когда от ξ зависят обе константы скорости при условии (5).

Через зависимость $k_1(\xi)$ поведение химической подсистемы связано с состоянием механической. Соответственно описание должно быть дополнено уравнением для последней.

Изгиб мембраны в первом приближении задается неоднородным в плоскости $\{x, y\}$ смещением в нормальном к этой плоскости направлении: $\xi(x, y)$. В масштабе времени всего процесса $\tau \sim 1$ мин мембрану как механическую систему естественно считать находящейся в состоянии равновесия. Тем самым искомое уравнение, описывающее механическую подсистему, выражает условие баланса нормальных сил

$$f_{\text{изг}} + f_{\text{нат}} + f_{\text{сл}} + f_{\text{от}} = 0. \quad (8)$$

В этот баланс входят силы: $f_{\text{изг}} = B \Delta^2 \xi$ — сила, связанная с изгибной жесткостью мембраны (B — коэффициент изгибной жесткости); $f_{\text{нат}} = -T \Delta \xi$ — сила, связанная с тангенциальным натяжением мембраны (T — величина этого натяжения); прижимающая мембрану к подложке сила $f_{\text{сп}} = 2\alpha R^*(\xi - l_0)$ (R^* — число генерирующих эту силу специфических комплексов лиганд — рецептор на единицу поверхности); наконец, $f_{\text{от}}$ — сила, обусловленная давлением в гликокаликсе: $f_{\text{от}} = -\partial G / \partial \xi$.

Подставляя приведенные выражения в (8), имеем уравнение относительно функции $\xi(x, y)$:

$$\begin{aligned} B \Delta^2 \xi - T \Delta \xi + 2\alpha R^*(\xi - l_0) + f_{\text{от}}(\xi) &= 0 \\ \left(\Delta = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} \right). \end{aligned} \quad (9)$$

Уравнения (7), (9) образуют замкнутую систему, в принципе описывающую как само образование специфических комплексов R^* , так и их

латеральное перераспределение, сопровождающее неоднородный изгиб мембраны.

Анализ модели. Аналитическое решение системы (7), (9) в силу ее нелинейности недоступно. Однако важные вопросы можно выяснить уже в линейном приближении. В частности, вопрос о пространственной модуляции контактной зоны.

Примем в качестве исходного однородное равновесное состояние для обеих подсистем — химической и механической. Такое удовлетворяет уравнениям (7), (9) при условии $\dot{R} = \dot{R}^* = 0$. В этом состоянии определены значения ξ, R и R^* :

$$\begin{aligned} \xi &= \xi^0, \quad R = R^0, \quad R^* = R^{*0}, \\ R^0/R^{*0} &= k_2/(k_1(\xi^0)S). \end{aligned} \quad (10)$$

Далее в рамках линеаризованных уравнений (7), (9) решается вопрос об устойчивости этого состояния по отношению к малоамплитудным пространственно неоднородным возмущениям $\delta\xi, \delta R, \delta R^*$. При этом попутно выясняется, какой пространственный режим адгезионного взаимодействия реализуется в случае, если исходное однородное состояние окажется неустойчивым. Именно форма наиболее быстро растущей моды возмущения определяет этот режим.

Начнем с предельного случая "сильной адгезивности" подложки, чему соответствует условие

$$k_2 \ll k_1 S. \quad (11)$$

При константе скорости диссоциации комплекса R^* $k_2 \gtrsim 10^{-1} \text{ с}^{-1}$ и характерном масштабе пространственной неоднородности $\sim 1 \text{ мкм}$ (что соответствует реальности) стадией, лимитирующей скорость в реакции связывания R с S , является диффузия свободных рецепторов. В этом случае справедливо приближение локального равновесия, для которого

$$R(x, y) = \frac{k_2}{k_1(\xi^0)S} R^*(x, y) \ll R^*(x, y). \quad (12)$$

Тогда уравнение латерального перераспределения связанных рецепторов будет

$$\frac{\partial R^*}{\partial t} = \frac{Dk_2}{S} \nabla^2 \frac{R^*}{k_1(\xi)}, \quad (13)$$

или в линейном приближении

$$\frac{\partial r^*}{\partial t} = d_1 \nabla^2 r^* + d_2 \nabla^2 \xi, \quad (14)$$

где

$$r^* \equiv \delta R^*, \quad d_1 = \frac{Dk_2}{Sk_1(\xi^0)}, \quad d_2 = -d_1 R^{*0} \frac{k'_1(\xi^0)}{k_1(\xi^0)}. \quad (15)$$

В таком приближении условие механического равновесия выглядит как

$$B\Delta^2 \xi - T\Delta \xi + br^* + a\xi = 0, \quad (16)$$

где

$$b = 2\alpha(\xi^0 - l_0), \quad a = 2\alpha R^{*0} - \omega, \quad \omega = -\frac{\partial f_{\text{от}}(\xi^0)}{\partial \xi} > 0.$$

Отметим, что в рамках механической подсистемы, т.е. без учета перераспределения рецепторов, условием устойчивости является

$$a > 0. \quad (17)$$

Это условие мы в дальнейшем предполагаем выполненным.

Не учитывая влияния границ, имеем нормальные моды уравнений (14), (16) вида

$$r^*, \xi \sim \exp [\mu(k)t + ikr] \quad (18)$$

с временным показателем $\mu(k)$, зависящим от волнового числа k как

$$\mu(k) = -d_1 k^2 + \frac{d_2 b k^2}{a + Tk^2 + Bk^4}. \quad (19)$$

Форма этой зависимости, показанная на рис. 63, существенно меняется при критическом отношении параметров:

$$d_1 = d_2 \frac{b}{a},$$

или, имея в виду (15), при

$$Q \equiv \frac{4\alpha\varphi(\xi^0)R^{*0}}{\kappa T(2\alpha R^{*0} - \omega)} = 1. \quad (20)$$

Оно определяет порог качественного изменения поведения. По одну сторону порога ($Q < 1$) исходное состояние с его однородным распределением рецепторов и плоской мембраной устойчиво. При $Q > 1$ устойчивость нарушается неоднородными модами возмущения δR^* , $\delta \xi$. При этом,

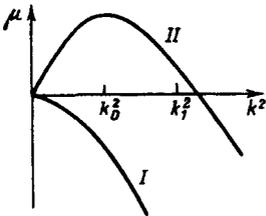


Рис. 63. Вид дисперсионной зависимости $\mu(k^2)$, соответствующий выражению (19), по разные стороны от порога $Q = 1$: I — $Q < 1$, II — $Q > 1$

как видно из рис. 63, целый диапазон длин волн $\lambda > \lambda_1 = 2\pi/k_1$ синусоидальных мод изгиба мембраны и аккумуляции рецепторов приобретает положительный инкремент. Темп нарастания амплитуды возмущений оказывается наибольшим для мод с волновым числом k_0 , соответствующим максимуму на дисперсионной кривой $\mu(k^2)$. Именно этой модой должны определяться пространственная модуляция изгиба мембраны и концентрации связанных рецепторов в зоне контакта клетки с подложкой.

В рассмотренном предельном случае сильной адгезивности мы не в состоянии оценить эффект изменения плотности адгезивных мест на подложке. От параметра S , характеризующего эту плотность, не зависят ни пороговое отношение параметров (20), ни пространственная модуляция контактной зоны (величина k_0).

Однако такая зависимость должна появиться в диапазоне более низких плотностей лиганда S . В этом случае уже нет оснований для приближения локального равновесия (12). Не вводя этого приближения, имеем вместо редуцированной модели латерального перераспределения рецепторов (13) исходную, более полную модель с реакцией и диффузией (7).

По-прежнему считаем исходным механически равновесное состояние плоской мембраны с однородным распределением рецепторов (10). Линеаризованная по малым возмущениям r , r^* ($\equiv \delta R$, δR^*) этого состояния система уравнений (7) имеет вид

$$\begin{aligned} \frac{\partial r}{\partial t} &= -k'_1(\xi^0)SR^0\xi - k_1(\xi^0)Sr + k_2r^* + DV^2r, \\ \frac{\partial r^*}{\partial t} &= k'_1(\xi^0)SR^0\xi + k_1(\xi^0)Sr - k_2r^*. \end{aligned} \quad (21)$$

Вместе с прежним уравнением (16), связывающим локальную деформацию мембраны $\xi(x, y)$ с локальной аккумуляцией рецепторов r^* , получаем для нормальных мод вида (18) дисперсионное уравнение

$$\mu^2 + \mu [k_1S + k_2 + Dk^2 + p(k^2)] + Dk^2 [k_2 + p(k^2)] = 0, \quad (22)$$

где $p(k^2) = k'_1(\xi^0)SR^0b/(a + Tk^2 + Bk^4)$.

Снова, как и в предыдущем, более частном случае, имеем два качественно различных варианта дисперсионной кривой — монотонный и немонотонный. Переход от одного варианта к другому соответствует качественному изменению поведения. Пока кривая $\mu(k^2)$ монотонна (при этом она, как нетрудно видеть, убывает с ростом k^2 от значения $\mu(0) < 0$), мембрана остается плоской и рецепторы распределены в ней однородно. Немонотонность $\mu(k^2)$ сопряжена с появлением интервала волновых чисел k , в пределах которого инкремент соответствующих мод положителен. Это означает, как и ранее, нарушение устойчивости однородного состояния и доминирующее нарастание определенной синусоидальной моды изгиба мембраны и концентрации рецепторов.

В результате вместо однородного притяжения к подложке контакт с ней становится дискретно пятнистым. Однако в отличие от предельного случая "сильной адгезивности" теперь пороговое отношение параметров включает и плотность лигандов S .

Тем самым последняя оказывается дополнительным параметром, регулирующим процесс адгезии. С ростом плотности лиганда взаимодействие клетки с субстратом не меняется, пока $S < S_{кр}$, и качественно изменяется при $S > S_{кр}$. В точке $S = S_{кр}$ имеет место кооперативный переход с нарушением макроскопической однородности связанных рецепторов и периодическим изгибом мембраны. Критическое значение плотности лиганда $S_{кр}$ определено выражением

$$S_{кр} = k_2\alpha / (|k'_1| R_0b - k_1a).$$

Строго говоря, мы пока показали лишь тенденцию к дискретизации контакта, но не нашли соответствующее устойчивое решение. Анализ нелинейных уравнений, в рамках которых это решение и может быть получено, должен принять в расчет ряд дополнительных факторов, способных модулировать адгезионное взаимодействие клетки с субстратом, в том числе: вытеснение фибронектина из области фокального контакта [18], возможное и вероятное вытеснение материала гликокаликса из этой же области [17], реорганизацию цитоскелетных структур [1].

На необходимость такого расширения модели указывают не только приведенные сведения макроскопического характера, но и наблюдаемая макроскопическая картина адгезии. По-видимому, только на начальном этапе прикрепления клетки к субстрату вся ее вентральная (обращенная к субстрату) поверхность участвует в формировании фокальных контактов. Именно к этому этапу относится представленная модель. Затем имеет место дальнейшая перегруппировка контактов, в результате которой они оказываются локализованными преимущественно вблизи края вентральной стороны клетки [11, 19]. Основная же часть этой поверхности, по-видимому, вообще устраняется из адгезии. В ходе поляризации подвижных клеток происходит дальнейшее ограничение области локализации адгезионного контакта [19]. Причины, вызывающие такую перегруппировку фокальных контактов, еще требуют выяснения.

Обсуждение. Представленное рассмотрение дает качественный ответ на вопрос о причине дискретности контактной зоны при взаимодействии клетки с адгезивным субстратом. Состояние, в котором мембрана сшивками (клеточный рецептор — иммобилизованный на субстрате лиганд) однородно прижимается к субстрату, в определенных в данной работе условиях оказывается неустойчивым. Это происходит вследствие того, что латеральное перераспределение рецепторов помимо диффузионной составляющей имеет составляющую направленного сноса в области более тесного прилегания мембраны к подложке (уравнение (14)). В результате здесь локально повышается число сшивок $R - S$, что в свою очередь приводит к еще большему локальному сближению клеточной поверхности с подложкой (уравнение (9)).

Существенно, что данный механизм обеспечивает не просто локальную аккумуляцию сшивок, но и коллективную моду поведения рецепторов и мембраны, порождающую периодический паттерн дискретных контактов.

На основании предложенной модели не представляет труда получить предсказание относительно зависимости, например, числа фокальных контактов на единицу площади контактной зоны от параметров взаимодействия клетки с субстратом (α, ω) или от количества соответствующих рецепторов (R) и комплементарных им лигандов (S) на подложке.

Некоторые из названных параметров доступны контролируемому изменению в эксперименте. Так, плотность заряда в контактной зоне и тем самым силу неспецифического отталкивания можно варьировать путем обработки поверхности субстрата полилизинном, как это делалось в работе Сугимото [20]. Однако, насколько нам известно, параллельный контроль количества фокальных контактов не проводился. Поэтому пока

мы не можем количественно сравнить предсказания модели с соответствующими данными.

П р и л о ж е н и е. Для того чтобы убедиться в реалистичности описываемого моделью механизма, приведем некоторые количественные оценки.

Согласно представленной модели, пространственный масштаб неоднородности в контактной зоне грубо оценивается на основании выражения (19) из условия

$$a \approx Tk^2, \quad k = 2\pi/\lambda. \quad (I)$$

Для оценки входящих в (I) параметров будем приписывать, как и в работе Белла и соавторов [14], коэффициенту α значение, соответствующее жесткости клубкообразной полимерной цепочки (энтропийная упругость):

$$\alpha \approx \kappa T/L^2 \sim 10^{-1} \text{ дин/см.} \quad (II)$$

Здесь L — линейный размер цепочки, в ненапряженном состоянии $L \sim 10$ нм. Среднюю концентрацию (на единицу поверхности) рецепторов R^{*0} считаем порядка 10^{11} см^{-2} , что соответствует 10^5 рецепторов на площадь 100 мкм^2 . Это дает оценку параметра a в соответствии с его определением (16): $a \sim 2 \cdot 10^{10} \text{ дин/см}^3$.

Величина тангенциального натяжения мембраны оценивается как $T \sim 10^{-1} \text{ дин/см}$. Тогда для λ , в соответствии с (I), имеем

$$\lambda = 2\pi/k \approx 2\pi \sqrt{T/a} \sim 0,1 \text{ мкм.}$$

Эта величина близка к реально наблюдаемой [11]. Заметим, что при данном значении k члены a , Tk^2 и Bk^4 в уравнении (19) оказываются одного порядка при коэффициенте изгибной жесткости $B \sim 10^{-12} \text{ эрг}$.

ДИНАМИКА РЕЛЬЕФА КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ *)

Очень многие типы клеток животных, а также ряд одноклеточных обладают подвижностью. Клеточная подвижность выражается в поступательных перемещениях по подложке и в изменении формы.

Элементарным актом амебоидной подвижности является формирование различных видов отростков на клеточной поверхности. Наиболее характерные элементы рельефа поверхности — тонкие цилиндрические отростки (филоподии, микровили) и складки поверхности такой же толщины (0,2 мкм). Названные образования не статичны, но способны перемещаться по поверхности клетки, сохраняя свою форму [1].

Установлено, что механическая активность клеточной поверхности обусловлена довольно узким (0,1 — 0,2 мкм) поверхностным слоем, образованным плазматической мембраной и подстилающей сетью плотно полимерного матрикса — кортекса. Для интересующих нас клеток с амебоидным типом движения кортекс представляет собой активный гель,

*) Статья написана совместно с М. Барановым.

в котором нити из полимеризованного актина нековалентно скреплены белковыми сшивками [1, 21]. Кортекс не статичен, но пребывает в состоянии динамического равновесия, обмениваясь в процессах сборки — разборки актиновых филамент с пулом мономерного актина в цитоплазме [22].

Данное равновесие может смещаться локально в ту или иную сторону в зависимости от белков или гликопротеинов мембраны. В частности, показано, что при кластеризации рецепторов к лектину — конканавалину А (Con A) под кластером в мембране повышается плотность кортикальной сети [23]. Рецепторы к Con A, во-первых, обеспечивают появление центров полимеризации актина и, во-вторых, стабилизируют полимерную форму [24]. Показано также, что на поверхности отростков концентрация некоторых белковых компонентов мембраны (БКМ) на порядок превышает их среднюю концентрацию [25].

Задача заключается в том, чтобы построить на основании приведенных данных теоретическую модель наблюдаемой динамики рельефа клеточной поверхности.

Отправные постулаты модели таковы.

1. Латеральная подвижность липидов и БКМ в плоскости мембраны. Такая подвижность — надежно установленный факт, который нашел отражение в так называемой жидкомозаичной модели мембраны [26].

2. Локальная концентрация БКМ приводит к локальному повышению плотности кортикальной сети.

3. Актин, а вместе с ним и кортикальная сеть заряжены (это обстоятельство отражается в регуляции процесса полимеризации актина изменением ионной силы раствора).

Из условия электронейтральности следует, что заполняющая кортекс цитоплазматическая жидкость (ЦЖ) должна содержать избыток низкомолекулярных контрионов в концентрации, равной средней концентрации заряда на актине. С ростом плотности кортикальной сети в ней растет осмотическое давление — давление "газа контрионов". Избыточное осмотическое давление может вызывать потоки ЦЖ.

Ф о р м у л и р о в к а м о д е л и. В рамках выделенных постулатов можно предложить следующее качественное объяснение механической поверхностной активности. Предположим, на мембране флуктуационно возникло локальное повышение концентрации БКМ. Это приведет к увеличению плотности кортикальной сети под этим участком мембраны — увеличится осмотическое давление "газа контрионов" — появятся потоки ЦЖ, направленные к сгущению кортикальной сети — потоки увлекут БКМ к данному участку мембраны. Таким образом, можно ожидать появления неустойчивости, приводящей к макроскопическим потокам БКМ и движению самой мембраны.

Более строгое рассмотрение в рамках названных физических посылок удается провести с помощью математической модели. Рассмотрим поток ЦЖ внутри кортикального слоя, вызванный перепадами осмотического и гидростатического давлений. При движении сквозь плотную полимерную ось главный вклад в трение дает трение об эту сеть. Объемный поток выражается в этом случае в виде

$$j = L(\nabla\pi - \nabla p), \quad (1)$$

где L – коэффициент гидравлической проницаемости кортикальной сети для ЦЖ (оценка, сделанная на основе [27], дает $L \sim 10^{-9}$ дин $^{-1} \cdot$ с $^{-1} \cdot$ см 4), π – осмотическое давление, p – гидростатическое давление.

Пренебрегая "сухим" объемом кортекса, можно записать уравнение несжимаемости ЦЖ:

$$(\nabla \cdot j) = 0. \quad (2)$$

Разложим далее j на нормальную к плоскому положению мембраны и тангенциальную составляющие (рис. 64):

$$j = j^n + j^t. \quad (3)$$

Толщина h кортикального слоя предполагается достаточно малой ($\sim 0,2$ мкм), чтобы можно было считать тангенциальную составляющую

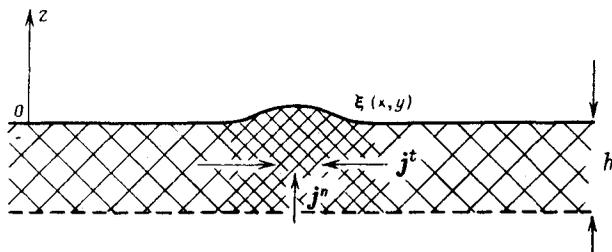


Рис. 64. Кортикальный слой и гидродинамические потоки в нем, вызванные неоднородностью плотности сети (градиентами осмотического давления)

j^t независимой от координаты z в пределах кортикального слоя. Для нормальной составляющей потока j^n граничные условия записываются в виде

$$j^n|_{z=0} = \rho \xi_t, \quad j^n|_{z=-h} = M(\pi - p), \quad (4)$$

где ρ – плотность ЦЖ (далее для простоты записи полагаем $\rho = 1$), M – коэффициент гидравлической проницаемости границы раздела кортикального слоя и объема цитоплазмы ($M \sim 10^{-5}$ дин $^{-1} \cdot$ с $^{-1} \cdot$ см 3 [28]). Значения осмотического и гидростатического давлений отсчитываются от уровня в объеме цитоплазмы. Интегрирование (2) по z в пределах толщины кортикального слоя с учетом (4) и (1) дает

$$\xi_t - M(\pi - p) + hL(\Delta_s \pi - \Delta_s p) = 0 \quad (5)$$

(индекс s означает дифференцирование по координатам поверхности x и y).

Исходной причиной возникновения осмотических перепадов в кортикальной сети согласно предлагаемой модели является перераспределение БКМ. Последнее обусловлено: а) латеральной диффузией, б) увлечением потоком в кортикальном слое, в) обратимым связыванием БКМ с кортикальной сетью [21]. Учитывая это, уравнение для поверхностной плотности свободных рецепторов $\gamma(x, y)$ можно записать в виде

$$\gamma_t = -\nabla(\gamma t j^t) + D \Delta_s \gamma, \quad (6)$$

где t – коэффициент увлечения рецепторов потоком, D – коэффициент диффузии рецепторов в плоскости мембраны ($D \sim 10^{-9}$ см $^2 \cdot$ с $^{-1}$). Пред-

полагается, что равновесие по обратимому связыванию БКМ с цитоскелетом устанавливается за время, много меньшее остальных характерных времен, и поэтому влияние обратимого связывания БКМ сводится к простой перенормировке коэффициента диффузии D .

Наконец, для замыкания системы уравнений (5) и (6) необходимы выражения для осмотического и гидростатического давлений. Уравнение Лапласа для внешней поверхности клетки определяет связь гидростатического давления с локальной кривизной мембраны:

$$p = p_0 - \sigma \Delta_s \xi, \quad (7)$$

где σ — коэффициент поверхностного натяжения мембраны ($\sigma \sim 0,1$ дин · см⁻¹). Осмотическое давление в кортексе, согласно сделанным предположениям, определяется поверхностной концентрацией БКМ. Для простоты мы считаем связь линейной:

$$\pi = \pi_0 + \alpha \gamma. \quad (8)$$

(Более общее нелинейное соотношение не меняет окончательных выводов модели.) Исходя из того, что характерный масштаб рельефа клеточной поверхности ~ 1 мкм, а объемная доля в кортексе полимеров, образующих сеть, $\sim 10^{-3}$ [28] (что дает оценку концентрации актина $\sim 10^{16}$ см⁻³), можно оценить градиенты давлений: $|\nabla p| \sim |\nabla \pi| \sim 10^7$ дин · см⁻³. Характерное значение средней поверхностной плотности свободных рецепторов $\sim 10^{12}$ см⁻². Все это дает возможность оценить параметр $\alpha \sim 10^{-9}$ дин.

Подставляя (7) и (8) в уравнения (5) и (6), получаем систему

$$\gamma_t + \nabla_s [\gamma m L (\alpha \nabla_s \gamma + \sigma \nabla_s \Delta_s \xi)] - D \Delta_s \gamma = 0, \quad (9)$$

$$\xi_t - M(\alpha \gamma + \pi_0 - p_0 + \sigma \Delta_s \xi) + h L (\alpha \Delta \gamma + \sigma \Delta^2 \xi) = 0.$$

Заметим, что в активной части ламеллы распластанного фибробласта весь объем цитоплазмы может быть занят кортикальным слоем, и тогда необходимо положить $M = 0$, что не влияет на дальнейшие выводы.

Анализ модели. Легко видеть, что система (9) имеет однородное стационарное решение, соответствующее плоской поверхности клетки, $\xi_0, \gamma_0 \sim \text{const}(r, t)$. Исследование этого решения на устойчивость по отношению к малоамплитудным возмущениям в рамках линейного приближения дает набор нормальных мод вида $\exp(\lambda t + ikr)$ и дисперсионное уравнение, связывающее временной показатель λ с волновым числом k :

$$2\lambda = P \pm \sqrt{P^2 - Q}, \quad (10)$$

где $P = (\gamma_0 m L \alpha - D - M \sigma) k^2 - h L \sigma k^4$, $Q = 4 \sigma k^4 D (M + h L k^2)$.

Интересное поведение можно ожидать, когда

$$\kappa \equiv \gamma_0 m L \alpha - D - M \sigma > 0. \quad (11)$$

В этом случае зависимость $P(k^2)$ немонотонна и имеет максимум при

$$k^2 = k_c^2 \equiv \kappa / (2 h L \sigma) \neq 0. \quad (12)$$

Исходное однородное состояние устойчиво, пока $P_{\max} = P(k_c^2) < 0$ ($\text{Re } \lambda < 0$). С изменением параметров устойчивость нарушается, когда

P_{\max} становится положительным. При этом положительный инкремент приобретают моды с волновым числом в некотором интервале вблизи k_c (Δk^2 на рис. 65). Подчеркнем, что вблизи порога неустойчивости для волновых чисел в некоторой окрестности k_c заведомо оказывается $P^2 < Q$. Это означает, что λ имеет мнимую часть, тем самым неустойчивые моды оказываются волновыми. Частота критической моды выражается в виде

$$\omega_c^2 = Dk_c^4 \sigma (M + hLk_c^2). \quad (13)$$

Для исследования поведения системы за порогом неустойчивости необходимо вернуться к нелинейной системе уравнений (9). Для краткости записи представим эту систему в операторном виде:

$$\hat{L}u + \hat{N}(u) = 0. \quad (14)$$

Здесь $u = (\gamma, \xi)$ — вектор состояния системы, \hat{L} — оператор, соответствующий линеаризованной относительно отклонений от (γ_0, ξ_0) системе уравнений (9):

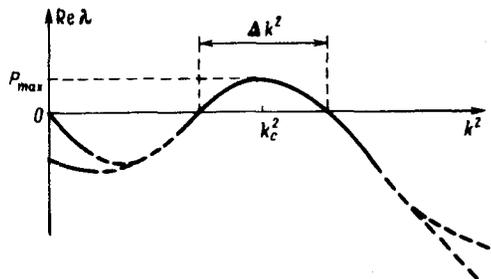
$$\hat{L}u = \begin{pmatrix} \gamma_t + (\gamma_0 mL\alpha - D)\gamma_{xx} + \gamma_0 mL\sigma \xi_{xxxx} \\ \xi_t - M\alpha\gamma + hL\alpha\gamma_{xx} - M\sigma\xi_{xx} + hL\sigma\xi_{xxxx} \end{pmatrix}, \quad (15)$$

\hat{N} — оператор, включающий в себя все нелинейные члены системы (9):

$$\hat{N}(u) = \begin{pmatrix} mL\alpha(\gamma_x^2 + \gamma\gamma_{xx}) + mL\sigma(\gamma_x\xi_{xxx} + \gamma\xi_{xxxx}) \\ 0 \end{pmatrix}. \quad (16)$$

Анализ уравнения (14) удается провести в квазигармоническом приближении для одномерной задачи. При этом решение разыскивается в

Рис. 65. Дисперсионная зависимость $\text{Re } \lambda(k^2)$ для нормальных мод линеаризованной системы (9), Δk — интервал волновых чисел неустойчивых мод



виде критической моды с медленной модуляцией амплитуды во времени и в пространстве:

$$|u| \sim \Gamma(\epsilon^2 x, \epsilon^2 t) \exp(i\omega_c t + ik_c x). \quad (17)$$

Такой вид решения обоснован в достаточно малой окрестности порога неустойчивости, когда справедливы неравенства $\Delta k^2/k_c^2 \ll 1$, $\Delta\omega/\omega_c \ll 1$. Именно отношения $\Delta k/k_c$ и $\Delta\omega/\omega_c$ определяют масштабный фактор ϵ^2 в (17). Соотнести порядок величин $\Delta k/k_c$, $\Delta\omega/\omega_c$ с исходными параметрами задачи позволяет дисперсионное уравнение (10). Оно дает

$$\frac{\Delta k}{k_c} \sim \frac{\Delta\omega}{\omega_c} \sim P_{\max} = \epsilon^2, \quad (18)$$

где P_{\max} — малая величина вблизи порога неустойчивости ($\epsilon^2 \ll 1$). Вблизи порога неустойчивости должна быть малой также сама амплитуда Γ . Самосогласованной процедурой нам удастся получить уравнение для нее в предположении $\Gamma \sim \epsilon$. Для вывода исходных уравнений относительно амплитуды можно использовать известный для задач с несколькими пространственными и временными масштабами прием [29]. Имея в виду два характерных масштаба по x и t , производные выразим в виде

$$\frac{\partial}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial t_0} + \epsilon^2 \frac{\partial}{\partial t_2}, \quad \frac{\partial}{\partial x} = \frac{\partial}{\partial x_0} + \epsilon^2 \frac{\partial}{\partial x_2}, \quad (19)$$

где $t_0 = t$, $t_2 = \epsilon^2 t$, $x_0 = x$, $x_2 = \epsilon^2 x$. Это дает разложение по параметру малости ϵ^2 линейного оператора \hat{L} :

$$\hat{L} = \hat{L}_0 + \epsilon^2 \hat{L}_2 + \dots \quad (20)$$

Решение уравнения (14) разыскивается в виде

$$u = \epsilon u_1 + \epsilon^2 u_2 + \dots \quad (21)$$

Первые члены разложения нелинейного оператора \hat{N} будут

$$\hat{N}(u) = \epsilon^2 \hat{N}_1(u_1 u_1) + \epsilon^2 \hat{N}_2(u_1 u_2) + \dots, \quad (22a)$$

$$\hat{N}_1(u_1 u_1) \equiv \left(m L \alpha \left[\left(\frac{\partial \gamma_1}{\partial x} \right)^2 + \gamma_1 \frac{\partial^2 \gamma_1}{\partial x^2} \right] + m L \sigma \left(\frac{\partial \gamma_1}{\partial x} \frac{\partial^3 \xi_1}{\partial x^3} + \gamma_1 \frac{\partial^4 \xi_1}{\partial x^4} \right) \right)_0, \quad (22b)$$

$$\hat{N}_2(u_1 u_2) \equiv \left(m L \alpha \frac{\partial^2}{\partial x^2} (\gamma_1 \gamma_2) + m L \sigma \frac{\partial}{\partial x} \left(\gamma_2 \frac{\partial^3 \xi_1}{\partial x^3} + \gamma_1 \frac{\partial^3 \xi_2}{\partial x^3} \right) \right)_0. \quad (22в)$$

Приведенные разложения подставляются в уравнение (14), что дает в первом порядке по ϵ

$$\hat{L}_0 u_1 = 0. \quad (23)$$

Общее решение этого уравнения имеет вид

$$u_1 = \Gamma_1(x_2, t_2) u_c^+ + \Psi_1(x_2, t_2) u_c^- + \text{к.с.}, \quad (24)$$

где u_c^\pm — собственные векторы оператора \hat{L}_0 с нулевыми собственными значениями; $|u_c^\pm| \sim \exp(i\omega_c t \pm ik_c x)$. Входящие в (24) функции Γ_1 , Ψ_1 пока не определены, но должны быть найдены из уравнений более высокого порядка по ϵ . Во втором порядке имеем

$$\hat{L}_0 u_2 = -\hat{N}_1(u_1 \cdot u_1). \quad (25)$$

Его общее решение, которое мы не выписываем ввиду его громоздкости, фигурирует в уравнении третьего порядка:

$$\hat{L}_0 u_3 = -\hat{L}_1 u_1 - \hat{N}_2(u_1 \cdot u_2). \quad (26)$$

Искомые уравнения для амплитуд Γ_1 , Ψ_1 получаются из условия разрешимости уравнения (26). Это условие состоит в ортогональности общего решения однородного уравнения (23) к правой части уравнения (26). Именно это условие дает уравнения для амплитуд Γ_1 , Ψ_1 :

$$\begin{aligned} \frac{\partial \Gamma_1}{\partial t_2} &= a\Gamma_1 + v \frac{\partial}{\partial x_2} \Gamma_1 - \mu \Gamma_1 |\Gamma_1|^2 - \eta \Gamma_1 |\Psi_1|^2, \\ \frac{\partial \Psi_1}{\partial t_2} &= a\Psi_1 - v \frac{\partial}{\partial x_2} \Psi_1 - \mu \Psi_1 |\Psi_1|^2 - \eta \Psi_1 |\Gamma_1|^2. \end{aligned} \quad (27)$$

Все входящие в правую часть системы (27) параметры выражаются через исходные параметры задачи. Конкретный вид этих выражений сейчас не существует. Вид системы уравнений для медленно меняющихся амплитуд в определенном смысле универсален. Он определяется лишь самим фактом близости к порогу волновой неустойчивости, т.е. к порогу мягкого возбуждения возмущений вида $\exp(i\omega_c t \pm ik_c x)$, и не зависит от конкретного вида исходной динамической системы, которая к этому порогу выведена. В частности, те же самые (с точностью до коэффициентов) уравнения (27) были получены при исследовании качественно иной модели — модели типа "реакция — диффузия" [30]. Проведенный в той же работе анализ уравнений (27) приводит к следующим выводам.

Критическим параметром, определяющим качественный характер устойчивых режимов, является отношение $\beta = \text{Re } \eta / \text{Re } \mu$. При $\beta < -1$ уравнения (27) не имеют устойчивых стационарных решений, что может означать жесткий характер возбуждения волн. (Напомним, что вывод уравнений был проведен в предположении мягкого возбуждения.) При $-1 < \beta < 1$ единственное устойчивое решение имеет вид $|\Gamma_1| = |\Psi_1|$. Это решение, как очевидно из (24), соответствует стоячей волне с частотой и волновым числом соответственно ω_c и k_c . При $\beta > 1$ стоячая волна оказывается неустойчивой. Ей на смену в качестве устойчивых режимов приходят бегущие гармонические волны, которые соответствуют решениям

$$\begin{aligned} |\Gamma_1| = A \neq 0, \quad \Psi_1 = 0; \\ \Gamma_1 = 0, \quad |\Psi_1| = A, \end{aligned} \quad (28)$$

где A — константа, которая определяется параметрами системы (27).

Помимо пары однородных решений (28), система (27) в той же области параметров допускает устойчивое неоднородное распределение амплитуд Ψ_1 , Γ_1 такое, что

$$\begin{aligned} |\Psi_1| \rightarrow A, \quad |\Psi_1| \rightarrow 0, \\ x \rightarrow -\infty, \quad x \rightarrow +\infty \\ |\Gamma_1| \rightarrow 0, \quad |\Gamma_1| \rightarrow A. \\ x \rightarrow -\infty, \quad x \rightarrow +\infty \end{aligned} \quad (29)$$

Этому решению соответствует пара бегущих гармонических волн, движущихся навстречу друг другу и гасящих друг друга в пределах области протяженностью в несколько длин волн (см. рис. 66). Этот режим существ-

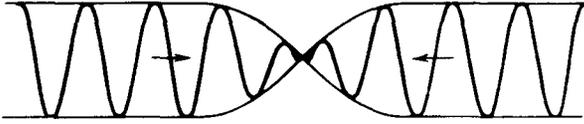


Рис. 66. Аннигиляция встречных гармонических автоволн



Рис. 67. Вид поверхности движущегося фибробласта с временным интервалом 1 мин. Длина отрезка 10 мкм [31]

вует при $(\partial\omega/\partial k)_{k_c} > 0$. При $(\partial\omega/\partial k)_{k_c} < 0$ реализуется симметричное решение, когда волны разбегаются из одного центра.

Отметим, что подобная аннигиляция является характерным свойством нелинейных волн в диссипативных системах — автоволн. Точно так же ведут себя "химические" волны в реакционной смеси Белоусова — Жаботинского или бегущие импульсы нервного возбуждения.

Очевидно, предсказываемые моделью волновые режимы, описанные выше, не могут имитировать те проявления поверхностной динамики, о которых говорилось вначале. Образование локализованных отростков и складок на клеточной поверхности должно описываться существенно ангармоническими режимами. Их интерпретацию мы надеемся представить в будущем.

Что касается квазигармонических режимов поверхностной динамики, они также обнаруживаются в экспериментах. На фото (из работы [31]) показана поверхность движущегося распластанного фибробласта, наблюдаемая методом отражательной интерференционной микроскопии (рис. 67). Периодический ряд полос соответствует волнообразному рельефу поверхности, движущемуся в направлении перемещения клетки. Длина этих волн около 3 мкм и движутся они в направлении перемещения клетки со скоростью около 2 мкм/мин. Таким образом, экспериментальное значение k_c по порядку величины совпадает со значением k_c , рассчитанным по формуле (12), а экспериментальное значение ω_c расходится с теоретическим (см. формулу (13)) на два порядка, что можно считать удовлетворительным ввиду грубости оценок и качественного характера модели.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильев Ю.М., Гельфанд И.М. Взаимодействие нормальных и неопластических клеток со средой. — М.: Наука, 1981. — 220 с.
2. Folkman J., Moscona A.A. // Nature. — 1978. — V. 273. — P. 345–349.
3. Payne M., Nusgens W.V., Lapiere C.M. // Eur. J. Cell. Biol. — 1987. — V. 45. — P. 44–50.
4. Ben-Zeev A. // Cell. — 1980. — V. 21. — P. 365–372.
5. Хьюз Р.М. Гликопротеины. — М.: Мир, 1985. — 140 с.
6. Edelman G.M. // Science. — 1976. — V. 192. — P. 450–457.
7. Frazier W.A., Glaser L., Gottlieb D.I. Cellular Recognition. — N.Y.: Allan R. Liss Inc., 1982.
8. Weigel P.H., Schnaar R.L., Kahlens Schmidt M.S. et al. // J. Biol. Chem. — 1979. — V. 254. — P. 10830–10838.
9. Oka J.A., Weigel P.H. // J. Cell. Biol. — 1986. — V. 103. — P. 1055–1060.
10. McCloskey M.A., Poo M.M. // J. Cell. Biol. — 1986. — V. 102. — P. 2185–2196.
11. Bershady A.D., Tint I.S., Neyfakh A.A., Vasilev J.M. // Exp. Cell. Res. — 1985. — V. 158. — P. 433–444.
12. Izzard C.A., Lochner L.R. // J. Cell. Sci. — 1980. — V. 42. — P. 81–88.
13. Wehland J., Osborn M., Weber K.L. // J. Cell. Sci. — 1979. — V. 37. — P. 257–263.
14. Bell G.I., Dembo M., Bongrand P. // Biophys. J. — 1984. — V. 45. — P. 1051–1064.
15. Моравец Г. Макромолекулы в растворе. — М.: Мир, 1967. — 398 с.
16. Napper D.H. // J. Colloid Interface Sci. — 1977. — V. 58. — P. 390–407.
17. Abney J.R., Braun J., Owicki J.C. // Biophys. J. — 1987. — V. 52. — P. 441–454.

18. *Dimsky C.H., Knudsen K.A., Bradley A., Horwitz A.F.* // *J. Cell Biol.* – 1985. – V. 100. – P. 1258–1539.
19. *Davtd-Pfeuty T.* // *Eur. J. Cell. Biol.* – 1985. – V. 36. – P. 195–200.
20. *Sugimoto Y.* // *Exp. Cell Res.* – 1981. – V. 135. – P. 39–45.
21. *Geiger B.* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1983. – V. 737. – P. 305–341.
22. *Kreis T.E., Geiger B., Schlessinger J.* // *Cell.* – 1982. – V. 29. – P. 835–845.
23. *Carboni J.M., Condeelis J.S.* // *J. Cell. Biol.* – 1985. – V. 100. – P. 1884–1893.
24. *Schwartz M.A., Luna E.J.* // *J. Cell. Biol.* – 1986. – V. 102. – P. 2067–2075.
25. *De Petris S.* // *Nature.* – 1978. – V. 272. – P. 66–68.
26. *Singer S.J., Nicolson G.L.* // *Science.* – 1972. – V. 175. – P. 720–728.
27. *Ханпель Дж., Бреннер Г.* *Гидродинамика при малых числах Рейнольдса.* – М.: Мир, 1976. – 630 с.
28. *Dembo M., Harlow F.* // *Biophys. J.* – 1986. – V. 50. – P. 109–121.
29. *Haken H.* // *Rev. Mod. Phys.* – 1983. – V. 47. – P. 67–121.
30. *Livshits M.A.* // *Z. Phys. Ser. B.* – 1983. – V. 53. – P. 83–88.
31. *Couchman J.R., Lenn M., Rees D.A.* // *Eur. J. Cell Biol.* – 1985. – V. 36. – P. 182–194.

О ПРИРОДЕ РОСТОВЫХ ПУЛЬСАЦИЙ В РАЗВИТИИ ГИДРОИДОВ *)

Опыты в эмбриологии показывают, что не только окончательный облик многоклеточного организма, но и весь формирующий его путь индивидуального развития генетически predeterminedены. Вместе с тем ясно, что даже если бы нам удалось полностью расшифровать генетический текст, мы не смогли бы понять, как, например, закладывается глаз в процессе эмбриогенеза. В основе формообразовательных процессов в клеточных массах, очевидно, лежат физические и физико-химические свойства отдельных клеток и их взаимодействие между собой и с окружением.

Сейчас пока мы не можем претендовать на выяснение всех звеньев цепи: активность генов — физические свойства клеток — наблюдаемые в ходе развития режимы коллективного поведения. Однако мы можем на основе физических измерений получать информацию об интересующих нас феноменологических параметрах и далее пытаться уже "выводить" наблюдаемые явления в клеточных коллективах. При этом теория должна указать, какие именно параметры необходимо исследовать.

Общей принципиальной основой для намеченного подхода может послужить уже сложившееся понимание того, как вообще могут зарождаться коллективные явления самоорганизации [1—3]. С другой стороны, в экспериментах уже накоплена значительная информация о физических свойствах клеток и о феноменологии процессов надклеточного уровня. Исходя из этой информации и избегая введения дополнительных постулатов, мы попытаемся дать физическую трактовку наблюдаемым режимам в развитии гидроидных полипов.

В первом разделе будут схематически представлены опытные данные по росту гидрантов (отдельных зооидов в колонии гидрополипа). Для физика этот процесс особенно интересен, поскольку носит отчетливо ритмический, автоколебательный характер. Затем в разделе 2 будут описаны некоторые свойства клеток, существенные для понимания происхождения и природы ростовых пульсаций (РП). Наконец, в разделе 3 будет показано, как на основе этих свойств могут зарождаться автоколебательные процессы в клеточных коллективах.

1. Феноменология ростовых пульсаций гидроидных полипов. Рис. 68 дает общее представление о внешнем строении

*) Статья написана совместно с Ю.А. Лабасом.

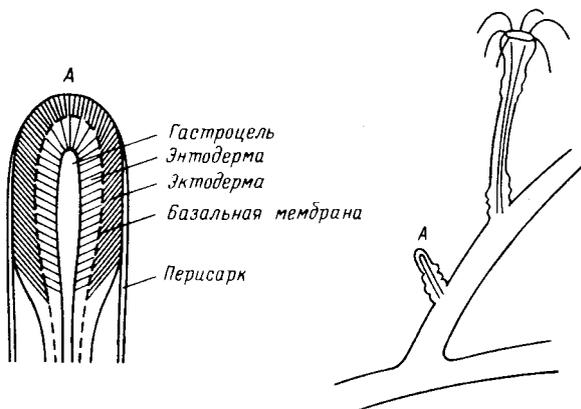


Рис. 68. Внешний вид гидранта и строение почки вида *Obelia*

объекта. Гидрант формируется из боковой почки ветвящегося ствола в результате ее роста. На завершающем этапе роста происходит закладка головного отдела, главными морфологическими элементами которого являются гипостом (рот) и щупальцы. На рис. 68 показана также схема строения отдельной растущей почки.

Фаза роста продолжается примерно 12–18 часов и сводится в основном к линейному удлинению в продольном направлении. Уже в ранних исследованиях было обнаружено, что рост почки гидранта протекает немонотонно во времени [4, 5]. Регистрация положения переднего конца растущей почки дала картину строго периодических пульсаций (рис. 69). На протяженных интервалах роста (порядка нескольких часов) период пульсаций остается неизменным. Для каждого вида гидроидов характерна и надежно воспроизводится как продолжительность одного цикла РП, так и общий рисунок пульсаций [6, 7]. Период T варьирует от 5 до 15 мин для разных видов.

При более основательном светооптическом и электронномикроскопическом исследовании обнаружилось, что РП сопровождаются согласованными перемещениями клеток внешнего эктодермального слоя, а также ритмическими изменениями их формы, ориентации и объема [8, 9] (рис. 70). В конце фазы попятного движения края почки эктодермальные клетки (ЭК) – длинные и тонкие – ориентированы под острым углом к продольной оси почки. На этой фазе цикла их объем минимален [8, 9]. При общем удлинении на следующей фазе ЭК согласованно укорачиваются, утолщаются, слегка поворачиваются и смещаются в дистальном направлении. По последним данным электронномикроскопического исследования на фазе подъема объем отдельных ЭК возрастает примерно на 20% [10]. Выяснилось также, что данное набухание вызывается вакуолизацией ЭК (увеличивается число и размеры вакуолей). Причиной является проникновение в ЭК заметных количеств воды.

Все стороны функциональной роли РП остаются пока невыясненными. Несомненно, что они играют решающую роль для питания почки. При рит-

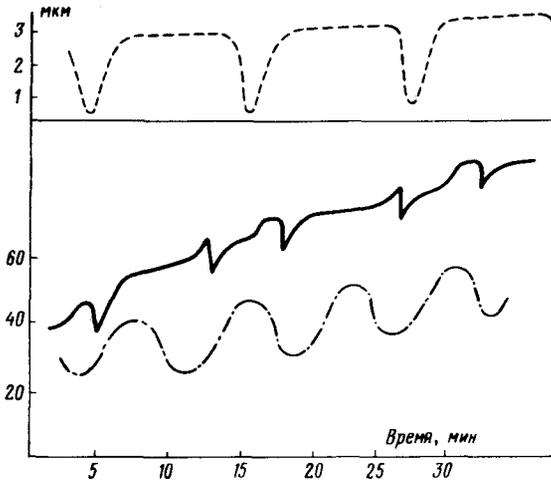


Рис. 69. Форма ростовых пульсаций для трех видов гидроридов: *Campanularia* (сплошная линия), *Dynamena* (штрихпунктирная линия), *Obelia* (штриховая линия)

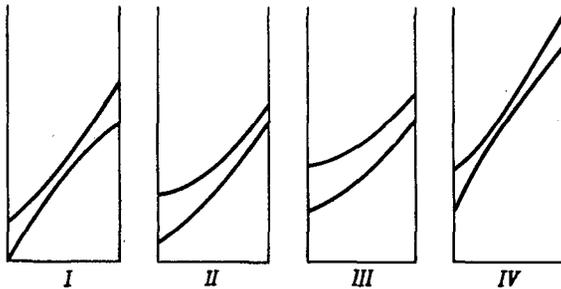


Рис. 70. Последовательные изменения формы, ориентация и местоположения клеток эктодермы в течение одного цикла ростовых пульсаций вида *Obelia* (по данным работы [8])

мических изменениях объема клеток, очевидно, происходит сжатие — растяжение всего эктодермального пласта. Соответственно ритмически изменяется объем и гидростатическое давление в гастральной полости. В результате работы этого естественного перистальтического насоса возникают возвратно-поступательные движения заполняющей полость жидкости — гидроплазмы. Почка, еще не имеющая собственного рта, может получить пищу из основного ствола и избавляться от продуктов ее переваривания только вместе с притоком и оттоком гидроплазмы [11].

Далее отмечалось, что пульсации обуславливают процесс линейного роста гидранта [8, 9].

Мы в данной работе ставим задачу выяснения физической природы ростовых пульсаций. Здесь целесообразно привести экспериментальные данные, содержащие указания на возможные механизмы.

Прежде всего, само возникновение пульсаций — эффект коллективный. Отдельные дисагрегированные клетки побега не испытывают пульсаций объема. Если же дать им возможность reagрегировать, то пульсации возникают после формирования сферического купола с полостью внутри и оболочкой, образованной слившимися клетками [12]. При этом наличие полости, по-видимому, самостоятельной роли не играет — капилляр, соединяющий полость гастрोцеля с окружающей средой, не вносит существенных изменений ни в характер пульсаций, ни в их период.

Определенная, хотя и неоднозначно трактуемая, информация содержится в данных по эффекту ряда агентов на РП [6]. Так, оуабайн (блокатор $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATФазы}$) приводит к подавлению роста и пульсаций. Известно, что при активном трансмембранном переносе Na^+ вместе с транспортом ионов осуществляется также перенос молекул воды через внешнюю мембрану клетки [13]. Блокирование Na -насоса оуабайном закрывает также данный канал водного транспорта. Отсюда, вероятно, и следует указанный эффект оуабайна. Сходный эффект и, возможно, той же природы дает 10^{-4} М-фуросемид, который блокирует Cl^- -каналы в клеточной мембране [13].

Наличие определенного потока воды через внешнюю клеточную мембрану и перисарк, не связанного с осмотическим или гидростатическим перепадами между цитоплазмой и внешней средой (а сопряженного с транспортом растворимых низкомолекулярных соединений), будет предполагаться и окажется существенным в предлагаемой трактовке природы ростовых пульсаций у гидродов.

2. Механические свойства клеточной мембраны. Решающим фактором в механизме пульсаций объема клеток, каким бы конкретно этот механизм ни оказался, являются механические свойства внешней клеточной мембраны. Сюда относится прежде всего ее модуль упругости. Непосредственное исследование упругих свойств внешней клеточной мембраны проводилось на клетках морских водорослей [14]. Большой объем делает их доступными для прямого введения внутрь клетки гидростатического зонда. Изменяя перепад осмотического давления между средой и внутренним объемом, в работах проводили параллельные измерения объема и тургорного давления. Модуль упругости ϵ , определяемый соотношением

$$\Delta p = \frac{\epsilon}{V} \Delta V, \quad (1)$$

находили двумя способами: 1) по наклону зависимости $p(V)$ в стационарных условиях эксперимента (ϵ_∞) и 2) по приросту Δp при малом изменении объема ΔV , не дожидаясь установления стационарного состояния (ϵ_0).

В двух указанных типах экспериментов получаются существенно разные результаты: значения ϵ_0 и ϵ_∞ , близкие при низких давлениях, становятся существенно разными с повышением тургорного давления. При этом "мгновенное" значение модуля упругости ϵ_0 может более чем на порядок превышать его стационарное значение ϵ_∞ . Указанная закономерность оказалась общей для многих исследованных видов водорослей [14, 17].

Мы не ставили перед собой цель дать последовательное объяснение факту существенного различия в значении модуля упругости клеточной

стенки при быстром и медленном проведении эксперимента. Для этого потребовалось бы более детальное представление о природе упругих напряжений в клеточной мембране, чем то, которое мы сегодня имеем. Однако это не мешает дать чисто феноменологическую трактовку приведенных данных.

При относительно быстром увеличении объема клетки ее внешняя мембрана оказывается в неравновесном растянутом состоянии. Это состояние, естественно, обладает избыточной по отношению к исходному недеформированному состоянию энергией. Ввиду наличия множества степеней свободы одна и та же степень растяжения мембраны может реализоваться во множестве микросостояний. Среди них есть и состояние частичного равновесия, т.е. такое, в котором энергия принимает условно минимальное значение при заданной степени растяжения. Энергия данного состояния выше, чем исходного недеформированного, однако ниже, чем в любом другом состоянии при данной степени деформации. При поддержании деформации система в конце концов окажется именно в этом состоянии частичного равновесия. Однако время релаксации к нему может оказаться существенным, поскольку релаксационный процесс включает в себя конформационные перестройки и перемещения макромолекулярных компонент мембраны. Если характерное время проведения эксперимента все же больше времени релаксации, то в данном эксперименте обнаружится значение модуля упругости, меньшее, чем при быстром изменении объема *).

Больше, чем сказано, не потребуется для того, чтобы дать чисто феноменологическое описание, трактующее приведенные выше опытные факты. При этом будем считать, что давление p зависит не только от объема клетки, но и от дополнительной степени свободы, которую будем описывать параметром q :

$$p = p(q, V). \quad (2)$$

Равновесное значение q само зависит от объема, $q_{\text{равн}} = \bar{q}(V)$. Релаксация q к \bar{q} описывается феноменологическим уравнением

$$dq/dt = -\kappa(q - \bar{q}(V)). \quad (3)$$

Параметр κ задает время релаксации $\tau = 1/\kappa$. Уравнение (3) соответствует наиболее простому, по сравнению с общей ситуацией, случаю — линейной релаксации единственной степени свободы. Но и в общем случае на асимптотической фазе релаксации это уравнение пригодно.

На основании экспериментальных данных для ϵ_0 и ϵ_∞ получаем количественную информацию о функции $p(q, V)$. Действительно, из (2), (3) имеем

$$\Delta p = p_q \Delta q + p_V \Delta V = [p_V + p_q \bar{q}_V (1 - e^{-\kappa t})] \Delta V = \frac{\epsilon}{V} \Delta V,$$

где $p_q = \partial p / \partial q$, $p_V = \partial p / \partial V$, $\bar{q}_V = d\bar{q} / dV$. Как видно, параметры функции

*) Заметим, что по существу близкая ситуация была рассмотрена в работе Мандельштама и Леонтовича [15], решавших задачу о распространении звука в среде с химическими реакциями. См. также работу [16].

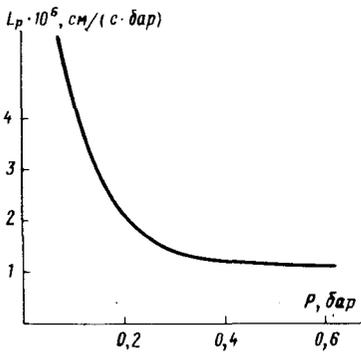


Рис. 71. Зависимость гидравлической проводимости внешней клеточной мембраны от тургорного давления (данные для клеток *Halicystis parvula* [14])

$p(q, V)$ выражаются следующим образом:

$$\epsilon_0/V = p_V, \quad \epsilon_\infty/V = p_V + p_q \bar{q}_V. \quad (4)$$

Помимо модуля упругости второй важной для нас и также доступной из эксперимента характеристикой является гидравлическая проницаемость мембраны L_p . В отсутствие проникающих через мембрану растворенных веществ объемный поток (с хорошей степенью точности равный потоку воды) определяется гидростатическим и осмотическим перепадами Δp и $\Delta \pi$ следующим образом:

$$J_V = L_p (\Delta p - \Delta \pi), \quad (5)$$

где J_V — поток воды из клетки, а $\Delta p = p_{\text{внут}} - p_{\text{внеш}}$, $\Delta \pi = \pi_{\text{внут}} - \pi_{\text{внеш}}$. Из работ [14, 17] известен характер зависимости параметра L_p от тургорного давления p . Он имеет вид, показанный на рис. 71. Столь же общим свойством, как и дисперсия модуля упругости, является существенный рост гидравлической проницаемости при приближении к точке плазмолиза. Мы ниже будем пользоваться данным характером зависимости $L_p(p)$, качественно аппроксимируя ее выражением

$$L_p(p) = \frac{\alpha}{(p - p_0)^n} + L_0. \quad (6)$$

Как уже отмечалось, осмотический и гидравлический потоки составляют лишь часть всего водного транспорта через мембрану. Необходимо учесть также транспорт воды, сопряженный с переносом проникающих растворенных веществ. Для неэлектролитов соответствующий дополнительный к (5) поток выражается в виде [18]

$$j = L_p D R T \Delta c; \quad \Delta c = c_{\text{внут}} - c_{\text{внеш}}.$$

Реально, по-видимому, наибольший вклад в сопряженный транспорт воды дают трансмембранные потоки Na^+ , Cl^- и K^+ *). Однако количественных данных, позволяющих строго учесть эти дополнительные потоки, нет. Поэтому мы примем предположение о постоянстве объемного потока, дополнительного к потоку, обусловленному осмотическим и гидростатическим перепадами между цитоплазмой и окружающей средой. Таким образом, полная величина J_V будет выражаться в виде

$$J_V = L_p (\Delta p - \Delta \pi) + j_0. \quad (7)$$

*) Na^+ входит в клетку, по-видимому, через апикальную мембрану по концентрационному градиенту; Cl^- котранспортируется по электрохимическому градиенту. Поддержание ионного баланса в клетке обеспечивается в результате выхода ионов через базолатеральную мембрану за счет активного транспорта [19].

Уже такого простейшего предположения окажется достаточно, чтобы могли возникнуть пульсации клеточного объема.

3. Формулировка и качественный анализ динамической модели Р.П. Выражение (7) определяет скорость изменения объема эктодермальных клеток:

$$dV/dt = -J_V.$$

Среди факторов, учтенных в (7), отсутствует один существенный, без которого, как мы знаем из опытов с дисагрегированными клетками гидранта, пульсаций объема не возникает. Мы имеем в виду то обстоятельство, что пульсируют лишь клетки, объединенные в эктодермальный пласт.

В нативной почке гидрополипа связующим элементом в пласте служит базальная мембрана. Естественно предположить, что при изменениях объема ЭК возникают упругие деформации и в базальной мембране. При этом со стороны деформированной базальной мембраны на клетки эктодермального пласта должна действовать обратная сила, которая, как и тургорное давление, противодействует изменению объема клеток, ее вызывающему. Если все присутствующие в (7) факторы: осмотический и гидростатический перепады и поток j_0 , отсутствуют, но базальная мембрана упруго деформирована, то, стремясь вернуться в равновесное состояние, она оказывает внешнее давление на клетки. Приблизительно это давление можно считать пропорциональным отклонению клеточного объема от исходного равновесного значения $p = Kv$, где $v = V - V_{\text{равн}}$, а K — феноменологический коэффициент упругости. При этом релаксация объема ЭК за счет гидравлической проводимости клеточной стенки идет со скоростью $dv/dt = -L_p Kv$. Данный фактор внешней упругости действует наряду с прочими, ранее обсуждавшимися. Таким образом, имеем уравнение для скорости изменения объема ЭК:

$$dv/dt = L_p (\Delta\pi - \Delta p - Kv) + j_0. \quad (8)$$

Вместе с информацией о характере зависимости $L_p(p)$ (см. (6)), о параметрах функции $p(q, V)$ (см. (4)) и уравнением релаксации q (3) мы можем на основании (8) проследить за эволюцией клеточного объема.

Приведем полную кинетическую систему для динамических параметров v и q :

$$\begin{cases} dv/dt = L_p(p) (\pi - p(q, v) - Kv) + j_0 = \mathcal{L}(q, v), \\ dq/dt = -\kappa [q - \bar{q}(v)] = Q(q, v). \end{cases} \quad (9)$$

Характер поведения системы (9) определяется видом нуль-изоклин

$$\mathcal{L}(q, v) = 0, \quad Q(q, v) = 0. \quad (10)$$

При монотонном ходе зависимости $\bar{q}(v)$ возникновения устойчивых колебаний параметров q и v с конечной амплитудой можно ожидать при характерном N-образном виде \mathcal{L} -изоклины. Выясним, когда это имеет место.

Очевидно, необходимо, чтобы зависимость $q(v)$, определяемая равенством $\mathcal{L} = 0$, имела два экстремума:

$$\left. \frac{dq}{dv} \right|_{v_1, v_2} = 0. \quad (11)$$

Непосредственным дифференцированием $\mathcal{L}(q, v)$ можно убедиться, что условие (11) тождественно следующему:

$$L_p^2(p) (p_V + K) + \frac{dL_p}{dp} j_0 p_V = 0. \quad (12)$$

Зависимость $p(v)$ не имеет особенностей. В относительно узком интервале изменения объема (напомним, что амплитуда отклонений v при ростовых пульсациях составляет не более 20%) будем считать величину p_V постоянным параметром: $p_V \equiv s$. В том же интервале пренебрегать зависимостью L_p от давления p нельзя, так как он предположительно близок к точке плазмолиза.

Используя для $L_p(p)$ аппроксимацию (6), приходим к следующему условию существования двух экстремумов на \mathcal{L} -изоклине: уравнение

$$n \alpha j_0 \frac{s}{s+K} x^{n-1} = (\alpha + L_0 x^n)^2 \quad (13)$$

должно иметь два корня. В (13) введено обозначение $x = p - p_0$. Если дополнительно ограничиться поиском условия возникновения колебаний в интервале давлений, не включающем точку плазмолиза, $p > p_0$, то придем к выводу, что при $n = 1$ условие (13) не выполняется ни при каких значениях параметров. Но уже при $n = 2$ соответствующую область параметров указать можно. А именно при

$$j_0 > j_0^{\text{кп}} = 4/3 (s+K) \sqrt{L_0 \alpha} \quad (14)$$

(13) удовлетворяется. При этом \mathcal{L} -изоклина имеет две падающие ветви, разделенные растущим участком (рис. 72).

Нетрудно убедиться, что условие возникновения немонотонности \mathcal{L} -изоклины, аналогичное (14), может быть удовлетворено при любом $n > 1$. Таким образом, общим требованием является достаточно быстрое убывание гидравлической проводимости с ростом тургорного давления.

На рис. 72 показан примерный ход нуль-изоклин системы (9). При вариации параметров j_0, s, K, α и т.д. изменяется относительное расположение изоклин, в том числе и местоположение точки их пересечения — стационарного состояния системы. При этом при выделенных значениях параметров — в точках бифуркации — качественно изменяется динамический режим.

Убедимся, что пока стационарное состояние приходится на падающие участки N-образной изоклины, оно асимптотически устойчиво. Тем самым в соответствующей области параметров исключено возникновение автономных ритмических пульсаций. Для этого достаточно исследовать динамику малых отклонений от стационарной точки:

$$\delta v = v(t) - v_{\text{ст}}, \quad \delta q = q(t) - q_{\text{ст}} = q(t) - \bar{q}(v_{\text{ст}}).$$

Линеаризуя по ним кинетические уравнения (9), приходим к уравнениям движения вблизи $v_{\text{ст}}, q_{\text{ст}}$

$$\begin{aligned} (\delta v)_t &= \theta \delta v + \varphi p_q \delta q, \\ (\delta q)_t &= -\kappa \delta q + \kappa \bar{q}_V \delta v. \end{aligned} \quad (15)$$

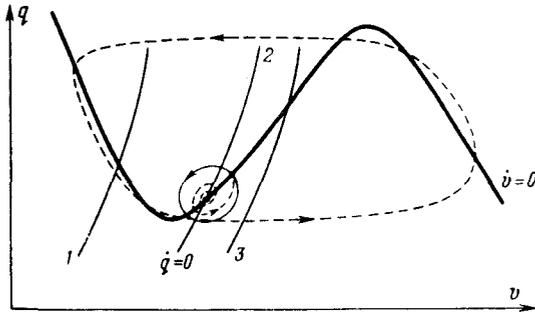


Рис. 72. Вид нуль-изоклин системы (9) на фазовой плоскости (v, q) . Показаны три характерных расположения изоклины $Q = 0$, соответствующие: 1 – устойчивой особой точке, 2 – предельному циклу малой амплитуды (квазигармонические колебания) и 3 – предельному циклу большой амплитуды, обозначенному штриховой линией (релаксационные колебания)

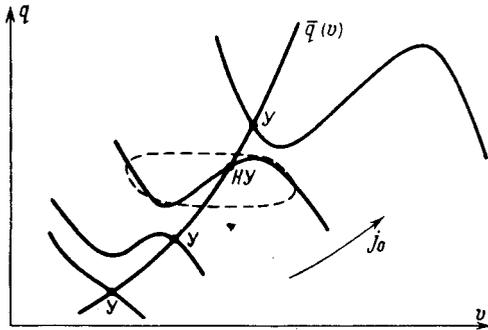


Рис. 73. Характер изменения относительно расположения нуль-изоклин системы (9) по мере роста величины потока j_0 ; У – устойчивое стационарное состояние, НУ – неустойчивое

Здесь введены обозначения

$$\varphi = \left[\frac{j_0}{L_p} \left| \frac{dL_p}{dp} \right| - L_p \right]_{v_{ст}}, \quad \theta = \varphi s - L_p K = \varphi \frac{\epsilon_0}{v_{ст}} - L_p K.$$

Показатель времени λ экспоненциальной эволюции δv и δq ($\delta v, q \sim e^{\lambda t}$) легко находится из (15):

$$\lambda_{1,2} = (\theta - \kappa)/2 \pm \sqrt{(\theta - \kappa)^2/4 + \kappa\eta};$$

$$\eta = \varphi(s + p_q \bar{q}_V) - L_p K = \varphi \epsilon_\infty / v_{ст} - L_p K. \quad (16)$$

Напомним, что $\epsilon_\infty < \epsilon_0$, а поэтому $\eta < \theta$. Знак параметра θ в данной точке на \mathcal{L} -изоклине указывает, лежит ли эта точка на падающей ветви ($\theta < 0$) или на растущем участке ($\theta > 0$). Параметр же η можно для определенности считать везде отрицательным. Тогда, как следует из (16), при $\theta < \kappa$ действительная часть показателя λ отрицательна. Это и означает устойчивость стационарных состояний на падающих ветвях \mathcal{L} -изоклины.

Порог неустойчивости ($\text{Re } \lambda = 0$) достигается на растущем участке в точке $\theta = \kappa$. Как видно из (16), в этой точке мнимая часть показателя λ отлична от нуля ($\text{Im } \lambda)^2 = \kappa | \eta |$. Следовательно, при выходе в закритическую область $\theta > \kappa$ система начинает осциллировать. Зарождающийся автоколебательный режим соответствует предельному циклу на фазовой плоскости.

Здесь возможны две ситуации: первая – при прохождении порога неустойчивости от стационарного состояния непрерывным образом (“мягко”) ответвляется устойчивый предельный цикл. В этом случае вблизи критической точки амплитуда колебаний мала, а сами колебания имеют квазигармонический характер. Вторая ситуация – ответвляющийся при $\theta = \kappa$ предельный цикл асимптотически неустойчив. Оказавшись за порогом устойчивости стационарного состояния, система сразу переходит в режим релаксационных колебаний с конечной амплитудой (“жесткое” возбуждение). При этом в стационарном автоколебательном режиме она проходит по замкнутой фазовой траектории, показанной штриховой линией на рис. 72.

Для того чтобы более определенно указать границы областей параметров, в которых реализуется каждый из представленных автоколебательных режимов, требуется более основательное исследование нелинейной нестационарной задачи (9).

4. О б с у ж д е н и е. Имея в виду возможное сопоставление с экспериментом, следует выяснить, какие из экспериментально контролируемых параметров и каким образом влияют на характеристики объемных пульсаций. Очевидно, наиболее эффективны те из них, при вариации которых изменяется относительное расположение изоклин. Таковым является величина потока j_0 . В эксперименте ее можно варьировать, изменяя в окружающей среде концентрацию растворенных веществ, проникающих через мембрану (таких, как ионы Na^+ , Cl^- и др.), меняя температуру среды ($j_0 \sim T$), включая внешнее трансэпителиальное электрическое поле.

Какие последствия изменения потока j_0 предсказывает рассмотренная выше теоретическая модель?

Мы уже видели (см. (14)), что при понижении величины j_0 ниже определенного критического уровня \mathcal{L} -изоклина становится монотонной (убывающей). При этом стационарное состояние системы становится устойчивым, и пульсации, естественно, должны исчезнуть. Но и при больших значениях j_0 , когда условие (14) выполнено, система также может переходить в стабильное состояние покоя. Это происходит из-за того, что хотя \mathcal{L} -изоклина и немонотонна, особая точка оказывается на ее падающем участке. Характер изменений, происходящих на фазовой плоскости по мере роста величины потока j_0 , показан на рис. 73. Как видно, точка пересечения нуль-изоклин приходится на растущий участок изоклины $\dot{v} = 0$ только в определенном, возможно, узком, интервале значений параметра j_0 . Отсюда можно заключить, что режим ритмических пульсаций объема ЭК является принадлежностью лишь некоторого интервала значений физических параметров (в принципе определяемого из теоретической модели). Нарушить этот режим, т.е. подавить пульсации, можно при отклонении параметров от их нормальных значений в обе стороны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Николис Г., Пригожин И.* Самоорганизация в неравновесных системах. — М.: Мир, 1979.
2. *Хакен Г.* Синергетика. — М.: Мир, 1980.
3. *Белинцев Б.Н.* // Успехи физ. наук. — 1983. — Т. 141. — С. 55–101.
4. *Saint-Hilaire K.* // Zool. Jahrb. Abt. Allg. Zool. Physiol. — 1930. — Bd 47. — S. 512–622.
5. *Белоусов Л.В.* // Докл. АН СССР. — 1961. — Т. 136. — С. 1490.
6. *Belousov L.V., Badenko L.A., Labas Ju.A.* Developmental and Cellular Biology of Coelenterates / Eds. P. Tardent and R. Tardent. — Elsevier / North-Holland Biomedical Press, 1980. — P. 175–178.
7. *Лабас Ю.А., Белоусов Л.В., Баденко Л.А., Летунов В.Н.* // Докл. АН СССР. — 1981. — Т. 257. — С. 1247–1250.
8. *Wytttenbach Ch.R.* // Am. Zool. — 1974. — V. 14. — P. 699–713.
9. *Belousov L.V.* // Publ. Seto Marine Biol. Laborat. — 1973. — V. 20. — P. 135–336.
10. *Зарайский А.С., Белоусов Л.В., Баденко Л.А., Лабас Ю.А.* // Онтогенез. — 1984. — Т. 15, № 2. — С. 163–170.
11. *Карлсен А.Г.* Теоретическое и практическое значение кишечнополостных. — Л.: Изд-во ЗИН АН СССР, 1980. — С. 34–40.
12. *Лабас Ю.А., Баденко Л.А., Белоусов Л.В., Летунов В.Н.* Механизмы временной организации клетки и их регуляции на различных уровнях. — Пушкино, 1983. — С. 10–14.
13. *Jaffe L.* // Phil. Trans. Roy. Soc. London B. — 1981. — V. 295. — P. 553–566.
14. *Zimmermann U., Hüsklen D.* // J. Membr. Biol. — 1980. — V. 56. — P. 55–64.
15. *Леонтович М.А., Мандельштам Л.И.* // ЖЭТФ. — 1937. — Т. 7. — С. 438.
16. *Белинцев Б.Н., Лившиц М.А., Волькенштейн М.В.* // Биофизика. — 1982. — Т. 27. — С. 293–296.
17. *Zimmermann U., Steudle E.* // J. Membr. Biol. — 1974. — V. 16. — P. 331–352.
18. *Kedem O., Katchalsky A.* // Biochim. Biophys. Acta. — 1958. — V. 27. — P. 229–246.
19. *Spring K.R., Ericson A.C.* // J. Membr. Biol. — 1982. — V. 69. — P. 167.

ПРИЛОЖЕНИЕ

1. ВЛИЯНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ОСНОВАНИЙ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК *)

Известно, что стабильность двойной спирали ДНК сильно зависит в широкой области изменения параметров среды от относительного содержания GC-пар. Большое различие в энергии связи AT- и GC-пар определяет разницу как в температурах, так и в ширинах интервала плавления реальных ДНК (см., например, [1]). В то же время содержание GC-пар не является единственным фактором, определяющим стабильность двойной спирали. Как показывают многочисленные экспериментальные данные, температура плавления высокомолекулярных синтетических аналогов ДНК зависит и от конкретной последовательности оснований в двойной спирали

*) Статья написана совместно с А.В. Вологодским и М.Д. Франк-Каменецким. См. Молекулярная биология. — 1976. — Т. 10. — С. 764–769.

[2–4]. Эти данные указывают на зависимость энергии межповерхностных взаимодействий от последовательности оснований (эффект гетерогенности стэкинг-взаимодействий). Возникает вопрос: в какой степени этот эффект сказывается на термодинамических характеристиках реальных ДНК? Этот вопрос особенно актуален, так как показано, что в концентрированных растворах тетраметил- и тетраэтиламмониевых солей различие в стабильности АТ- и GC-пар может быть сведено к нулю [5, 6]. В этих условиях эффект гетерогенности стэкинг-взаимодействий должен играть доминирующую роль [6].

Цель настоящей работы – получение количественных характеристик гетерогенности стэкинг-взаимодействий из данных по температурам плавления синтетических аналогов ДНК с известными последовательностями и выяснение влияния этого эффекта на термодинамические характеристики ДНК со случайной последовательностью оснований при различных условиях.

а) Нахождение матрицы стэкинг-взаимодействий. Рассмотрим условия плавления длинного ($N \rightarrow \infty$) двунитчатого полинуклеотида с некоторой фиксированной последовательностью оснований. Это условие, получающееся путем приравнивания свободных энергий спирального и клубкообразного состояний полимеров, запишем в виде

$$\Delta F_{AT}(1-x) + \Delta F_{GC}x + \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N-1} \delta F_s^{i,i+1} = 0, \quad (1)$$

где ΔF_{AT} и ΔF_{GC} – разности свободных энергий (в расчете на одну пару оснований) спирального и клубкообразного состояний для полинуклеотидов со случайной последовательностью АТ- и GC-пар соответственно. Величины ΔF_{AT} и ΔF_{GC} выделены отдельно потому, что они могут быть найдены путем экстраполяции экспериментальных термодинамических характеристик ДНК с различным GC-содержанием x к значениям $x = 0$ и $x = 1$ соответственно.

Представим их в виде

$$\Delta F_{AT} = \frac{U_{AT}}{T_{AT}} (T - T_{AT}) \quad (2)$$

и

$$\Delta F_{GC} = \frac{U_{AT}}{T_{AT}} (T - T_{GC}), \quad (3)$$

где U_{AT} – теплота плавления в расчете на одну пару полимера, состоящего из случайной последовательности АТ-пар; T_{AT} и T_{GC} – температуры плавления случайных АТ- и GC-полимеров. Формулы (2) и (3) написаны в предположении, что энтропии плавления АТ- и GC-пар одинаковы.

Теплота плавления АТ-пар U_{AT} принимается равной 8 ккал/моль (см. [7]). Величины T_{AT} и T_{GC} зависят от ионных условий и для растворов с различным содержанием ионов Na могут быть найдены из эмпирических формул [8]

$$T_{AT} = 82,4 + 18,30 \lg [\text{Na}^+], \quad (4)$$

$$T_{GC} = 118,4 + 11,26 \lg [\text{Na}^+]. \quad (5)$$

Величины $\delta F_s^{i,i+1}$, определяющие гетерогенность стэкинг-взаимодействия, представляют собой энергию стэкинг-взаимодействия i -й и $(i + 1)$ -й пар оснований, из которой вычтено некоторое стандартное значение F_s , т.е. $\delta F_s^{i,i+1}$ характеризуют отклонения энергии стэкинг-взаимодействия от выбранного стандартного значения.

Вообще говоря, имеется 16 значений $\delta F_s^{i,i+1}$, из которых различны только 10. Вследствие правила комплементарности достаточно указать последовательность оснований лишь в одной из комплементарных цепей. Поэтому величины $\delta F_s^{i,i+1}$ мы будем обозначать следующим образом: δF_s^{AA} , δF_s^{AT} , δF_s^{AC} , δF_s^{AG} и т.д. Совокупность этих величин удобно представить в виде квадратной матрицы 4-го порядка, которую и будем называть матрицей стэкинг-взаимодействий.

Для нахождения матрицы стэкинг-взаимодействий необходимо получить уравнения, связывающие элементы этой матрицы с какими-либо наблюдаемыми в опыте термодинамическими характеристиками. Доступными в настоящее время характеристиками такого рода являются температуры плавления полинуклеотидов с известными последовательностями оснований. Поскольку различные полинуклеотиды плавятся при разных температурах, то для нахождения величин $\delta F_s^{i,i+1}$ из этих данных необходимо сделать конкретное предположение о характере температурной зависимости этих величин.

Мы в данной работе произвольно остановились на простейшем предположении, что все величины $\delta F_s^{i,i+1}$ не зависят от температуры. Основываясь на этом предположении, легко получить с помощью формул (1)–(3) уравнения для определения элементов матрицы стэкинг-взаимодействия по температурам плавления полинуклеотидов. Два уравнения такого типа следуют сразу из определения введенных выше параметров T_{AT} , T_{GC} и U_{AT} .

В самом деле, для случайного полимера, состоящего только из АТ-пар, уравнения (1) и (2) приводят к равенству (при условии, что $\Delta F_{AT} = 0$ при $T = T_{AT}$)

$$\delta F_s^{AA} + \delta F_s^{AT} + \delta F_s^{TA} + \delta F_s^{TT} = 0. \quad (6)$$

Аналогичное уравнение получаем из условия плавления GC-полимера со случайной последовательностью:

$$\delta F_s^{CC} + \delta F_s^{CG} + \delta F_s^{GC} + \delta F_s^{GG} = 0. \quad (7)$$

Другие уравнения могут быть получены из данных по плавлению синтетических полинуклеотидов с известной последовательностью. Известные в настоящее время температуры плавления синтетических полидезоксирибонуклеотидов приведены в табл. 1 (для двух значений ионных сил). Из этих данных легко получить условие плавления для любого полинуклеотида. В качестве примера запишем условие плавления полинуклеотида поли[d(TAC)] · поли[d(GTA)]:

$$\frac{U_{AT}}{T_{AT}} \left(T_{пл} - \frac{1}{3} T_{GC} - \frac{2}{3} T_{AT} \right) + \frac{1}{3} (\delta F_s^{TA} + \delta F_s^{AC} + \delta F_s^{CT}) = 0.$$

Температуры плавления синтетических полидезоксирибонуклеотидов

Полинуклеотид	$T_{пл}, ^\circ\text{C}$		Литература
	NaCl		
	0,01 M	0,1 M	
Поли[d(TTC)] · поли[d(GAA)]	60	74	[2]
Поли[d(TTG)] · поли[d(CAA)]	67	79	[2]
Поли[d(TAC)] · поли[d(GTA)]	63	74,9	[2]
Поли[d(ATC)] · поли[d(GAT)]	68	80	[2]
Поли[d(TCC)] · поли[d(GGA)]	71	89,5	[4]
Поли[d(AAT)] · поли[d(ATT)]	43,8	62,2	[3]
Поли[d(TG)] · поли[d(CA)]	73	87,1	[2]
Поли[d(TC)] · поли[d(CG)]	66,9	81	[2]
Поли[d(GC)] · поли[d(CG)]	96,4	110,75	[2]
Поли[d(G)] · поли[d(C)]	82,7	101,4	[2]
Поли[d(A)] · поли[d(T)]	47,6	67,1	[2]
Поли[d(AT)] · поли[d(TA)]	39	60	[2]

Таким образом, мы получим 12 уравнений для определения величин $\delta F_s^{i,i+1}$, отвечающих исследованным к настоящему времени синтетическим полинуклеотидам. Добавив к ним условия (6) и (7), получаем систему из 14 уравнений с 10 неизвестными. Однако только 7 из этих уравнений линейно независимы. Для получения замкнутой системы мы добавили к ней еще три произвольных условия симметрии:

$$\delta F_s^{AT} - \delta F_s^{TA} = \delta F_s^{GA} - \delta F_s^{AG}, \quad (8)$$

$$\delta F_s^{AT} - \delta F_s^{TA} = \delta F_s^{CA} - \delta F_s^{AC}, \quad (9)$$

$$\delta F_s^{GC} = \delta F_s^{CG}. \quad (10)$$

Следует отметить, что уравнения, полученные на основании данных табл. 1, являются внутренне противоречивыми. Причина этого не только в погрешностях при определении температур плавления синтетических полинуклеотидов. Более существенным является то обстоятельство, что синтетические полинуклеотиды имеют несколько различную структуру двойной спирали [9], так что энергия взаимодействия одной и той же пары звеньев может быть, вообще говоря, различной для разных полинуклеотидов.

Вследствие указанной противоречивости системы уравнений, мы решили ее методом наименьших квадратов. Полученные матрицы величины $\delta F_s^{i,i+1}$ для двух значений ионной силы раствора приведены в табл. 2. При этом существенно выяснить, насколько полученные матрицы чувствительны к произвольным симметризирующим условиям (8)–(10). Кроме того, на основании ряда соображений можно отдать предпочтение некоторым из синтетических аналогов ДНК, приведенных в табл. 1.

Предпочтение мы отдавали тем полинуклеотидам, для которых: 1) зависимость $T_{пл}$ от ионной силы близка к соответствующей зависимости

Матрицы гетерогенности стэкинг-взаимодействия пар оснований ДНК

Осно- вание	0,01 М NaCl				0,1 М NaCl			
	А	Т	С	Г	А	Т	С	Г
А	-53	-7	-89	167	-44	-16	27	169
Т	113	-53	47	-209	104	-44	49	-92
С	-209	167	119	-119	-92	169	81	-81
Г	47	-89	-119	119	49	27	-81	81

Примечание. Элемент на пересечении i -й строки и j -го столбца представляет собой $\delta F_s^{i,j}$ в кал/моль.

для ДНК, 2) пуриновые и пиримидиновые основания содержатся в обеих нитях полинуклеотида. Была проведена серия расчетов методом наименьших квадратов, в которых различным группам уравнений приписывались различные веса. При этом наименьшие веса имели уравнения (8)–(10), а наибольшие – уравнения, получающиеся из условия плавления полинуклеотидов, удовлетворяющие требованиям 1) и 2). Получающиеся при этом матрицы не отличались радикальным образом от матриц, приведенных в табл. 2. Именно, знаки всех элементов сохранились. Значения большинства элементов матрицы мало отличались по абсолютной величине.

Лишь для некоторых элементов наблюдались существенные вариации их абсолютных значений, но никакие элементы не меняли своих значений более чем в два раза. Таким образом, несмотря на малость абсолютных значений элементов матрицы, характеризующих гетерогенность стэкинг-взаимодействий, приведенных в табл. 2, эти значения, по-видимому, близки к действительным.

б) Влияние гетерогенности стэкинг-взаимодействия на характеристики кривых плавления ДНК. Зная матрицу величин $\delta F_s^{i,i+1}$, можно вычислить влияние гетерогенности стэкинг-взаимодействия как на температуру, так и на ширину интервала плавления гетерополинуклеотида со случайной последовательностью.

Для температуры плавления $T_{пл}$ можно получить следующую формулу (с учетом условий (1)–(3)):

$$T_{пл} = T_{AT} + (T_{GC} - T_{AT})x + Dx(1-x), \quad (11)$$

где

$$D = -\frac{1}{4} (\delta F_s^{AC} + \delta F_s^{TC} + \delta F_s^{AG} + \delta F_s^{TG} + \delta F_s^{CA} + \delta F_s^{GA} + \delta F_s^{CT} + \delta F_s^{GT}) \frac{T_{AT}}{U_{AT}}.$$

Поскольку эффект гетерогенности стэкинг-взаимодействий мал, то откло-

нение от используемой обычно формулы

$$T_{\text{пл}} = T_{\text{АТ}} + (T_{\text{ГС}} - T_{\text{АТ}}) x \quad (12)$$

весьма мало. Так, для двух матриц, приведенных в табл. 2, величина D оказывается равной соответственно 1,8 и $-3,3$ °С. Следовательно, максимальное отклонение $T_{\text{пл}}$ от формулы (12) составляет 0,5 и $-0,8$ °С соответственно. Это отклонение укладывается в экспериментальную погрешность определения $T_{\text{пл}}$ и поэтому неудивительно, что отклонения от линейной зависимости $T_{\text{пл}}(x)$ в опыте не наблюдали.

Перейдем теперь к вопросу о влиянии гетерогенности стэкинг-взаимодействий на ширину интервала плавления ДНК. Для вычисления этой характеристики кривой плавления мы использовали результаты работы Веденова и соавторов [10]. Учет образования петель при плавлении линейного гетерополинуклеотида проводили методом последовательных приближений, предложенным ранее [11].

Как и следовало ожидать, при обычных условиях ширина интервала плавления определяется большой разницей в стабильности АТ- и ГС-пар (эта величина составляет ≈ 1 ккал/моль) и гетерогенность стэкинг-взаимодействий практически не влияет на ширину интервала плавления. Однако эффект гетерогенности стэкинг-взаимодействий становится определяющим в условиях, когда средняя стабильность АТ- и ГС-пар выравнивается. Если бы он отсутствовал, то в этом случае ширина интервала плавления ΔT гетерополинуклеотида должна была бы быть практически равной нулю, как следует из теории (см. [1] и [6]). Однако наличие этого эффекта приводит к появлению ненулевого значения ΔT , равного (при использовании матриц табл. 2) 0,2 и 0,1 °С соответственно.

Этот результат подтверждает выдвинутую Воскобойник и соавторами [6] гипотезу о том, что гетерогенность стэкинг-взаимодействий определяет ширину интервала плавления ДНК в том случае, когда относительная стабильность АТ- и ГС-пар в среднем выравнивается при добавлении в среду ионов тетраэтиламмония в большой концентрации. В этих условиях было получено значение $\Delta T \approx 0,5$ °С [6]. Наши оценки дают несколько меньшие значения. Однако количественного согласия теории с опытом трудно ожидать, так как сильное изменение состава растворителя вследствие добавления соли может изменить конкретный вид матрицы гетерогенности стэкинг-взаимодействий.

В) О б с у ж д е н и е р е з у л ь т а т о в. Основываясь на данных по плавлению синтетических аналогов ДНК, нами впервые сделана попытка найти матрицу гетерогенности стэкинг-взаимодействий. Основным результатом — удивительная малость эффекта. В то время как средняя энергия стэкинг-взаимодействия составляет 7–8 ккал/моль [1], отклонение от этого значения не превышает 0,2 ккал/моль в исследованной области ионных условий (0,001 – 0,01 М Na^+). Таким образом, относительный эффект гетерогенности стэкинг-взаимодействий в ДНК составляет 2–3 %, что не влияет в заметной степени на термодинамические характеристики ДНК при обычных условиях. Он, однако, становится существенным в некоторых специальных случаях. В частности, именно эффект гетерогенности стэкинг-взаимодействий определяет ширину интервала плавления ДНК в области инверсии относительной стабильности АТ- и ГС-пар.

Полученные нами результаты для ДНК резко отличаются от данных об очень большом эффекте гетерогенности стэкинг-взаимодействий в случае РНК [12]. Причины столь различного поведения близких по химическому строению полинуклеотидов совершенно не ясны. Возможно, что это связано с различием в пространственной структуре (ДНК находится в В-форме, а РНК — в А-форме).

Следует, однако, отметить, что данные для ДНК получены нами на основе анализа температур плавления высокополимерных полинуклеотидов. Эти данные согласуются, как мы видим, с различными характеристиками реальных ДНК (существенное увеличение эффекта гетерогенности стэкинг-взаимодействия неизбежно привело бы к заметному искривлению зависимости $T_{пл}$ от x (см. формулу (11)). Кроме того, о малости эффекта свидетельствует малое значение ΔT в области инверсии относительной стабильности АТ- и GC-пар. Иная ситуация имеет место в случае РНК. Полученные ранее результаты основаны на анализе очень коротких олигонуклеотидов [12] и не увязаны до сих пор с поведением высокополимерных РНК. Вместе с тем имеются данные, свидетельствующие об аномальных термодинамических свойствах коротких олигонуклеотидов [13].

2. ПОЧЕМУ ПРОЦЕСС ПЛАВЛЕНИЯ СВЕРХСПИРАЛЬНЫХ ДНК СТОЛЬ НЕКООПЕРАТИВЕН? *)

Первые эксперименты по плавлению кольцевых замкнутых молекул ДНК (ДНК I) были проведены вскоре после обнаружения этого весьма распространенного в природе состояния ДНК [14]. Они выявили ряд существенных отличий в характере процесса денатурации ДНК I и ДНК II (открытая форма). Прежде всего обращает на себя внимание значительное (более чем в два раза) уширение температурного интервала перехода. Кроме того, точка полуперехода $T_{\theta} = 1/2$ (температура, при которой половина пар оснований находится в денатурированном состоянии) для ДНК I превышает таковую для ДНК II примерно на 30 °С [14]. Позднее [15] обратили внимание еще на одну особенность: кривые плавления кольцевых замкнутых ДНК не обладают тонкой структурой, которая явно обнаруживается на кривых плавления соответствующих открытых или линейных ДНК. Перечисленные довольно яркие эффекты, единственной причиной которых может быть возникновение топологических ограничений при замыкании ДНК в кольцо, нуждаются в теоретическом обосновании.

М.Д. Франк-Каменецкий и А.Д. Франк-Каменецкий первыми предприняли попытку теоретического объяснения особенностей плавления кольцевых ДНК [11]. Они предположили, что избыточное число зацеплений в ДНК I по сравнению с ДНК II при той же степени денатурации сосредоточено целиком в денатурированных участках. Иными словами, при разрушении водородных связей и стэкинг-взаимодействий нити ДНК в расплавленной области остаются перекрученными в той же степени, как и до плавления. (Напомним, что при денатурации ДНК I полное число зацеплений нитей для всей молекулы остается неизменным.)

*) Статья написана совместно с А.В. Гагуа. См. Молекулярная биология. — 1989. — Т. 23, № 1. — С. 52–60.

Поэтому, как считают авторы [11], комплементарные нити в денатурированном участке лишены свободы относительных движений. Петлевой фактор, существенный при плавлении ДНК без топологических ограничений, устраняется для пары сцепленных нитей. Такая ситуация описывается моделью однонитевого полимера. Предсказания на ее основе удовлетворительно согласуются с указанными выше опытными данными [14, 15].

Однако обнаружены и другие экспериментальные факты, противоречащие модели Франк-Каменецких [11]. Мы проводили термоденатурацию кольцевых ДНК в так называемых инвертирующих солевых условиях (в ~ 3 М бромистом тетраэтиламмонии), когда средние стабильности АТ- и GC-пар выравниваются [16]. В этих условиях открытые формы — ДНК II, как и ожидалось, плавятся в чрезвычайно узком температурном интервале $T_{GC} - T_{AT}$.

Напротив, к нашему удивлению, интервал плавления ДНК I практически не изменился при переходе от нормальных условий ($T_{GC} - T_{AT} \approx 50^\circ\text{C}$) к инвертирующим ($T_{GC} - T_{AT} \approx 0^\circ\text{C}$). Кроме того, разница точек полуперехода ДНК I и ДНК II также оказалась нечувствительной к фактору дифференциальной стабильности АТ- и CG-пар. Указанные факты позволили нам сделать вывод о независимости характера плавления ДНК I от гетерогенности ее нуклеотидного состава [16].

Очевидно, эти новые данные никак не укладываются в рамки модели однонитевого полимера [11], согласно которой отношение ширины интервала плавления ДНК I и ДНК II мало зависит от фактора $T_{GC} - T_{AT}$. Поэтому надо было ожидать крайне узкого интервала ($\leq 2^\circ\text{C}$) для плавления ДНК I в инвертирующих условиях, тогда как реально эта величина составляет 25°C (рис. 74).

Ниже представлена простая феноменологическая теория процесса термоденатурации полимеров с топологическими ограничениями, позволяющая добиться удовлетворительного согласия с опытными данными для кольцевых ДНК.

а) **Формулировка модели.** В процессе внутримолекулярного плавления кольцевой ковалентно замкнутой ДНК разрушаются относительно слабые комплементарные взаимодействия, но не нарушается целостность сахаро-фосфатного остова. Поэтому топологическое состояние двунитевой молекулы остается неизменным. Это состояние характеризуется фиксированным полным числом зацеплений двух кольцевых нитей ДНК. В отличие от ДНК I, в ДНК II разрушение стэкинга при плавлении сопровождается полным расплетением нитей в денатурированной области. Здесь релаксация к наиболее вероятному состоянию перекрученных нитей возможна за счет свободы относительного вращения комплементарных цепей на концах молекулы (или в точке однонитевого разрыва для ДНК II). Отсюда ясно, что при одном и том же числе расплавленных пар N_1 ДНК I обладает избыточным по сравнению с ДНК II числом зацеплений нитей

$$\Delta L_k = \alpha N_1, \quad (1)$$

где α — угол спирального вращения (в нативном состоянии двойной спирали ДНК II).

Рис. 74. Кривые плавления и их производные репликативной формы ДНК фага ϕ X174 в инвертирующих условиях (раствор содержал 3 М бромистый тетраэтиламмоний). Препарат ДНК представлял собой смесь ДНК I и ДНК II в соотношении 10 : 1

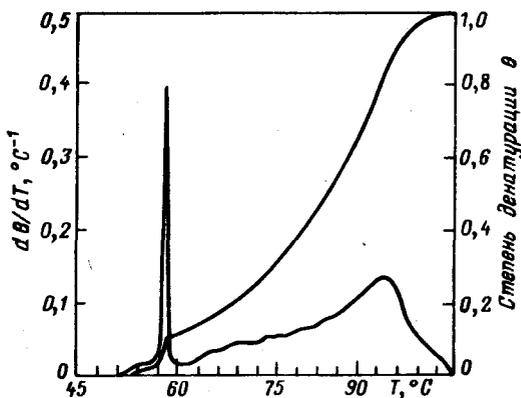
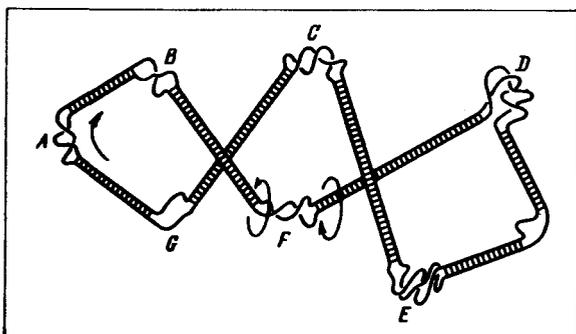


Рис. 75. Схематическое изображение кольцевой, ковалентно замкнутой ДНК в интервале плавления



Задание определенного топологического состояния с фиксированным числом ΔL_k сильно ограничивает набор допустимых конформаций и поэтому сопряжено с избыточной свободной энергией у ДНК I по сравнению с ДНК II.

Последовательный расчет избыточной энергии не представляется возможным на современном этапе. В связи с этим необходимо привлечь некоторые дополнительные предположения.

Мы будем считать оправданным приближение частично денатурированной ДНК I в интервале плавления моделью тонкой ленты. (По крайней мере при небольших степенях денатурации ДНК I такое приближение, по-видимому, достаточно надежно.) Приняв его, следует разделить вклады в ΔL_k от пространственной закрутки оси молекулы (райзинга) двуязовой структуры (часть, не зависящая от относительного вращения нитей) и от "твистинга" — вектора относительного вращения, спроектированного на ось дуплекса [17]. Наше следующее предположение состоит в том, что как избыточный твистинг (Tw), так и избыточный райзинг (Wr) возникают и остаются привязанными к локально денатурированным областям. Наглядно это предположение проиллюстрировано на рис. 75, где схематически изображена молекула ДНК I в интервале плавления. Отличие от упомянутой выше модели [11] состоит в том, что здесь вклад рай-

зинга в ΔL_k не игнорируется. Причем считается, что этот вклад обусловлен преимущественно резкой переориентацией оси дуплекса в локально расплавленных областях. Качественно понятно, что участки А — Г на рис. 75 с разрушенной вторичной структурой обладают повышенной по сравнению с нативным дуплексом гибкостью. Поэтому наше третье предположение состоит в том, что расплавленные участки играют роль свободных шарниров в местах сочленения негнущихся нативных сегментов. Поэтому, учитывая райзинг молекулы, мы будем пользоваться моделью свободно сочлененной цепи, в качестве куновского сегмента которой выступают нативные участки.

б) Теоретический анализ модели. Перейдем к исследованию термодинамического эффекта топологических ограничений в рамках сделанных предположений. Согласно прямым расчетам методом Монте-Карло [18, 19], свободная энергия замкнутой цепи n свободно сочлененных сегментов с заданным числом пространственных витков ω выражается в виде

$$F_\omega = G\omega^2/n. \quad (2)$$

Численные оценки для параметра жесткости G приведены в работах Вологодского и соавторов [18] и ле Бре [19]. В выражении (2) свободная энергия отсчитывается от энергии релаксированного состояния кольцевой формы, что соответствует состоянию ДНК II. Значение параметра G не зависит от длины куновского сегмента (в нашем случае от длины нативного участка) при достаточно малой толщине последнего (по отношению к его длине). Тривиальный пересчет данных ле Бре [19] показывает, что эта зависимость от длины сегмента незначительна для ДНК, когда нативные участки превосходят 20 пар оснований. Не желая пока иметь дело с существенными осложнениями анализа, возникающими при учете конечной толщины дуплекса, будем ограничиваться областью кривой плавления, где эффект толщины мал. Нижняя граница для длины нативного участка в 20 пар оснований задает верхний предел для степени денатурации θ_{\max} ; тем самым ограничивается область на кривой плавления, где использование выражения (2) правомочно. Соответствующая количественная оценка для θ_{\max} станет возможной после завершения расчета *).

Помимо нижнего, существует и верхний предел \bar{v}_{\max} для применения выражения (2). Длина нативного участка \bar{v} не должна превосходить персистентную длину нативного дуплекса (≈ 200 пар оснований). В противном случае нельзя пренебрегать его собственной гибкостью. Таким образом, самое начало процесса плавления также исключается из рассмотрения на основе выражения (2). Отметим, что выражение для свободной энергии (2) получено для свободно сочлененной цепочки с одинаковыми сегментами [18, 19]. Однако оно остается применимым в случае сегментов разных длин при условии, что наименьшая длина все-таки превосходит порог проявления эффекта толщины цепи, равной, как говорилось, 20 парам оснований. В этом случае выражение для добавочной свободной энергии

*) В появившейся недавно работе Кленина и соавторов [20] получена более сильная зависимость G от длины сегмента, что приводит к некоторому изменению значения θ_{\max} .

райзинга F_{ω} зависит лишь от числа нативных (или денатурированных) областей и не зависит от распределения их длин. Ниже мы воспользуемся данным обстоятельством.

Выражение (2) соответствует модели с точечными сочленениями сегментов. Реальные расплавленные участки точечными, конечно, не являются. Поэтому вклад их в ΔL_k не ограничивается только обеспечением гибкости сочленения нативных сегментов. Но возможно также их вращение вокруг друг друга — аналог твистинга для тонкой ленты. Соответствующий вклад i -й расплавленной области в ΔL_k обозначен через α_i . Строгое определение величины α_i отсутствует. Однако, очевидно, полному равновесию петли отвечает $\bar{\alpha}_i = 0$ — релаксированное состояние. При не слишком больших отклонениях от равновесия, характеризующих ненулевыми α_i , любая энергия такой петли выражается в виде

$$F_{\alpha_i} = B_i \alpha_i^2, \quad (3)$$

где B_i — коэффициент жесткости, зависящий от числа оснований в петле ν_i :

$$B_i = B(\nu_i); \quad (4)$$

или для совокупности n денатурированных участков суммарная избыточная свободная энергия равна

$$F_{T_w} = \sum_{i=1}^n B(\nu_i) \alpha_i^2. \quad (5)$$

За счет вращения вокруг собственной оси нативных сегментов возможно свободное перераспределение α_i между различными расплавленными областями. Будем считать, что в частичном равновесии при заданном суммарном значении

$$t = \sum_{i=1}^n \alpha_i \quad (6)$$

устанавливается общая для всех денатурированных участков величина интенсивного параметра — плотность числа α_i :

$$\sigma_i = \alpha_i / \nu_i = \text{const} \equiv \sigma = \sum \alpha_i / \sum \nu_i. \quad (7)$$

Это эквивалентно предположению об экстенсивности свободной энергии F_i . Действительно, минимизируя выражение (5), при условии (6) получим

$$B(\nu_i) \alpha_i = \text{const} = B(\nu_i) \nu_i \sigma, \quad (8)$$

откуда

$$B(\nu_i) = g / \nu_i \sim 1 / \nu_i; \quad (9)$$

поэтому для F_i имеем

$$F_i = g \nu_i \sigma^2. \quad (10)$$

Суммарная избыточная энергия расплавленной области F_t тогда будет

$$F_t = g \sigma^2 N_1 = g t^2 / N_1, \quad (11)$$

где

$$N_1 = \sum_{i=1}^n \nu_i.$$

Заметим, что выражение (11), как и (2), не зависит от распределения длин расплавленных участков, но лишь от полного числа N_1 денатурированных пар.

Теперь можно представить полное выражение для неравновесной свободной энергии кольцевой замкнутой молекулы в интервале перехода:

$$F(N_1, n, t, \omega) = \Delta F_1 N_1 + F_s n - T \ln(W_1 W_2) + \frac{g t^2}{N_1} + \frac{G \omega^2}{n}. \quad (12)$$

Здесь ΔF_1 — свободная энергия перехода одной пары из нативного в денатурированное состояние для ДНК II, F_s — свободная энергия границы между нативной и денатурированной областями (см. [1]). Третье слагаемое в выражении (12) возникает из-за энтропии размещения N_1 звеньев по n расплавленным участкам и $(N - N_1)$ звеньев по n нативным областям. Имея в виду замечания, сделанные после формул (11) и (2), выражения для W_1 и W_2 можно представить в обычном виде [20]:

$$W_1 = \frac{N_1!}{(N_1 - n)! n!}, \quad W_2 = \frac{(N - N_1)!}{(N - N_1 - n)! n!}. \quad (13)$$

Выражение (12) еще не отвечает равновесному состоянию при заданных внешних условиях (T). Во-первых, при данных степени денатурации $\theta = N_1/N$ и n величины t и ω не произвольны, но определяются из условия минимальности F по t и ω при фиксированной сумме ΔL_k :

$$t + \omega = \Delta L_k = \alpha N_1. \quad (14)$$

Это условие приводит к выражению избыточной свободной энергии частично денатурированной ДНК I $\Delta F(N_1, n, T)$:

$$\Delta F(N_1, n, T) = (\alpha N_1)^2 / (N_1/g + n/G). \quad (15)$$

Во-вторых, сами значения N_1 и n также определяются путем минимизации. Таким образом, получаются два условия равновесия в виде

$$0 = \frac{\Delta U}{RT} - \frac{\Delta S}{R} + \ln \frac{X - 1}{X - Y} + \alpha^2 \bar{g} \bar{G} \frac{\bar{G} X^2 + 2\bar{g} X}{(\bar{G} X + \bar{g})^2},$$

$$0 = \bar{F}_s - \ln(X - 1) \left(\frac{X}{Y} - 1 \right) - \frac{\alpha^2 \bar{g} \bar{G} \bar{g} X}{(\bar{G} X + \bar{g})^2}. \quad (16)$$

Здесь введены обозначения U, S — энтальпия и энтропия перехода на пару;

$$\Delta F = U - T \Delta S, \quad \bar{F}_s = F_s / (RT), \quad \bar{g} = g / (RT), \quad \bar{G} = G / (RT),$$

$X = N_1/n$ — средняя длина расплавленной области и $Y = N_1 / (N - N_1)$ — относительная доля денатурированных пар. При получении условий равновесия в виде (16) мы пользовались формулой Стирлинга.

Полученные выражения полностью задают кривую плавления $\theta(T)$. При этом формула (16) определяет среднюю длину денатурированного участка как функцию степени денатурации. При расчете по формулам (16) значения параметров U, S, α, \bar{F}_s считались заданными; для величин S, \bar{F}_s брали значения $S \approx 10,4 R$; $\bar{F}_s \approx 10$. Теплота перехода на пару U (без учета топологических ограничений) принималась равной 34–40 °С, чтобы удов-

летворить данным для температуры плавления ДНК II в условиях эксперимента [16]. Экспериментальными параметрами для ДНК I являются ширина интервала плавления, измеряемая как обратный наклон кривой плавления в точке полуперехода $\Delta T = (d\theta/dT)_{\theta=1/2}^{-1}$, и сдвиг точки полуперехода ДНК I по сравнению с ДНК II $\delta T_{1/2} = T_{1/2}^I - T_{1/2}^{II}$, определенные нами ранее [16]. Два параметра теории \bar{g} и \bar{G} вырырировали так, чтобы добиться наилучшего согласия с опытными данными. Результаты расчетов приведены в табл. 3. Как видно, наиболее близкие к опытным данным теоретические предсказания для ΔT , $\delta T_{1/2}$ получаются при $\bar{G} = 3 \div 5$; $\bar{g} \geq 300$. Имея в виду довольно сильное огрубление реальной ситуации описанной моделью, полученное соответствие расчетных и экспериментальных параметров можно считать вполне удовлетворительным.

Другим параметром, который также можно рассчитывать получить из эксперимента, является средняя длина денатурированных или нативных участков: $\bar{\nu}_{den} = N_1/n$, $\bar{\nu}_{nat} = N_2/n$. Соответствующие измерения можно провести на основе исследования гидродинамических свойств молекул ДНК I в интервале плавления. Подобные опыты на ДНК II ставились ранее [21, 22]. Расчетные значения для средней длины расплавленных участков $\bar{\nu}_{den} = N_1/n$ получаются из формулы (16).

При значениях параметров $\bar{G} = 3 \div 5$; $\bar{g} = 100 \div 500$ оказывается $\bar{\nu}_{den} = (15 \pm 2)$ пар нуклеотидов в точке полуперехода $\theta = 1/2$. Эту величину следует сопоставить с соответствующей ей при плавлении ДНК без топологических ограничений. Как известно (см., например, [1]), средняя длина расплавленных участков в точке полуперехода линейных ДНК составляет около 10^2 пар нуклеотидов, что на порядок превышает полученное нами значение $\bar{\nu}_{den}$ для ДНК I. Легко понять, откуда берется столь существенная разница. Часть избыточной по сравнению с ДНК II свободной энергии молекулы ДНК I, обязанная своим происхождением упорядоченной пространственной конфигурации оси дуллеса (его райзинга) F_{ω} , тем меньше, чем больше расплавленных (и нативных) участков n . Поэтому термодинамически выгодно оказывается разбиение молекулы на возможно большее число относительно коротких нативных и денатурированных

Таблица 3

Зависимость сдвига точки полуперехода ДНК I относительно ДНК II и ширины перехода ДНК II от значений параметров \bar{G} и \bar{g}

\bar{g}	$T, ^\circ\text{C}$	\bar{G}			\bar{g}	$T, ^\circ\text{C}$	\bar{G}		
		3	5	8			3	5	8
100	ΔT°	13	14	13,5	300	ΔT°	17,5	22	27
	$\delta T_{пл}$	22	26	33		$\delta T_{пл}$	26	34	40
200	ΔT°	16,5	19,5	23	500	ΔT°	18,5	24	
	$\delta T_{пл}$	25	32	40		$\delta T_{пл}$	27	35	

областей. Лишь наличие избыточной энергии границы между нативным и денатурированным участками F_s ограничивает нарастание числа сегментов n . Даже грубые прикидки, учитывающие только эти два противоположных по эффекту фактора, дают оценку для средней длины денатурированной области, близкую к полученной на основе более аккуратного расчета по формулам (16), (15).

в) **О б с у ж д е н и е.** Остановимся на некоторых качественных выводах, следующих из представленного в предыдущем разделе рассмотрения.

Прежде всего, значение параметра жесткости $G = 3 \div 5$, дающее наилучшее согласие с экспериментом, оказывается весьма близким к соответствующей жесткости свободно-сочлененной куновской цепочки [18, 19]. Этот результат можно расценивать как веский аргумент в пользу главного предположения нашей модели — расплавленные участки служат свободными шарнирами, вращение в которых обеспечивает воплощение ΔL_k в виде райзинга цепочки из нативных сегментов.

Способность комплементарных нитей в денатурированной области взаимно переплетаться дает вклад в ΔL_k , не учитываемый райзингом. Насколько этот вклад существен, определяется величиной параметра \bar{g} . Мы можем определить отношение t/ω в равновесии, минимизируя по t, ω выражение для свободной энергии (12). В результате получим

$$(t/\omega)_{\text{eq}} = (\bar{G}/\bar{g}) (N_1/n). \quad (17)$$

При найденных значениях средней длины денатурированного участка $\bar{\nu}_{\text{ден}} = 15$ в окрестности полуперехода и оцененных параметрах \bar{G}, \bar{g} это отношение оказывается равным

$$t/\omega \sim 10^{-1}. \quad (18)$$

Таким образом, вплоть до точки полуперехода денатурация кольцевой замкнутой ДНК сопровождается переходом витков уотсон-криковской спирали в витки суперспирали (райзинг). Требуемые при этом существенные изгибы оси дуплекса возникают за счет изломов в относительно мягких локально денатурированных областях. Напротив, как свидетельствует оценка (18), нити одноцепочечной ДНК проявляют неожиданно высокую жесткость по отношению к их взаимной закрученности в расплавленной области.

3. К ВОПРОСУ О СКОРОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ПРОМОТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *ESCHERICHIA COLI* С ДНК ФАГА T7*)

Один из возможных путей регуляции транскрипции может реализовываться на уровне инициации синтеза РНК. Процесс инициации включает несколько последовательных этапов: поиск промотора, формирование открытого промоторного комплекса, связывание субстрата, формирование первой фосфодиэфирной связи [23]. Оценка временных масштабов каждого этапа позволяет определить скоростylimитирующий этап.

*) Статья написана совместно с С.К. Завриевым и М.Ф. Шемякиным. См. Nucl. Acids Res. — 1980. — V.8. — P. 1391—1404.

Процесс инициации транскрипции как целое наиболее эффективно будет регулироваться путем воздействия именно на этот этап. В литературе имеются оценки констант скоростей и времен промежуточных этапов процесса инициации транскрипции [24–29].

С физико-химической точки зрения особый интерес представляет исследование этапа поиска промоторов. Именно на этой стадии физико-химические аспекты взаимодействия ДНК с белком, узнающим специфические последовательности, проявляются наиболее выпукло. В настоящее время сам механизм поиска промоторов не совсем ясен. Изучение кинетики формирования комплексов промотор–РНК-полимераза было в основном проведено методом задержания комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах [24, 25, 27, 30]. Было установлено, что кинетика поиска в сильной мере зависит от среды и концентрации реагентов [24, 27, 30]. Ранее мы показали, что ионная сила существенно влияет на время поиска промоторных последовательностей, причем это время является немонотонной функцией от ионной силы с минимумом при 50–75 мМ NaCl [27]. В настоящем разделе нами детально рассматриваются эти кинетики и определяются константы скоростей реакции РНК-полимеразы с промоторами, находящимися на ДНК фага Т7. Кинетические кривые комплексообразования холофермента РНК-полимеразы *E. coli* с ДНК фага Т7 получали с использованием метода задержания комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах [24].

а) Теоретический анализ. Молекулярная схема реакции взаимодействия фермента с ДНК может быть представлена следующим образом:



Здесь E — фермент, D — неспецифическое место связывания, P — специфическое место связывания (промотор), k_a , k_d и k_p — константы скоростей соответствующих реакций. Поскольку промоторные комплексы достаточно стабильны при временах наблюдения кинетики комплексообразования, комплекс EP может рассматриваться как недиссоциирующий. Схема реакции сохраняется вне зависимости от предполагаемого механизма поиска промоторов. Механизм поиска промоторов сказывается лишь на значениях характерных кинетических констант.

Условия эксперимента задают концентрацию свободного фермента (E_0) в начале реакции ($t = 0$), суммарную концентрацию молекул ДНК (N_T) и число промоторов на одну молекулу ДНК (m). Наряду с этим мы использовали данные де Хазета и соавторов [34] о константах равновесия при неспецифическом связывании (K_{e_q}). Искомым параметром является константа скорости k_p . Для того чтобы связать получаемые в эксперименте кинетические характеристики с этим параметром, был проведен следующий анализ.

Пусть в момент времени t объемные концентрации будут: $P(t)$ для не занятых ферментом промоторов, $E(t)$ — для свободного фермента,

$D(t)$ — для неспецифических мест связывания ДНК и N_f — для молекул ДНК, ни один промотор которых не занят ферментом. Следует отметить, что $D(t)$ равно объемной концентрации пар оснований вне промоторных областей [35]. Так как промоторные последовательности занимают лишь небольшую часть полной длины ДНК, $D_0 \approx LN_t$, где L — длина ДНК в парах нуклеотидов (п.н.). При используемых в эксперименте отношениях $r = [E]/[\text{ДНК}]$ условие $E \ll D_0$ всегда выполняется. Отсюда очевидно, что $D_0 \approx D(t)$.

Кинетическая система уравнений, основанная на схеме реакций (1) и (2), имеет вид

$$dE/dt = -k_a ED_0 - k_p EP + k_d [ED], \quad (3a)$$

$$dP/dt = -k_p EP = -\frac{d[EP]}{dt}. \quad (3б)$$

Кроме того, выполняется условие баланса

$$E + [ED] + [EP] = E_0; \quad (4)$$

$$P + [EP] = P_0. \quad (5)$$

Так как $D_0 \gg P_0$, время для установления равновесия в реакции (1) много меньше характерного времени накопления промоторных комплексов. Поэтому на временах наблюдения (порядка времен реакции (2)) допустимо считать достигнутым квазиравновесное состояние для реакции (1). Это условие задает E , которое должно быть введено в уравнение (3б). Из уравнений (4) и (5) и условия $dE/dt = 0$ получаем для $E(P)$:

$$E = k_d(E_0 - P_0 + P)/(k_a D_0 + k_d). \quad (6)$$

Подставляя это выражение вместо E в (3б), получаем

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{d[EP]}{dt} = -\frac{k_p(E_0 - P_0 + P)P}{K_{\text{eq}}D_0 + 1}. \quad (7)$$

Интегрируя уравнение (7), находим зависимость $P(t)$:

$$P(t) = \frac{(P_0 - E_0)P_0}{P_0 - E_0 \exp\left[-\frac{P_0 - E_0}{E_0} \frac{t}{\tau}\right]}, \quad (8)$$

или для кинетики накопления промоторных комплексов имеем из (8) и (5)

$$[EP] = P_0 - P(t) = P_0 \left\{ 1 - \frac{P_0 - E_0}{P_0 - E_0 \exp\left[-\frac{P_0 - E_0}{E_0} \frac{t}{\tau}\right]} \right\}. \quad (9)$$

Основываясь на выражении (9), легко описать зависимость числа молекул ДНК, задержанных на фильтрах, от времени. Отношение числа N_f молекул, проходящих через фильтр, к общему числу N_t молекул ДНК выражается в виде

$$N_f/N_t = [P(t)/P_0]^m. \quad (10)$$

Уравнения (10) и (8) дают зависимость от времени числа задержанных молекул N_r :

$$N_r(t) = N_t - N_f(t) = \{ 1 - [P(t)/P_0]^m \} N_t. \quad (11)$$

Видно, что для того, чтобы найти зависимость изменения N_r во времени от $[EP](t)$, не требуется привлечения комбинаторики. Это важно отметить, так как иначе требуется аппроксимация суммы биномиального распределения функцией Пуассона [30, 33], что справедливо лишь в пределе $m \rightarrow \infty$.

Подставляя (8) в (11) и сохраняя только первый член разложения по малой величине

$$\frac{E_0}{P_0} \exp \left[- \frac{P_0 - E_0}{E_0} \frac{t}{\tau} \right],$$

получаем

$$1 - \frac{N_r}{N_t} = \left[\frac{P_0 - E_0}{P_0} \right]^m \left\{ 1 + \frac{mE_0}{P_0} \exp \left[- \frac{P_0 - E_0}{E_0} \frac{t}{\tau} \right] \right\}, \quad (12)$$

или

$$\ln \left[\frac{1 - N_r/N_t}{(1 - E_0/P_0)^m} - 1 \right] \approx - \frac{P_0 - E_0}{E_0} \frac{t}{\tau} + \ln \frac{mE_0}{P_0}, \quad (13)$$

где

$$\tau = (K_{eq}D_0 + 1)/(E_0k_p). \quad (14)$$

Выражение (13) позволяет найти константу скорости образования фермент-промоторного комплекса k_p из полученных экспериментально кинетических кривых задержания на фильтрах молекул ДНК $N_r(t)$.

б) Экспериментальные данные. На рис. 76 приведена кинетика формирования промоторных комплексов при различных ионных силах. Эти же кинетики, отложенные в координатах $\ln\{(1 - N_r/N_t)/(1 - E_0/P_0)^m - 1\}$, t , повторены на рис. 77. Согласно формуле (13) наклон этих кривых дает следующую комбинацию параметров:

$$B = -(P_0 - E_0)k_p/(K_{eq}D_0 + 1); \quad (15)$$

величина B (s^{-1}) характеризует временной масштаб кинетики формирования специфических комплексов. Можно видеть, что точка пересечения кривых на рис. 77 не лежит на оси ординат, как это предсказывается формулой (13), и ордината точки пересечения значительно больше, чем предсказано формулой (13): $\ln\{\dots\}_{t=0} = \ln(mE_0/P_0)$. Объяснения этих расхождений будут даны ниже.

Значения конкретных кинетических параметров представлены в табл. 4. Зависимость $1/B = T$ от ионной силы показана на рис. 78. Характерной особенностью этой зависимости является ее немонотонный характер.

Предполагается, что реакции специфического и неспецифического связывания контролируются трехмерной диффузией [36]. В таком случае в соответствии с ранее полученными данными [36, 37] зависимость

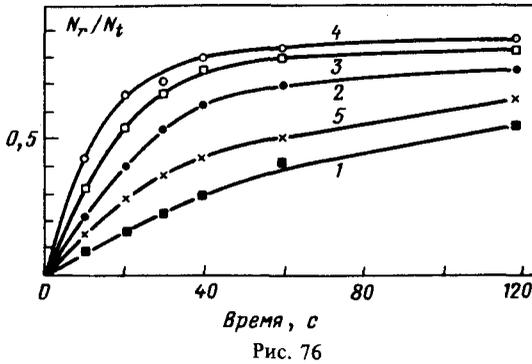


Рис. 76. Кинетика формирования комплексов РНК-полимеразы с промоторами фага Т7 при различных ионных силах. Инкубационная смесь содержала РНК-полимеразу и ДНК в соотношении 2:1 в пересчете на количество молекул: 0, 50, 75, 100, 150 мМ NaCl (соответственно кривые 1-5)

Рис. 77. Кинетики формирования фермент-промоторных комплексов, приведенные на рис. 76, но отложенные в координатах $\ln \left\{ \frac{1 - N_p/N_t}{1 - E_0/P_0} \right\} / m - 1$, t ; $m = 7$, $P_0 = 1,4 \cdot 10^{-9}$ М, $E_0 = 4 \cdot 10^{-10}$ М

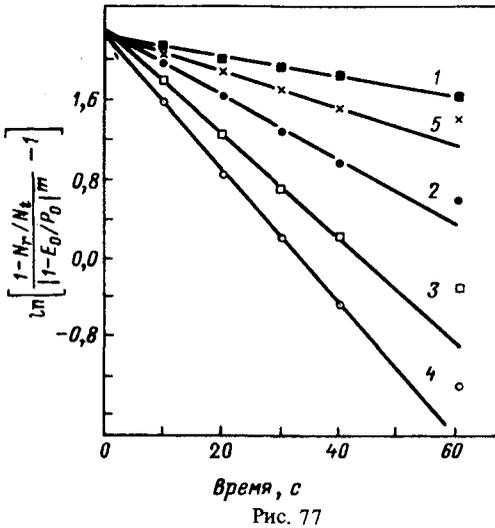
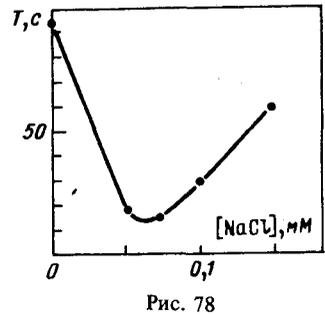


Рис. 78. Зависимость характерного времени $T = 1/V$ формирования специфических комплексов от ионной силы



k_p от I благодаря эффекту электростатического притяжения между отрицательно заряженной ДНК и положительно заряженной молекулой фермента должна быть слабой. В то же время зависимость от ионной силы равновесной константы неспецифического связывания K_{eq} согласно данным де Хазета и соавторов [34], должна быть монотонной. Основываясь только на этом, можно заключить, что зависимость $T(I)$ также должна быть монотонной. Причина немонотонного характера кривой $T(I)$ (рис. 78) лежит в сильной зависимости k_p от ионной силы (см. табл. 4). Эту зависимость следует объяснить, поскольку ее понимание должно пролить свет на механизм поиска промоторов.

Естественное объяснение упомянутой выше сильной зависимости $k_p(I)$ состоит в предположении, что в процессе поиска ферментом промоторов имеет место линейная диффузия (скользящее) фермента вдоль матрицы — молекулы ДНК. Характерная диффузионная длина, l , определяется временем жизни неспецифического комплекса:

$$l \approx \sqrt{2D_1\tau_d} = \sqrt{2D_1/k_d}$$

Зависимость кинетических параметров от ионной силы

Параметры	Концентрация NaCl, мМ				
	0	50	75	100	150
* $K_{eq} = \frac{k_d}{k_a}, M^{-1}$	$8 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^4$
** B^7, c^{-1}	$1,1 \cdot 10^{-2}$	$5,6 \cdot 10^{-2}$	$7,7 \cdot 10^{-2}$	$3,4 \cdot 10^{-2}$	$1,8 \cdot 10^{-2}$
*** $k_p^7, M^{-1} \cdot c^{-1}$	$7 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$8,3 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$
**** B^5, c^{-1}	10^{-2}	$4,9 \cdot 10^{-2}$	$6,2 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-2}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$
***** $k_p^5, M^{-1} \cdot c^{-1}$	$1,1 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^9$	$5,3 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^7$
k_a, c^{-1}	3,8	$2 \cdot 10^1$	$5,4 \cdot 10^1$	$1,7 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^3$

* данные из работы де Хазета [17]

$$** B^7 = \frac{d}{dt} \left[\ln \frac{1 - N_r/N_t}{(1 - E_0/P_0)^m} - 1 \right]_{t=0}; m = 7 \text{ (начальный наклон кривых на рис. 77)}$$

$$*** k_p^7 = \frac{K_{eq} D_0 + 1}{P_0 - E_0} B^7 \text{ [см. формулу (15)]}$$

**** То же, что **, но рассчитанное для $m = 5$ (соответствует наклону кривых на рис. 80)

$$***** k_p^5 = \frac{K_{eq} D_0 + 1}{P_0 - E_0} B^5$$

Скольжение приводит к увеличению радиуса реакции взаимодействия фермент – промотор [36]. Это делает понятным наблюдаемую зависимость k_p от I (табл. 4). Существование одномерной диффузии фермента в процессе поиска промотора может быть проверено экспериментально. Для этого можно поместить на матрицу агенты, препятствующие предполагаемому скольжению фермента. Если скольжение действительно имеет место, то можно предположить, что эти агенты уменьшат скорость комплексообразования. В качестве агента, препятствующего одномерной диффузии, мы использовали актиномицин D (AM). Известно, что AM ингибирует транскрипцию, а не специфическое связывание [32, 38]. Время жизни комплекса AM · ДНК исчисляется сотнями секунд [31], т.е. больше времени, в течение которого проследивается кинетика. Поэтому можно считать, что комплекс AM · ДНК за время реакции не диссоциирует.

Влияние AM на скорость выбора промотора при различных ионных силах представлено на рис. 79. При $r = [2P]/[AM_{св}] \approx 300$ AM замедляет скорость образования специфических комплексов только при ионных силах 50 и 75 мМ NaCl. При $r \approx 100$ AM влияет на кинетику во всем диапазоне использованных нами ионных сил, за исключением 150 мМ NaCl. При $r > 500$ AM не оказывает никакого достоверно определяемого эффекта во всем исследованном диапазоне ионных сил. При больших кон-

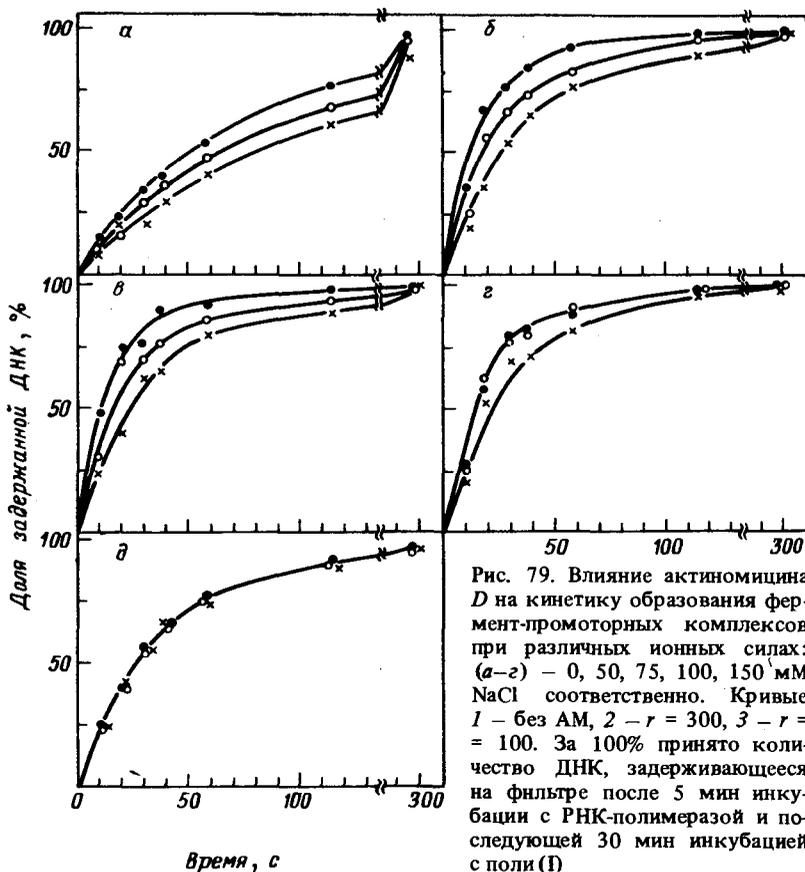


Рис. 79. Влияние актиномина D на кинетику образования фермент-промоторных комплексов при различных ионных силах: (а-г) — 0, 50, 75, 100, 150 мМ NaCl соответственно. Кривые 1 — без AM, 2 — $r = 300$, 3 — $r = 100$. За 100% принято количество ДНК, задерживающееся на фильтре после 5 мин инкубации с РНК-полимеразой и последующей 30 мин инкубацией с поли(Г)

центрациях AM ($r \sim 10$) значительное уменьшение скорости образования комплексов происходит независимо от ионной силы.

Приведенные данные качественно удовлетворительно согласуются с представлением о вкладе линейной диффузии в процесс поиска ферментом промоторов.

в) Обсуждение. Данные по влиянию AM на кинетику формирования промоторных комплексов позволяют оценить среднюю длину скольжения фермента вдоль матрицы. Как было показано фон Смолуховским [39], константа скорости необратимой рекомбинации двух типов частиц в случае, когда реакция лимитируется диффузией по объему, может быть представлена в виде

$$k_p = 2\pi(D_a + D_b)bn_{N_A}/1000, \quad (16)$$

где D_a и D_b — коэффициенты трехмерной диффузии реагирующих частиц, b — радиус реакции, равный сумме радиусов взаимодействующих частиц, N_A — постоянная Авогадро.

Наличие диффузионного скольжения во время существования неспецифического комплекса приводит к увеличению радиуса реакции, и ферменту достаточно попасть на матрицу в область, прилегающую к промотору на расстоянии, не большем диффузионной длины, чтобы найти промотор до того, как произойдет диссоциация. Влияние АМ на константу скорости k_p наступает при таких больших его концентрациях, когда расстояние между двумя соседними молекулами АМ не превышает характерной диффузионной длины в данной ионной силе. Поэтому по пороговой концентрации связанного АМ можно судить о характерной длине диффузионного скольжения. Из данных, представленных в предыдущем разделе (рис. 79), получаем следующие оценки: $l \approx 0$ п.н. при 150 мМ Na^+ , $l \approx 100$ п.н. при 100 мМ Na^+ ; $l \approx 500$ п.н. при 75–50 мМ Na^+ , $l \geq 500$ при 0 мМ Na^+ . Промоторы фага Т7 для РНК-полимеразы *E. coli* точно картированы [40]. Три сильных промотора (A_1, A_2, A_3) локализованы внутри участка генома длиной ~ 400 п.н. Сравнивая эти данные с приведенными выше оценками величины l , можно заключить, что диффузионная длина перекрывает области между A_1-A_2 - и A_2-A_3 - промоторами.

Таким образом, увеличение скорости формирования комплекса A_2 -промотора с ферментом, обусловленное линейной диффузией фермента вдоль неспецифических последовательностей ДНК, прилегающих к A_2 -промотору, играет меньшую роль, чем в случае достаточно удаленных друг от друга промоторов (В–Е) [40]. Другими словами, в условиях, когда скольжение контролирует скорость поиска (низкая ионная сила), кластер промоторов A_1-A_3 "воспринимается" ферментом как один связывающий сайт. Вследствие этого числа промоторов, эффективно узнаваемых на Т7 ДНК, предположено равным $m = 5$. Экспериментальные результаты, отложенные в координатах $\ln \left[\frac{1 - N_r/N_t}{|1 - E_0/P_0|^m - 1} \right]$, t для $m = 5$ приведены на рис. 80. В табл. 4 представлены значения соответствующих констант k_p , полученные по наклону кривых на рис. 80. Теперь в соответствии с формулой (13) точка пересечения кривых лежит на оси ординат. Однако

как и для случая $m = 7$, ордината точки пересечения завышена по сравнению с таковой, предсказываемой формулой (13). Это несоответствие может быть объяснено тем, что при связывании с молекулой ДНК только одной молекулы фермента эффективность задержания на фильтрах такого комплекса ниже 100 %.

Следует также отметить, что при ионных силах ниже

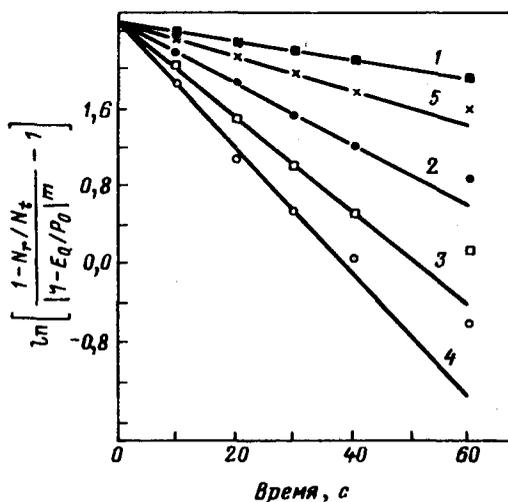


Рис. 80. То же, что и на рис. 77, но рассчитанное для $m = 5$

0,1 М NaCl возможна димеризация фермента [41]. Это выразится в уменьшении концентрации фермента и проявится в понижении уровня насыщения кривых, представленных на рис. 76. В то же время наблюдаемый уровень насыщения близок к предсказываемому, когда возможностью димеризации фермента пренебрегается.

Немонотонное поведение кривой $T(I)$ (рис. 78) может быть объяснено в рамках модели, предполагающей скольжение. Качественно такое поведение может быть понято на основе следующих соображений. Взаимодействие фермента с ДНК, приводящее к образованию специфических комплексов, можно характеризовать двумя временными масштабами [27]: τ_d — время жизни неспецифического комплекса и τ_0 — время, которое фермент находится в растворе между диссоциацией и следующей посадкой на ДНК. Как показано, τ_0 слабо зависит от ионной силы раствора [36], тогда как величина τ_d с увеличением ионной силы падает. Поэтому, хотя в низких ионных силах эффективный размер мишени (т.е. большое l) велик, время, проводимое ферментом на участках ДНК, удаленных от промоторов, также велико. В этих условиях реассоциации сравнительно редки и поиск промотора главным образом определяется скольжением фермента. За счет же частых реассоциаций в условиях высоких ионных сил вероятность попадания фермента в области, прилегающие к промоторным, возрастает, однако уменьшается размер области, которую фермент может "прощупать" скольжением. Отсюда ясно, что оптимум скорости нахождения промотора достигается при $\tau_0 \approx \tau_d$. К этому заключению можно прийти более строгим рассмотрением, основываясь на модели скольжения

$$k_p \approx l \approx \sqrt{1/k_d}.$$

Теперь перепишем формулу (14):

$$B = \text{const} \cdot [\sqrt{1/k_d}(1 + D_0 k_a/k_d)]. \quad (17)$$

Дифференцируя по k_d (единственному, зависящему от I параметру), можно убедиться, что максимум (17) достигается при $I = I_0$ так, что

$$k_a D_0 = k_d(I), \text{ или } K_{\text{eq}}(I_0) = 1/D_0. \quad (18)$$

Для подтверждения этого результата можно использовать данные де Хазета и соавторов [34] (см. табл. 4). Условие (18) достигается при $I = 0,05 \div 0,1$ М NaCl, что качественно согласуется с нашими наблюдениями (см. рис. 78).

На основе найденных значений константы скорости специфической ассоциации и оценок длины диффузионного скольжения может быть найдена константа скорости неспецифического комплексообразования. Предполагая, что ассоциация фермента с ДНК контролируется трехмерной диффузией, получаем

$$k_p/k_a = (l + R)/R, \quad (19)$$

где R — радиус реакции неспецифического взаимодействия. Его значение близко к размеру области ДНК, покрываемой ферментом: $R \approx 50$ п.н. Затем получаем для k_a

$$k_a = 3 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}.$$

Следует отметить, что это значение отличается от найденного Джакомони [30] — $3 \cdot 10^8 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Эта работа проведена при низких концентрациях ДНК и поэтому в ней не учитывается влияние неспецифического связывания на кинетику формирования промоторных комплексов. Для понимания причин этого расхождения следует провести эксперименты, аналогичные представленным в этой статье, при различных концентрациях ДНК.

Используя найденные значения k_a и константы равновесия, полученные ранее [34], легко найти константу скорости диссоциации неспецифических комплексов (см. табл. 4) и коэффициент одномерной диффузии D_1 :

$$D_1 = l^2 k_d / 2 \sim 10^9 \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}.$$

Это значение определяется с точностью до порядка и слегка варьирует при изменении ионной силы. Найденное значение D_1 близко по величине коэффициенту диффузии белка *lac*-репрессора [42].

4. КИНЕТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО СВЯЗЫВАНИЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *ESCHERICHIA COLI* С ДНК ФАГА Т7 *)

Предыдущее рассмотрение предсказывает определенную зависимость точки оптимума (по ионной силе) скорости нахождения промоторов от концентрации ДНК фага Т7. Результаты экспериментов, приведенные ниже, удовлетворительно согласуются с представлением о роли диффузионного скольжения РНК-полимеразы вдоль матрицы в процессе поиска промоторов и, кроме того, позволяют определить значения констант неспецифического связывания $K_{e,q}$ непосредственно из кинетических данных.

Кинетические кривые комплексообразования холофермента РНК-полимеразы *E. coli* с ДНК фага Т7, как и ранее, получали по методу Хинкеля и Чамберлена [24]. Характерные времена комплексообразования T находили по наклону линейного участка зависимости

$$\ln \left[\frac{1 - N_r/N_t}{1 - (N_r/N_t) |_{t=\infty}} - 1 \right]$$

от t , где $(N_r/N_t) |_{t=\infty}$ — доля задержанных на фильтрах молекул ДНК, отвечающая насыщению кинетики формирования стабильных комплексов. Способ определения значений T из кинетических кривых отличается от использованного ранее тем, что здесь уровень насыщения кинетики является экспериментальным параметром, тогда как ранее он считался заданным условиями эксперимента. Полученные в одинаковых условиях значения T оказались близкими с найденными ранее. Тем не менее преимущество настоящего способа расчета кинетики заключается в том, что он свободен от предположений относительно таких параметров, как

*) Статья написана совместно с С.К. Завриевым и М.Ф. Шемякиным. См. Молекулярная биология. — 1982. — Т. 16. — С. 156–159.

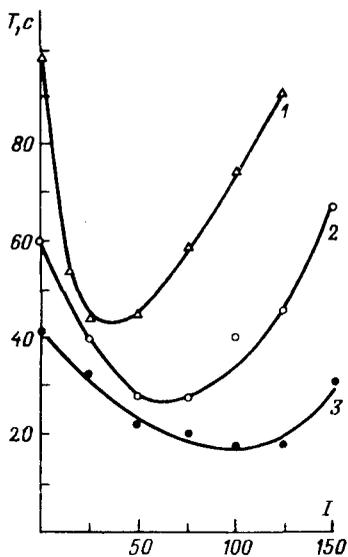


Рис. 81. Зависимость характерного времени образования промоторных комплексов T от ионной силы раствора при разных концентрациях ДНК: 1 – 0,15; 2 – 1,5; 3 – 20 мкг/мл

концентрация активных молекул фермента и число прочных мест связывания, приходящихся на одну молекулу ДНК.

На рис. 81 представлены зависимости характерного времени образования промоторных комплексов РНК-полимеразы *E. coli* и ДНК фага T7 от ионной силы $T(I)$ при трех концентрациях ДНК: 0,15, 1,5 и 20 мкг/мл. Видно, что с повышением концентрации ДНК кривые $T(I)$ сдвигаются в область меньших значений T и больших значений I . Полученное нами ранее выражение

$$T = -(K_{\text{eq}}D + 1)/[(P - E)k_p], \quad (1)$$

где D , P , E – объемные концентрации соответственно неспецифических мест связывания (примерно равная концентрации ДНК, моль пар оснований), промоторов и РНК-полимеразы, позволяет при заданных концентрациях ДНК и известной величине K_{eq} находить k_p . В настоящей постановке эксперимента за счет вариации величины D обе константы могут быть найдены в единой серии экспериментов без привлечения посторонних данных. При достаточно низкой концентрации ДНК неспецифическое комплексообразование не оказывает влияния на кинетику поиска промоторов. Для этого достаточно, чтобы

$$K_{\text{eq}}D \ll 1. \quad (2)$$

В этом случае, как видно из формулы (1), выражение для T не содержит равновесной константы неспецифического связывания. Поэтому в области концентраций ДНК, где выполняется условие (2), формула (1) позволяет по найденному в эксперименте значению $T(I)$ находить константу скорости k_p . Найденные таким образом величины k_p при разных ионных силах приведены в табл. 5. В интервале I 0–125 мМ NaCl вели-

Таблица 5

Зависимость констант k_p и K_{eq} от ионной силы раствора

Константы	[NaCl], мМ					
	0	25	50	75	100	125
$k_p, \text{M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$	$0,8 \cdot 10^9$	$0,9 \cdot 10^9$	$0,7 \cdot 10^9$	$0,44 \cdot 10^9$	$0,33 \cdot 10^9$	$0,26 \cdot 10^9$
$K_{\text{eq}}, \text{M}^{-1}$	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$	10^6	$9 \cdot 10^5$

чина k_p меняется от 10^9 до $0,3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Приведенные данные находятся в согласии с результатом работы Джакомони [30] и заметно отличаются от полученных нами ранее, когда брались высокие концентрации ДНК (не выполняется условие (2)) и использовались значения K_{eq} из работы де Хазета и соавторов [34]. Такое расхождение может быть обусловлено несоответствием измеренных констант K_{eq} [34] нашей экспериментальной ситуации. Вместе с тем, переходя к более высоким концентрациям ДНК, когда нарушается условие (2), и опираясь на уже найденные величины k_p , можно получить из формулы (1) значения констант K_{eq} в рамках нашей постановки эксперимента. Соответствующие значения K_{eq} , найденные при концентрации ДНК 20 мкг/мл, приведены в табл. 5. Величины K_{eq} , определенные при концентрации ДНК 1,5 мкг/мл, практически совпадают с приведенными в таблице.

Следует указать на существенное отличие определенных нами величин K_{eq} от таковых, измеренных де Хазетом и соавторами [34]. В интервале 0–125 мМ NaCl K_{eq} , согласно нашим данным, меняется от $6 \cdot 10^6$ до $9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, тогда как в указанной работе это изменение составляет $8 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Последние измерения проводились хроматографическим методом в равновесных условиях, при очень высоких концентрациях ДНК (100–150 мкг/мл). Не кажется странным поэтому, что они оказались отличными от наших данных. Нам представляется более адекватно описывающими роль неспецифических комплексов в кинетике поиска промоторов величины K_{eq} , определенные на основе этих же кинетик. Отметим, что определение k_p с использованием значений K_{eq} [34] приводит к сильной зависимости $k_p(I)$ от концентрации ДНК, что не может быть объяснено в рамках общепринятого рассмотрения процесса образования промоторных комплексов.

Как видно из табл. 5, в исследованном интервале ионной силы константа скорости ассоциации k_p меняется в три раза. При точности нашего измерения (погрешность не превышала 20%) трехкратное изменение k_p должно считаться достоверным. Ранее найденная нами зависимость константы скорости ассоциации от ионной силы интерпретировалась с позиций модели, учитывающей линейную диффузию фермента вдоль матрицы. Эта модель предполагала следующую связь между k_p и K_{eq} :

$$k_p \sim \sqrt{D_1 \tau_d} \sim \sqrt{K_{eq}}, \quad (3)$$

где D_1 — коэффициент одномерной диффузии, а τ_d — время жизни неспецифического комплекса. Из данных, приведенных в табл. 5, видно, что соотношение величин K_{eq} и k_p близко к соотношению, задаваемому формулой (3). Этот факт является дополнительным к приведенным выше аргументам в пользу модели, включающей линейное диффузионное скольжение РНК-полимеразы вдоль ДНК в процессе поиска промотора.

Из найденных значений k_p может быть оценена константа скорости ассоциации с неспецифическими местами связывания (см. формулу (19) в предыдущем разделе). Оказывается, что $k_a \approx 5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ и оценка для D_1 близка к определенной ранее.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Веденов А.А., Дыхне А.М., Франк-Каменецкий М.Д. // Успехи физ. наук. — 1971. — Т. 105. — С. 479.
2. Wells R.D., Larson J.E., Grant R.S. // J. Mol. Biol. — 1971. — V. 54. — P. 465.
3. Ratliff R.L., Williams D.L., Hayes F.N., Martinez E.L., Smith D.A. // Biochemistry. — 1973. — V. 12. — P. 5005.
4. Morgan A.R., Coulter M.B., Flintoff W.F., Poethau V.H. // Biochemistry. — 1974. — V. 13. — P. 1596.
5. Melchior W.B., von Hippel P.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1973. — V. 70. — P. 29.
6. Воскобойник А.Д., Монаселидзе Д.Р., Мгеладзе Г.Н., Чанчашвили З.И., Лазуркин Ю.С., Франк-Каменецкий М.Д. // Молекуляр. биология. — 1975. — Т. 9. — С. 783.
7. Frank-Kamenetskii M.D., Lazurkin Yu.S. // Ann. Rev. Biophys. Bioengineering. — 1974. — V. 3. — P. 133.
8. Frank-Kamenetskii M.D. // Biopolimers. — 1971. — V. 10. — P. 2623.
9. Arnott S., Selsing E. // J. Mol. Biol. — 1974. — V. 88. — P. 551.
10. Веденов А.А., Дыхне А.М., Франк-Каменецкий А.Д., Франк-Каменецкий М.Д. // Молекуляр. биология. — 1967. — Т. 1. — С. 313.
11. Франк-Каменецкий М.Д., Франк-Каменецкий А.Д. // Молекуляр. биология. — 1969. — Т. 3. — С. 375.
12. Borer P.N., Dengler B., Tinoco I., Uhlenbeck O.C. // J. Mol. Biol. — 1974. — V. 86. — P. 843.
13. Rowitch J., Gralla J., Crothers D.M. // Nucleic Acids Res. — 1974. — V. — P. 109.
14. Vinograd J., Lebowitz J., Watson R. // J. Mol. Biol. — 1968. — V. 33. — P. 173–197.
15. Lyubchenko Yu.L., Frank-Kamenetskii M.D., Vologodskii A.V., Lazurkin Yu.S., Gause G.G. // Biopolimers. — 1976. — V. 15. — P. 1019–1036.
16. Gagua A.V., Belintsev B.N., Lyubchenko Yu.L. // Nature. — 1981. — V. 294. — P. 662–663.
17. Fuller B. // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1971. — V. 68. — P. 815–819.
18. Vologodskii A.V., Anshelevich V.V., Lukashin A.V., Dykhne A.M., Frank-Kamenetskii M.D. // Nature. — 1979. — V. 280. — P. 294–296.
19. Le Brett M. // Biopolimeres. — 1980. — V. 19. — P. 619–637.
20. Klenin K.V., Vologodskii A.V., Anshelevich V.V., Dykhne A.M., Frank-Kamenetskii M.D. // J. Biomol. Struct. Dyn. — 1988. — V. 5. — P. 1173–1185.
21. Шуэалый А.В., Франк-Каменецкий М.Д., Лазуркин Ю.С. // Молекуляр. биология. — 1969. — С. 133–141.
22. Шуэалый А.В., Франк-Каменецкий М.Д., Лазуркин Ю.С. // Молекуляр. биология. — 1971. — Т. 5. — С. 637–642.
23. Chamberlin M.J. // RNA Polymerase / Eds. R. Losic, M.J. Chamberlin. — N.Y.: Cold Spring Harbor, 159–191.
24. Hinkle D.C., Chamberlin M.J. // J. Mol. Biol. — 1972. — V. 70. — P. 187–195.
25. Seeburg P.H., Nüsslein C., Schaller H. // Eur. J. Biochem. — 1977. — V. 74. — P. 103–113.
26. Mandel W.F., Chamberlin M.J. // J. Biol. Chem. — 1974. — V. 249. — P. 2995–3001.
27. Завериев С.К., Белинцев Б.Н., Шемякин М.Ф. // Молекуляр. биология. — 1979. — Т. 13. — С. 1077–1084.
28. Mangel W.F., Chamberlin M.J. // J. Biol. Chem. — 1974. — V. 249. — P. 3002–3006.
29. Smagowicz W.J., Scheit K.H. // Nucleic Acids Res. — 1978. — V. 5. — P. 1919–1932.
30. Giacomoni P.U. // Eur. J. Biochem. — 1979. — V. 98. — P. 557–766.
31. Müller W., Crothers D.M. // J. Mol. Biol. — 1968. — V. 35. — P. 251–290.
32. Beabealashvilly R.Sh., Gursky G.V., Savotchkina L.P., Zasedatelev A.S. // Biophys. Biochim. Acta. — 1973. — V. 294. — P. 425–433.
33. Hinkle D.C., Chamberlin M.J. // J. Mol. Biol. — 1972. — V. 70. — P. 157–185.
34. De Haseth P.L., Lohman T.M., Burgess R.R., Record M.T. // Biochemistry. — 1978. — V. 17. — P. 1612–1622.
35. McGhee J.D., von Hippel P.H. // J. Mol. Biol. — 1974. — V. 86. — P. 469–489.
36. Richter P.H., Eigen M. // Biophys. Chem. — 1974. — V. 2. — P. 255–263.
37. Berg O.G., Blomberg C. // Biophys. Chem. — 1976. — V. 4. — P. 367–381.

38. *Bordier C., Dubochet J.* // *Eur. J. Biochem.* – 1974. – V. 44. – P. 617–624.
39. *Von Smoluchowski M.* // *Z. Phys. Chem.* – 1917. – V. 92. – P. 129–168.
40. *Koller T., Kübler O., Portman R., Sogo J.M.* // *J. Mol. Biol.* – 1978. – V. 120. – P. 121–131.
41. *Burgess R.R.* // *PNA Polymerase* / Eds. R. Losic, M.J. Chamberlin. – N.Y.: Cold Spring Harbor, 1978. – P. 69–100.
42. *Berg O.G., Blomberg C.* // *Biophys. Chem.* – 1978. – V. 8. – P. 271–280.

БИБЛИОГРАФИЯ РАБОТ Б.Н. БЕЛИНЦЕВА

- Влияние последовательности оснований на стабильность двойной спирали ДНК // Молекуляр. биология. — 1976. — Т. 10. — С. 764–769 (совместно с А.В. Вологодским и М.Д. Франк-Каменецким).
- Фазовые переходы в эволюционирующей популяции // Докл. АН СССР. — 1977. — Т. 235, № 1. — С. 205–207 (совместно с М.В. Волькенштейном).
- Нелинейная устойчивость в распределенной триггерной системе. Биологический барьер // Биофизика. — 1978. — Т. 23, вып. 5. — С. 864–869 (совместно с Б.Ф. Дибровым, М.А. Лившицем, М.В. Волькенштейном).
- Исследование устойчивости пространственно неоднородных состояний // Биофизика. — 1978. — Т. 23, вып. 6. — С. 1056–1062 (совместно с М.А. Лившицем, М.В. Волькенштейном).
- On the multi-stationary state transitions in the spatial kinetic system // Z. Physik. B. — 1978. — V. 30. — S. 211–218 (with M.A. Livshitz, M.V. Volkenstein).
- Переходы между стационарными состояниями в закрытой ферментной системе // Докл. АН СССР. — 1979. — Т. 244, № 4. — С. 1005–1008 (совместно с Б.Н. Гольдштейном, М.В. Волькенштейном).
- Динамическое описание переходных процессов в развитии многоклеточных // Докл. АН СССР. — 1979. — Т. 244, № 5. — С. 1239–1243 (совместно с М.А. Лившицем, Г.Т. Гурией, М.В. Волькенштейном).
- Инициация транскрипции: влияние ионной силы и актиномицина D на кинетику формирования открытых промоторных комплексов РНК-полимеразы *Escherichia coli* с ДНК фага T7 // Молекуляр. биология. — 1979. — Т. 13. — С. 1077–1084 (совместно с С.К. Завриевым, М.Ф. Шемякиным).
- Устойчивость пространственно-неоднородных стационарных состояний распределенной системы. Позиционная дифференцировка // Биофизика. — 1979. — Т. 24, вып. 1. — С. 117–123 (совместно с М.А. Лившицем, М.В. Волькенштейном).
- Динамические коллективные свойства развивающихся клеточных систем / Автореф. дисс. на соиск. уч. степени канд. физ.-мат. наук. — М., 1979.
- On the promotor complex formation rate of *Escherichia coli* RNA polymerase with T7 phage DNA // Nucleic Acids Res. — 1980. — V. 8, № 16. — P. 1391–1404 (with S.K. Zavriev, M.F. Shemiakin).
- The effect of superhelicity on the double helix twist angle in DNA // Nucleic Acids Res. — 1979. — V. 6. — P. 983–992 (with A.V. Gagua, S.A. Nedospasov).
- Пространственная самоорганизация как результат близкодействующей положительной кооперативности и дальнедействующей отрицательной кооперативности // Докл. АН СССР. — 1981. — Т. 257, № 2. — С. 487–491 (совместно с М.А. Лившицем, М.В. Волькенштейном).
- Pattern formation in system with nonlocal interactions // Z. Phys. B. Condensed Matter. — V. 44. — S. 345–351 (with M.A. Livshitz, M.V. Volkenstein);
- Effect of base-pair stability on the melting of superhelical DNA // Nature. — 1981. — V. 294. — P. 662–663 (with A.V. Gagua, Yu.L. Lubchenko).
- Secondary bifurcations in system with nonlocal interactions // Phys. Lett. A. — 1981. — V. 84. — P. 422–456.

- Self-organization as a result of effective nonlocality // *Phys. Lett. A.* – 1980. – V. 82, № 8. – P. 375–377 (with M.A. Livshitz, M.V. Volkenstein).
- Positional differentiation as pattern formation in reaction-diffusion system with permeable boundaries. Bifurcation analysis // *J. Math. Biol.* – 1981. – V. 11. – P. 295–310 (with M.A. Livshitz, G.T. Guria, M.V. Volkenstein)).
- Спонтанное возникновение элементов формы в клеточных пластах с упругими свойствами // *Биофизика.* – 1982. – Т. 27, вып. 2. – С. 293–296 (совместно с М.А. Лившицем, М.В. Волькенштейном).
- Кинетическое определение констант связывания РНК-полимеразы *Esherichia coli* с ДНК фага T7 // *Молекуляр. биология.* – 1982. – Т. 16. – С. 156–159 (совместно с С.К. Заврневым, М.Ф. Шемякиным).
- Природа низкой кооперативности плавления кольцевых замкнутых молекул ДНК / Тезисы Всесоюзного биофизического съезда 1982. – М., 1982. – Т. 1. – С. 75 (совместно с А.В. Гагуа).
- Множественные диссипативные структуры в реакционно-диффузионных системах и эмбриологических полях / Тезисы пленарных докладов Всесоюзного биофизического съезда. 1982. – М., 1982. – С. 99 (совместно с М.А. Лившицем).
- Диссипативные структуры и проблема биологического формообразования // *Успехи физ. наук.* – 1983. – Т. 141, вып. 1. – С. 55–101.
- Диссипативные структуры и проблема биологического формообразования // *Синергетика.* – Таллинн: Валгус, 1983. – С. 108–115 (совместно с М.А. Лившицем).
- Влияние топологических ограничений на кооперативность внутреннего плавления кольцевых молекул ДНК // *Синергетика.* – Таллинн: Валгус, 1983. – С. 101–104.
- Self-organization in Ontogeny // *General Biophysics.* Vol. 2. – Acad. Press, P. 284–291.
- Физическая интерпретация процессов формообразования псевдоплазмодия / Докл. АН СССР. – 1984. – Т. 277, № 4. – С. 987–991 (совместно с И.Д. Юдиным, М.А. Лившицем, М.И. Тальянским, М.В. Волькенштейном).
- Пространственная самоорганизация в развитии *Dictyostelium discoideum* // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* – 1984. – № 6. – С. 923–932.
- The spatial form self-organization in the development of *Dictyostelium discoideum* // *J. Theor. Biol.* – 1984. – V. 108. – P. 123–129.
- Collective phenomena in the multi-cellular development of *Dictyostelium discoideum* // *Self-Organization. Autowaves and Structure far from equilibrium* / Ed. V.I. Krinsky. – B.; L.; N.Y.: Springer, 1984. – P. 209–213.
- Упругие натяжения в эмбриональном материале как фактор его самоорганизации // Докл. АН СССР. – 1985. – Т. 381, № 3. – С. 708–711 (совм. с Л.В. Белоусовым, А.Г. Зарайским, М.В. Волькенштейном).
- Возникновение автоволновых режимов при агрегации *Dictyostelium discoideum* // *Биофизика.* – 1985. – Т. 30, вып. 2. – С. 341–346 (совместно с И.Д. Юдиным, А.Б. Константиновым).
- Возникновение коллективного поведения у миксомицет *Dictyostelium discoideum* // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* – 1985. – № 3. – С. 352–361 (совместно с И.Д. Юдиным).
- Физический механизм, определяющий пространственную организацию при эпителиальном формообразовании // *Биофизика.* – 1985. – Т. 30, вып. 5. – С. 888–893 (совместно с Д. Савич).
- Формирование основного плана строения в раннем развитии насекомых. I. Краткий обзор // *Онтогенез.* – 1985. – Т. 16, № 2. – С. 99–106.
- Формирование основного плана строения в раннем развитии насекомых. II. Теоретическая модель // *Онтогенез.* – 1985. – Т. 16, № 2. – С. 107–117.
- Макроскопический контроль дифференцировки в псевдоплазмодии *Dictyostelium discoideum* // Докл. АН СССР. – 1985. – Т. 285. – С. 470–474 (совместно с И.Д. Юдиным, М.В. Волькенштейном).
- Модель эпителиальных морфогенезов на основе упругих сил и контактной поляризации клеток. I // *Онтогенез.* – 1985. – Т. 16, № 1. – С. 5–14 (совместно с Л.В. Белоусовым, А.Г. Зарайским).
- Модель эпителиальных морфогенезов на основе упругих сил и контактной поляризации клеток. II. Биологические следствия // *Онтогенез.* – 1985. – Т. 16, № 2. – С. 437–449 (совместно с Л.В. Белоусовым, А.Г. Зарайским). Элементарные про-

- цессы формирования надклеточной организации при морфогенезе // Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. докт. физ.-мат. наук. — М., 1986.
- Model of pattern formation in epithelial morphogenesis // J. Theor. Biol. — 1987. — V. 129. — P. 369–394 (with L.V. Belousov, A.G. Zaisky).
- Динамика рельефа клеточной поверхности // Коллективная динамика возбуждений и структурообразование в биологических тканях. — Горький, 1987.
- Клеточная адгезия. Физические факторы, определяющие взаимодействие клетки с субстратом // Биол. мембраны. — 1988. — Т. 5, № 10. — С. 1100–1107.
- Почему процесс плавления сверхспиральных ДНК столь некооперативен? // Молекуляр. биология. — 1989. — Т. 23. — С. 52–60 (совместно с А.В. Гагуа).
- Самоорганизация в развитии зародыша // Природа. — 1989. — № 2. — С. 81–89.
- Волны на клеточной поверхности // Биофизика. — 1990. — Т. 35, № 2. — С. 307–311 (совместно с М. Барановым).
- О природе ростовых пульсаций в развитии гидроидов // Мат. моделир. — 1990 (совместно с Ю.А. Лабасом).
- “Полевые” черты в морфогенезе и механохимическая активность клеток // Нелинейные волны. Динамика и эволюция / Под ред. А.В. Гапонова-Грехова и М.И. Рабиновича. — М.: Наука, 1989. — С. 303–316.

Научное издание

БЕЛИНЦЕВ Борис Николаевич

**ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
БИОЛОГИЧЕСКОГО ФОРМООБРАЗОВАНИЯ**

Серия "Физика жизненных процессов", выпуск 12

Заведующий редакцией *Н.А. Носова*

Редактор *Л.П. Русакова*

Младший редактор *Е.Б. Тихонова*

Художественный редактор *Т.Н. Кольченко*

Технические редакторы *О.Б. Черняк, М.И. Мешкова*

Корректоры *Н.П. Круглова, Т.А. Печко*

Набор осуществлен в издательстве
на наборно-печатающих автоматах

ИБ № 41199

Сдано в набор 11.10.90. Подписано к печати 24.12.90

Формат 60 × 90 /16. Бумага типографская № 1

Гарнитура Пресс-Роман. Печать офсетная Усл.печ.л. 16,0

Усл.кр.-отт. 16,0. Уч.-изд.л. 18,75. Тираж 2450 экз.

Тип.зак. **1448** . Цена 4 руб.

Ордена Трудового Красного Знамени
издательство "Наука"

Главная редакция физико-математической литературы
117071 Москва В-71, Ленинский проспект, 15

2-я типография изд. "Наука"

121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6.