

УДК 576.356.5:636.934.57:591.3

ЕСТЕСТВЕННЫЙ МУТАЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС КАК ВОЗМОЖНЫЙ ПРИЧИННЫЙ ФАКТОР ВОЗНИКНОВЕНИЯ ОБЛИГАТНОЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ДИАПАУЗЫ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ (ГИПОТЕЗА)

© 2012 г. Г.К. Исакова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: isakova@math.nsc.ru, isakova@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 22 марта 2012 г. Принята к публикации 22 апреля 2012 г.

Явление облигатной эмбриональной диапаузы (задержанной имплантации) у млекопитающих было открыто более 150 лет назад, однако до сих пор нет четкого представления об его происхождении и биологическом значении. На основании анализа имеющихся данных цитогенетики, эмбриологии, эволюционной морфологии и эволюционной экологии предполагается, что облигатная эмбриональная диапауза могла возникать у отдельных особей в пределах разных таксономических групп вследствие хромосомной мутации, вызванной изменением во внешней среде и затрагивающей экспрессию генов, контролирующих тайминг эмбриогенеза.

Ключевые слова: млекопитающие, облигатная эмбриональная диапауза, задержанная имплантация, происхождение и биологическое значение облигатной диапаузы.

Памяти академика Д.К. Беляева посвящается

Явление облигатной эмбриональной диапаузы (задержанной имплантации) у млекопитающих состоит в том, что зародыши прикрепляются к стенке матки не сразу после их перехода из яйцевода в полость матки. Достигнув стадии бластоцисты, они остаются свободно плавающими на срок от нескольких дней до 10 месяцев в зависимости от вида животного. Впервые задержка имплантации на длительный срок была замечена в 1854 г. у косули (цит. по: Hansson, 1947). В настоящее время известно, что это свойство эмбриогенеза присуще по крайней мере 53 видам животных из 7 отрядов и 10 семейств. Больше всего видов с диапаузой обнаружено в отряде хищных (Carnivora) – в семействе куньих (Mustelidae), к которому относятся куница, норка, соболь, хорь, скунс, выдра и др. Свойства диапаузы (ее продолжительность, гормональный контроль и др.) отличаются у видов в пределах семейств, подсемейств и родов (Mead, 1989; Sandell, 1990).

Существует множество гипотез о происхождении и биологическом значении облигатной диапаузы. Суть всех гипотез состоит в обосновании единого представления о том, что задержка имплантации – это репродуктивная стратегия вида, направленная на отсрочку рождения потомства до сезона, наиболее благоприятного для его выживания. Предполагается также, что диапауза возникала один или несколько раз в прошлые геологические периоды из-за резкого изменения климата и что она эволюционирует (Mead, 1989; Sandell, 1990; Ferguson *et al.*, 1996; Renfree, Shaw, 2000; Thom *et al.*, 2004). Однако четкого представления о механизме возникновения этого свойства онтогенеза, так же, как и его предполагаемой эволюции, до сих пор нет. Не вполне убедительными также кажутся аргументы в пользу прямой связи между сезонной диапаузой и видовой адаптацией. В природе существуют такие виды животных, как морская выдра *Enhydra lutris*, которая имеет облигатную

диапаузу, но может дать потомство в любое время года. В связи с этим Р. Мид предположил, что диапауза могла иметь адаптивное значение в прошлом, но в настоящее время она существует как свойство, нейтральное для существования вида (Mead, 1989).

Имеется довольно много данных об активности репродуктивной системы матери во время облигатной диапаузы (Hansson, 1947; Mead, 1995; Renfree, Shaw, 2000). Однако об активности эмбрионального генома известно крайне мало. Было установлено, что в течение диапаузы бластоцисты увеличиваются приблизительно от 0,25 до 2 мм в диаметре. Изучение гистологических срезов нескольких бластоцист начального периода диапаузы у соболя, норки, морского котика и алтайского крота показало угнетение митоза и отсутствие заметных морфологических изменений в зародышах по мере их роста. Подсчет клеток в нескольких ранних зародышах соболя и норки из-за его высокой вариабельности не позволил выяснить, увеличивается ли число клеток во время диапаузы. В бластоцистах некоторых других видов было отмечено медленное увеличение числа клеток трофобласта, но число клеток собственно зародыша (внутренней клеточной массы, ВКМ) было неизменным. Авторадиографическое изучение синтеза ДНК и РНК на тотальных препаратах бластоцист морского котика и норки показало слабое включение метки (Mead, 1989). На основании этих немногочисленных и не вполне убедительных данных было принято считать облигатную эмбриональную диапаузу стадией эмбрионального покоя.

Для того чтобы уточнить данные о состоянии эмбриогенеза во время диапаузы, мы применили цитогенетический подход. На суспензионных монослойных препаратах, приготовленных по специально разработанному методу для бластоцист куньих, мы изучили активность генома у зародышей норки *Mustela vison*, имеющей диапаузу длительностью в среднем 20 дней, в течение всего этого периода, т. е. от начала диапаузы до начала имплантации. Было установлено, что за это время диаметр бластоцист увеличивается от 0,25 до 2 мм, а число клеток в них – от ~200 до ~20 тыс. В клетках ВКМ угнетены митоз и синтез нуклеиновых кислот. В клетках трофобласта тоже подавлен митоз, но идет синтез

ДНК и рРНК, образование крупных эндополиплоидных клеточных ядер и деление некоторых из них немитотическим (амитотическим) путем (Исакова, Жоголева, 1997; Исакова и др., 2001; Исакова, Шилова, 2000, 2003). Такую же картину (т. е. инактивацию генома в клетках ВКМ, но синтез ДНК и рРНК и амитотическое деление крупных клеток трофобласта) мы обнаружили в диапаузных бластоцистах соболя *Martes zibellina* и западного пятнистого скунса *Spilogale putorius latifrons*, относящихся к другим родам семейства куньих и имеющих диапаузу длительностью в среднем 245 и 220 дней соответственно (Исакова, 2004; Isakova, Mead, 2004). Эти данные, а также сообщения о наблюдавшихся угнетении митоза и образовании гигантских клеток трофобласта в диапаузных бластоцистах косули *Capreolus capreolus* (Aitken, 1974) и алтайского крота *Talpa altaica* (Баевский, 1967), относящихся к другим семействам млекопитающих, позволяют полагать, что в основе возникновения облигатной диапаузы мог лежать механизм, общий для разных таксонов.

В бластоцистах животных без облигатной диапаузы клетки трофобласта делятся митозом. Мы установили, что у лабораторной мыши *Mus musculus*, не имеющей облигатной диапаузы и амитоза в доимплантационных бластоцистах, тоже происходит амитотическое деление клеток трофобласта, но начиная с перимплантационной стадии (Исакова, Скворцова, 2003). Из этих данных следует, что явление облигатной диапаузы состоит не только в задержке имплантации, но и во временном сдвиге всех событий (тайминге) эмбриогенеза.

Как мог произойти этот сдвиг? Поскольку облигатная диапауза – наследуемое видовое свойство, то ее возникновение должно быть связано с изменением в ДНК животного предкового вида. Есть основание полагать, что одним из таких изменений могла быть хромосомная мутация. Известно, что доминирующим механизмом эволюционной реорганизации кариотипа у млекопитающих является Робертсоновская транслокация, т. е. разрыв в районе центромер и последующее слияние двух акроцентрических хромосом (Searle, 1998; Rieseberg, 2001). Это верно и в отношении семейства куньих (Wurster, Benirschke, 1968; Hsu, Mead, 1969; Mandahl, Fredga, 1980). Хромосомные перестройки со-

проводятся изменениями в локализации и количестве гетерохроматина (ГХ) (Mandahl, Fredga, 1980; Wayne *et al.*, 1987; Graphodatsky, 1989). Изменения в паттерне ГХ в свою очередь могут вызвать изменения в экспрессии генов в пределах всего генома (Прокофьева-Бельговская, 1986; Жимулев, 1993; Zhimulev, 1998). Таким образом, хромосомная перестройка через изменение в паттерне ГХ может вызвать изменение в экспрессии генов, контролирующих тайминг эмбриогенеза. В таком случае должен возникнуть новый наследуемый вариант тайминга.

В настоящее время складывается представление, что изменения в ГХ и в хронологии эмбриогенеза лежат в основе эволюционных преобразований (Gould, 1982; Raff, Kaufman, 1983; Creighton, Strauss, 1986; Graphodatsky, 1989; Стегний, 1993; Gilbert *et al.*, 1996; Корочкин, 2002а, б). В обширных исследованиях природных популяций животных было обнаружено, что появление потомков с новыми наследуемыми морфофизиологическими свойствами связано со сдвигом в тайминге эмбриогенеза. Естественный отбор, действующий не только в постнатальном, но и в эмбриональном периодах, ведет к возникновению субпопуляции особей, имеющих селективное преимущество в новых условиях внешней среды, т. е. к внутривидовой дивергенции (Schwarz, 1977; Шварц, 1980).

Таким образом, данные эмбриологии, цитогенетики, эволюционной морфологии и эволюционной экологии позволяют сформулировать следующую гипотезу о происхождении и биологическом значении явления облигатной эмбриональной диапаузы. В кариотипе животного вида-предшественника может произойти хромосомная перестройка, затрагивающая экспрессию генов, контролирующих тайминг эмбриогенеза. Результатом этого события должно быть возникновение наследуемого изменения в этом тайминге. Изменения в структуре ДНК и в тайминге эмбриогенеза вызовут увеличение соответственно генетического и морфофизиологического разнообразия в потомстве, а естественный отбор приведет к внутривидовой дивергенции.

Данная гипотеза о мутагенном происхождении облигатной диапаузы поддерживается следующими фактами. 1. Задержка не только имплантации, но и других событий онтогене-

тического развития. У норки (Hansson, 1947), соболя, куницы (Старков, 1947) и горностая (Hansson, 1947; Терновский, Терновская, 1994) обнаружен значительный сдвиг во времени овуляции и полового созревания самок по сравнению с видами куньих без диапаузы. 2. Чрезвычайно высокий уровень генетического разнообразия на хромосомном уровне у норки. В наших кариологических исследованиях ~ 15 % имплантированных эмбрионов имело хромосомную конституцию $3n$, $2n/3n$, или $2n,XX/2n,XY$ и ~10 % новорожденных щенков были химерами $2n/3n$ или $2n,XX/2n,XY$ (Belyaev, Isakova, 1984; Исакова, 1987; Isakova, 1989). Кроме того, с частотой до 4,5 % встречались монохориальные (считающиеся монозиготными) пары эмбрионов, имевших разные кариотипы (Исакова, 2007). В литературе имеются только единичные сообщения как об эуплоидных химерах, так и о генетически неидентичных монозиготных близнецах у млекопитающих. Анализ ожидаемых и наблюдаемых частот встречаемости химер $2n/3n$ с разными сочетаниями половых хромосом в $2n$ и $3n$ клеточных линиях при различных возможных нарушениях процесса оплодотворения у норки *Mustela vison* и курицы *Gallus domesticus* показал, что основной причиной возникновения эуплоидного химеризма являются нарушения процесса оплодотворения (дигиния и полиспермия) (Fechheimer *et al.*, 1983; Фечхеймер и др., 1984). Ранее было показано, что причиной этих нарушений является задержка овуляции, которая ведет к перезреванию яйцеклеток и изменению свойств их мембран (Beatty, 1957). 3. Высокая частота встречаемости эмбрионов с морфологическими аномалиями у норки. В сотрудничестве с А.П. Дыбаном и его сотрудниками мы провели морфологический анализ 50 имплантированных эмбрионов норки. Четыре из них (8 %) имели нарушения в развитии, что превышает частоту встречаемости эмбрионов с морфологическими аномалиями у лабораторной мыши по меньшей мере в 10 раз. 4. Чрезвычайно высокий уровень разнообразия по антигенам сывороточных белков у видов животных, имеющих облигатную диапаузу по сравнению с видами без диапаузы в семействе куньих (Баранов, 1987; Baranov, 1988).

В предлагаемом сценарии возникновения стадии эмбриональной диапаузы недостает све-

дений о естественных факторах, вызывающих перестройки в кариотипе. Зоологи и палеонтологи все больше находят свидетельств тому, что ведущим фактором биологической эволюции на Земле являются экологические катастрофы, вызванные тектоническими и температурными перестройками (Красилов, 1977; Черепанов, 1986; Kanygin, 2008; Каныгин, Розанов, 2008). Генетики накапливают данные о том, что смена условий внешней среды может индуцировать генные и хромосомные мутации через изменение в гормональной системе организма (Сапунов, 1980). Показано, что вновь возникающие агенты внешней среды (промышленные химикаты, попадающие в воздух и продукты питания) могут влиять на экспрессию генома, вызывая молекулярный драйв в мультигенных семействах (Dover, 1986; Nebert, Carvan, 1997). Итак, полный сценарий эволюционного процесса мог быть таким: изменение внешней среды (изменение в самой среде или смена животными места обитания) → хромосомная мутация, вызывающая изменение тайминга эмбриогенеза → повышение генетического и морфофизиологического разнообразия в потомстве → естественный отбор → внутривидовая дивергенция → видообразование.

Следует заметить, что пути влияния хромосомных перестроек на экспрессию генов, контролирующих тайминг эмбриогенеза, должны отличаться у разных видов животных из-за различий в организации их кариотипов и геномов. Из этого следует, что реорганизация генома, затрагивающая генетический контроль тайминга эмбриогенеза, могла быть механизмом, лежащим в основе возникновения того огромного разнообразия в проявлении эмбриональной диапаузы и физиологии репродукции, которое существует в природе.

Благодарности

Исследования, на основании результатов которых была сформулирована данная гипотеза, были поддержаны РФФИ (94-04-12652, 96-04-50152, 00-04-49484, Мас 01-04-06510) и НИИ (HD 34247). Автор благодарен профессору Р.А. Миду (R.A. Mead) за сотрудничество и конструктивное обсуждение проблемы явления задержанной имплантации.

Литература

- Баевский Ю.Б. Цито- и кариометрические исследования бластоцист крота (*Talpa altaica*) периода диапаузы // Докл. АН СССР. 1967. Т. 176. № 5. С. 1198–1200.
- Баранов О.К. Иммуногенетические системы норки: проблемы эволюции // Генетика. 1987. Т. 23. С. 1026–1037.
- Жимулев И.Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука, 1993. 490 с.
- Исакова Г.К. Об активности эмбрионального генома соболя на стадии задержанной имплантации (цитогенетическое исследование) // Докл. АН. 2004. Т. 397. С. 128–130.
- Исакова Г.К. Цитогенетические исследования американской норки (*Mustela vison*), разводимой в условиях звероводческих хозяйств // Генетика. 1987. Т. 23. № 6. С. 1007–1013.
- Исакова Г.К. Три типа близнецовости в эмбриогенезе у норки (*Mustela vison*) // Генетика. 2007. Т. 43. № 2. С. 280–283.
- Исакова Г.К., Жоголева Н.Н. Активность эмбрионального генома норки во время диапаузы (цитогенетический анализ). Число клеток и размер клеточных ядер в бластоцистах разного размера и возраста // Генетика. 1997. Т. 33. С. 822–830.
- Исакова Г.К., Захаренко Л.П., Абрамова М.П. Активность эмбрионального генома норки во время диапаузы (цитогенетический анализ). Ядрышкоковый и внеядрышкоковый синтез РНК // Онтогенез. 2001. Т. 32. С. 302–308.
- Исакова Г.К., Скворцова Т.Э. Механизмы и частота деления ядер клеток трофобласта и децидуа в течение постимплантационного эмбриогенеза у мыши // Онтогенез. 2003. Т. 34. С. 472–477.
- Исакова Г.К., Шилова И.Э. Размножение «почкованием» клеток трофобласта в имплантирующихся бластоцистах норки // Докл. АН. 2000. Т. 371. С. 129–131.
- Исакова Г.К., Шилова И.Э. Соотношение частот двух форм амитотического деления ядер клеток трофобласта в бластоцистах норки в течение периода задержанной имплантации // Изв. РАН. Сер. биол. 2003. № 4. С. 395–398.
- Каныгин А.В., Розанов А.Ю. Козволюция абиотических и биотических событий // Происхождение и эволюция биосферы: важнейшие результаты 2004–2007 гг. / Ред. Н. Добрецов и др. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2008. С. 86–119.
- Красилов В.А. Эволюция и биостратиграфия. М.: Наука, 1977. 256 с.
- Корочкин Л.И. Онтогенез, эволюция и гены // Природа. 2002а. № 7. С. 10–19.
- Корочкин Л.И. Связь онто- и филогенеза в генетическом освещении. Проблема макромутаций (морфологический и молекулярный аспекты) // Генетика. 2002б. Т. 38. С. 727–738.
- Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. М.: Наука, 1986. 431 с.
- Сапунов В.Б. О роли эндокринной системы в процессе возникновения мутаций // Журн. общ. биологии. 1980. Т. 41. С. 192–199.
- Старков И.Д. Биология и разведение соболей и куниц. М.: Междунар. книга, 1947. 92 с.

- Стегний В.Н. Архитектура генома. Системные мутации и эволюция. Новосибирск: Изд-во НГУ, 1993. 110 с.
- Терновский Д.В., Терновская Ю.Г. Экология куницеобразных. Новосибирск: Наука, 1994. 222 с.
- Фечхеймер Н.С., Исакова Г.К., Беляев Д.К. Механизмы спонтанного возникновения диплоид-триплоидного химеризма у норок и кур // Генетика. 1984. Т. 20. С. 2048–2055.
- Черепанов В.В. Эволюционная изменчивость водных и наземных животных. Новосибирск: Наука, 1986. 239 с.
- Шварц С.С. Экологические закономерности эволюции. М.: Наука, 1980. 278 с.
- Aitken R.J. Delayed implantation in roe deer (*Capreolus capreolus*) // J. Reprod. Fert. 1974. V. 39. P. 225–234.
- Baranov O.K. The organization and evolution of the immunogenetic systems in the American mink // J. Anim. Breed. Genet. 1988. V. 105. P. 91–102.
- Beatty R.A. Parthenogenesis and Polyploidy in Mammalian Development. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1957.
- Belyaev D.K., Isakova G.K. Spontaneous chimaeras at the early postnatal period in mink // Proc. 3rd Int. Sci. Congr. Fur Anim. Prod. Versailles, 1984. V. 2. P. 1–7.
- Creighton G.K., Strauss R.E. Comparative patterns of growth and development in cricetine rodents and the evolution of ontogeny // Evolution. 1986. V. 40. P. 94–106.
- Dover G.A. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated // Trends Genet. 1986. V. 2. P. 159–162.
- Fechheimer N.S., Isakova G.K., Belyaev D.K. Mechanisms involved in the spontaneous occurrence of diploid-triploid chimerism in the mink (*Mustela vison*) and chicken (*Gallus domesticus*) // Cytogenet. Cell Genet. 1983. V. 35. P. 238–243.
- Ferguson S.H., Virgil J.A., Larivière S. Evolution of delayed implantation and associated grade shifts in life history traits of North American carnivores // Ecoscience. 1996. V. 3. P. 7–17.
- Gilbert S.F., Opitz D.M., Raff R.A. Resynthesizing evolutionary and developmental biology // Dev. Biology. 1996. V. 173. P. 357–372.
- Gould S.J. Change in developmental timing as a mechanism of macroevolution // Evolution and Development / Ed. J.T. Bonner. Berlin, Heidelberg. N.Y.: Springer-Verlag, 1982. P. 333–346.
- Graphodatsky A.S. Conserved and variable elements of mammalian chromosomes / Ed. C.R.E. Halnan Oxon. Willingford: CAB Intern., 1989. P. 95–123.
- Hansson A. The physiology of reproduction in mink (*Mustela vison*, Schreb.) with special reference to delayed implantation // Acta Zool. 1947. V. 28. P. 1–136.
- Hsu T.C., Mead R.A. Mechanisms of chromosomal changes in mammalian speciation // Comparative Mammalian Cytogenetics / Ed. K. Benirschke. N.Y.: Springer-Verlag, 1969. P. 9–17.
- Isakova G.K. Cytogenetics of domestic mink (*Mustela vison*) // Cytogenetics of Animals / Ed. C.R.E. Halnan. Oxon/Willingford: CAB Intern., 1989. P. 133–149.
- Isakova G.K., Mead R.A. Occurrence of amitotic division of trophoblast cell nuclei in blastocysts of the western spotted skunk (*Spilogale putorius latifrons*) // Hereditas. 2004. V. 104. P. 177–184.
- Kanygin A.V. Ecological revolution through Ordovician biosphere (495 to 435 Ma ages): start of the coherent life evolution // Biosphere Origin and Evolution / Eds N. Dobretsov *et al.* Berlin; Heidelberg; N.Y.: Springer, 2008. P. 245–254.
- Mandahl N., Fredga K. A comparative chromosome study by means of G-, C-, and NOR-banding of the weasel, the pygmy weasel and the stoat (*Mustela*, Carnivora, Mammalia) // Hereditas. 1980. V. 93. P. 75–83.
- Mead R.A. The physiology and evolution of delayed implantation in carnivores // Carnivore Behavior, Ecology, and Evolution / Ed. J.L. Gittleman. N.Y.: Cornell Univ. Press, 1989. P. 437–464.
- Mead R.A. Hormonal control of implantation in some carnivores // Molecular and Cellular Aspects of Periimplantation Processes / Ed. S.K. Dey. N.Y.: Springer-Verlag, 1995. P. 168–182.
- Nebert D.W., Carvan M.J. Ecogenetics: from ecology to health // Toxicology and Industrial Health. 1997. V. 13. No. 2/3. P. 167–192.
- Raff R.A., Kaufman T.C. Timing of developmental events: evolution through heterochrony // Embryos, Genes, and Evolution. N.Y., London: Macmillan Publ. Co., Inc. (New York); Collier Macmillan Publ. (London), 1983. P. 173–198.
- Renfree M.B., Shaw G. Diapause // Annu. Rev. Physiol. 2000. V. 62. P. 353–375.
- Rieseberg L.H. Chromosomal rearrangements and speciation // Trends Ecol. Evol. 2001. V. 16. P. 351–358.
- Sandell M. The evolution of seasonal delayed implantation // Quart. Rev. Biol. 1990. V. 65. P. 23–42.
- Schwarz S.S. The evolutionary ecology of animals. N.Y., London: Consultants Bureau, 1977. 292 p.
- Searle J.B. Speciation, Chromosomes, and Genomes // Genome Res. 1998. V. 8. P. 1–3.
- Thom M.D., Johnson D.P., Macdonald D.M. The evolution and maintenance of delayed implantation in the Mustelidae (Mammalia: Carnivora) // Evolution. 2004. V. 58. P. 175–183.
- Wayne R.K., Nash W.G., O'Brien S.J. Chromosomal evolution of the Canidae // Cytogenet. Cell Genet. 1987. V. 44. P. 123–141.
- Wurster D.H., Benirschke K. Comparative cytogenetic studies in order Carnivora // Chromosoma (Berl.). 1968. V. 24. P. 336–382.
- Zhimulev I.F. Polytene chromosomes, heterochromatin, and position effect variegation // Adv. Genetics. 1998. V. 37. 566 p.

**NATURAL MUTAGENESIS AS A POSSIBLE CAUSAL FACTOR
FOR OCCURRENCE OF OBLIGATE EMBRYONIC DIAPAUSE IN MAMMALS
(A HYPOTHESIS)**

G.K. Isakova

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: isakova@math.nsc.ru, isakova@bionet.nsc.ru

Summary

The phenomenon of obligate embryonic diapause (delayed implantation) in mammals has been discovered more than 150 years ago. Nevertheless, there is not the distinct idea on its origin and biological significance till now. Available data of cytogenetics, embryology, evolutionary morphology, and evolutionary ecology allow to believe that the obligatory stage of embryonic diapause might occur in single individuals within different taxonomic groups in consequence of chromosome mutation caused by alteration in the environment and affected the expression of genes controlling the timing of embryogenesis.

Key words: mammals, obligate embryonic diapause, delayed implantation, origin and biologic significance of obligate diapause.