

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Челябинский государственный университет»

К. А. Корляков

**Возникновение жизни
и способы
её искусственного получения**

Монография

Челябинск
Издательство Челябинского государственного университета
2025

УДК 573
ББК Е018

К668

Корляков, К. А.

К668 Возникновение жизни и способы её искусственного получения : монография / К. А. Корляков. — Челябинск : Изд-во Челяб. гос. ун-та, 2025. — 219 с., 10 л. цв. ил.

ISBN 978-5-7271-2116-0

В рамках современных представлений о глобальной среде Земли проанализирована проблема возникновения жизни, включая влияние формирующейся Луны, находившейся на существенно меньшем расстоянии от планеты по сравнению с её нынешней орбитой. Автором предложены собственные теоретические разработки, интегрирующие современные данные о функциональных возможностях РНК, включая модели клеточной оболочки на основе РНК-молекул и проторибосом, которые реализуют ядерные функции протоклеток и осуществляют сопряжённый синтез с пептидами и белками. Также рассмотрены вопросы о количестве и объёме до-нуклеиновых молекул — углеводов, формамидов и нуклеотидов. Представлена концепция мира нуклеотидов. Большое внимание уделено влиянию фактора раздела фаз среды — формированию мира нуклеотидов и мира РНК на поверхностной плёнке воды и поверхности минералов. Представлена модель соответствующей микросреды — золь-геосферы и мира фибриллярных минералов. В разделе про биологическое получение искусственных биологических молекул и молекулярных комплексов коротко приведены стандартные и нестандартные пути синтеза и представлены авторские методы исследований на плёнках воды. Рассмотрены методы и результаты работы с нитчатыми, фибриллярными молекулами. Приведён обзор приборной базы и представлена собственная модель прибора — климатического биореактора для изучения абиогенеза. В работе произведена попытка не столько энциклопедического описания основных методов получения биологических молекул, сколько приведение методов получения необходимой среды и методологических подходов для более комплексных системных исследований, направленных на получение более разнообразных биологических систем и их аналогов. Обсуждаются пути и направлении получения новой материи, аналогичной биоте и материи, организованной на других принципах.

Ил. 73, табл. 4. Библиогр. — 214 назв.

УДК 573.5
ББК Е018

ISBN 978-5-7271-2116-0

© Корляков К. А., 2025

© Челябинский государственный университет, 2025

Научное издание

Корректурa и вёрстка *М. В. Трифионовой*. Дизайн обложки *С. С. Фельдман*

Подписано в печать 08.12.25. Формат 60×84 ¹/₁₆. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 12,8. Уч.-изд. л. 12,0. Тираж 500 экз. Заказ 778

Челябинский государственный университет, 454001 Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129
Отпечатано в издательстве Челябинского государственного университета
454021 Челябинск, ул. Молодогвардейцев, 576

*100-летию работы
А. И. Опарина «Происхождение жизни» (1924)
посвящается*

Оглавление

Краткая история проблемы происхождения жизни	6
Глава 1. Возникновение жизни	17
1.1. Лунный поляризатор и гравитация	17
1.2. Золь-геосфера	20
1.3. Фибриллярная форма организации среды и материи и метеоритная бомбардировка	22
1.4. Плотность геосферы	29
1.5. Магнитное поле	30
1.6. Неравновесные балансы	32
1.7. Дискретность самоорганизации	36
1.8. Континуальная и дискретная организация среды	38
1.9. Дуальные стратегии и необратимость организации	40
1.10. Мир нуклеотидов	41
1.11. Четырёхбуквенный код	45
1.12. Порфирины	49
1.13. Молекулярная самоорганизация и эволюция	54
1.14. Углеводная среда	58
1.15. Оптимальная и экстремальная среда для первичных биополимеров	60
1.16. Протоядро	62
1.17. Протомембраны	64
Глава 2. Методы искусственного получения биологических молекул и протобионтов	67
2.1. Получение липидов и липидных сред	67
2.1.1. Получение липидов	67
2.1.2. Метод плёнок	68
2.1.3. Метод пены	72
2.1.4. Минералы на плёнке воды	73
2.1.5. Липиды в молекулярной биологии	76
2.2. Получение углеводов и углеводных сред	78
2.2.1. Получение углеводов	78
2.2.2. Получение специфических сред из полисахаридов	82
2.3. Получение аминокислот, пептидов и белковых сред	87
2.3.1. Получение аминокислот	87
2.3.2. Внеклеточный синтез белка	88

2.4. Получение азотистых оснований и нуклеотидов	90
2.4.1. Полимеризация нуклеотидов — получение биологических полимеров нуклеиновых кислот	97
2.4.2. Твёрдые среды. Получение полимеров нуклеиновых кислот на минеральных матриксах	98
2.4.3. Минералы, используемые в качестве катализаторов	106
2.5. Метод молекулярных колоний	113
2.5.1. Основные свойства нанокolonий	116
2.5.2. Рекомбинация РНК в бесклеточной системе	118
2.5.3. Техника смены матриц для рекомбинации РНК	121
2.5.4. Спонтанная, межмолекулярная и внутримолекулярная рекомбинация РНК	122
2.5.5. Нерепликативная и репликативная рекомбинация РНК	126
2.5.6. Применение нанокolonий в химии одиночных молекул	132
2.5.7. Колонии ДНК	133
2.5.8. Методы обнаружения нанокolonий	134
2.5.9. Перспективы развития метода молекулярных колоний . .	139
2.5.10. Химический синтез олигонуклеотидов из естественных нуклеиновых кислот	142
2.5.11. Искусственно полученные фрагменты ДНК и РНК и гены	142
2.6. Получение порфиринов	143
2.7. Клеточные оболочки как среда для протобionтов	149
2.8. Автоколебательные и проточные среды	154
2.9. Гидродинамическая среда	162
2.10. Получение петель, узлов, клубков, катушек из полимеров, фибриллярных и нитчатых молекул	171
2.11. Приборы	182
Глава 3. О создании новых форм жизни	
на других принципах и иной материальной основе	194
Список литературы	208

Краткая история проблемы происхождения жизни

Первая экспериментально обоснованная теория возникновения жизни была сформулирована А. И. Опариным в 1924 г. и известна как теория Опарина — Холдейна или коацерватная теория [75; 76]. До этой теории в работах Л. Пастера и его предшественников была доказана невозможность самовозникновения или самозарождения жизни. Основой для разработки коацерватной теории послужили полученные А. И. Опариным из первичного бульона коацерватные капли ещё неопределённого на молекулярном уровне органического состава. Согласно данной теории под действием ультрафиолетового излучения и электрических разрядов происходили агрегация молекул, содержащих углерод, и их дальнейший распад в ходе волновых прибоев в воде и последующая самосборка, что в дальнейшем привело к возникновению клеточной жизни. Несколькоими годами позже, в 1928 г., А. А. Богдановым (Малиновским) (1925–1929) в работах по тектологии были сформулированы некоторые начала теории самоорганизации живых систем посредством неравновесных процессов, позже более детально описанные применительно к биологии Э. С. Бауэром (1935), Л. Озангером (1931). В том же 1928 г. А. А. Андроновым была разработана теория автоколебаний. Ни теория самоорганизации, ни теория автоволновых процессов не применялись относительно

теории возникновения жизни. В этом же десятилетии получила большой толчок в развитии и теория эволюции в виде основ синтетической теории, заложенной в работах С. С. Четверикова в 1926 г., которая также развивалась отдельно.

В 1950–1960-х гг. в экспериментах С. В. Фокса и С. Миллера были получены протеноиды — микросферы из аминокислот. Данные эксперименты проводились при остывании смеси аминокислот со 140 °С в среде с электрическими разрядами [155]. Вместе с глобулами и микросферами были также получены нити и цепи, фибриллярные формы организации в виде пептидов. И А. И. Опариным и С. В. Фоксом в качестве основ для протобионтов рассматривались белковые молекулы. Начиная с 1950-х гг., после работ Ф. Крика и Д. Уотсона стало понятно, что главными молекулами жизни являются нуклеиновые кислоты с ведущей ролью дезоксирибонуклеиновой кислоты. А с 1970-х гг., после работ Карла Везе (1977), Д. Балтимора и Т. Чека (1970) и открытия мира РНК в прогрессивных научных сообществах укрепилось понимание ведущей роли рибонуклеиновой кислоты во многих процессах развития и поддержания жизни. Параллельно с открытием и описанием многих свойств нуклеиновых кислот в 1960-е гг. С. Понамперума (1963; 1968) и Дж. Оро (1960; 1961) впервые искусственным путём синтезировали аденозиновый нуклеотид. На данные результаты ссылался даже А. И. Опарин уже в 1970-е гг. (1975). Вернувшись на столетие назад, когда в 1860-гг. Л. Пастер проводил эксперименты по невозможности возникновения жизни в ходе самозарождения, А. М. Бутлеров открыл реакцию по синтезу сахаров из формальдегида в щелочных растворах (1861). А несколькими десятилетиями до этого в 1820 г. А. Бракконо синтезировал из аммиака и уксусной кислоты первую аминокислоту — глицин. И только почти через сто лет стали получать первые пептиды, а полноценные белки ещё позже. Также более чем через сто лет после открытия реакции Бутлерова (1861) её стали применять к проблеме возникновения жизни в виде мира сахаров, которую предложил Вебер (1987). Схожая ситуация наблюдалась и в отношении четвёртой важной группы биологических молекул — липидов, первый искусственный синтез которых был реализован ещё в 1854 г., а теория, где ключевой средообразующей молекулой были липиды, появилась также спустя более чем столетие, в работах Г. Майровица (1969; 1985). Искусственный синтез пуринов и нуклеотидов С. Панамперума и Дж. Оро также был реализован спустя

столетие с момента открытия нуклеиновых молекул Ф. Мишером в 1869 г. Таким образом, первый круг замкнулся — от получения и описания первых биологически важных молекул, до выдвижения их в качества главных молекул жизни. Описание основных четырёх нуклеотидов и структуры нуклеиновых кислот в период 1940–1960-х гг. позволило сформулировать концепцию генетического кода и окончательно констатировать три группы основных полимеров жизни — белков, нуклеиновых кислот и сахаров [144]. Казалось, что вся сущность жизни на уровне биологических молекул определена и описана. Но оставалось непонятным, как это всё возникло, и в каких условиях. Но условиям возникновения жизни уделялось меньше внимания, большая часть исследований была направлена в отношении понимания сущности генетического кода.

Расшифровкой генетического кода также занимались физики и математики, начиная от Г. Гамова и заканчивая Е. Куниным [144; 160]. Большая часть исследований касалась особенностей работы генетического кода применительно к эволюции. Расшифровка работы кодонов сопровождалась открытиями новых функций и свойств в молекулах РНК. Параллельно с незаменимыми 20 аминокислотами открывались новые аминокислоты, как считалось, нефункциональные. При этом к проблеме возникновения генетического кода экспериментальным путём подошли только к началу XXI столетия [207; 211]. Стало очевидно, что нуклеиновые кислоты могут работать и с большим количеством нуклеотидов, но хуже, такие системы становятся более нестабильными [211]. Так, и с меньшим количеством, например двумя нуклеотидами, но с данным ограниченным набором хуже образуются рибозимы и трёхмерная организация РНК-полимеров становится более нестабильной — возникает большое разнообразие вариантов сворачивания в шпильчатые структуры [73]. Таким образом, стало понятно, что четырёхбуквенный код является наиболее оптимальным в части ограничений на самоорганизацию и симметрию. «Машина жизни» с четырёхбуквенным нуклеотидным набором становится более выверенной. На данном этапе проблема четырёхбуквенного генетического кода смыкается с термодинамикой — наблюдается преодоление энтропии — излишней неупорядоченности. Вместе с тем многие исследователи до настоящего времени рассматривают причину возникновения генетического кода следствием отбора.

Далее от автоколебательной теории к автоволновым реакциям Белоусова — Жаботинского и концепции гиперцикла — хотя они все развивались изначально независимо друг от друга. В 1950-е гг., после открытия и описания реакции Белоусова — Жаботинского широкое изучение получили автоволновые реакции, которые, как упоминалось ранее, в 1920-е гг. были теоретически обоснованы А. А. Андроновым. В 1970-е гг. М. Эйгеном была сформулирована концепция гиперцикла, которая описывала возможные автокаталитические химические реакции, являющиеся аналогом обмена веществ у живых организмов (1973). М. Эйген сформулировал очередную важную надстройку к абиотической теории возникновения жизни (1983). Казалось, что после его работ катализаторы уже не актуальны, поскольку входят в концепцию гиперцикла. Однако основной проблемой было отсутствие у М. Эйгена опыта получения самих протобиологических молекул, участвующих в реакциях протообмена веществ. В тот же период к схожим с Эйгеном выводам о развитии открытых каталитических систем пришёл в нашей стране и А. П. Руденко [84; 85].

С открытием структуры нуклеиновых кислот и генетического кода научное сообщество, занимающееся проблемами возникновения и происхождения жизни, разбилось на два лагеря. Первая группа постулировала, что первично возникновение генетического кода, на котором стартовала вся эволюция. Вторая группа указывала на первичность обмена веществ — необходим поиск катализаторов. Данный спор, подобный вопросу о том, что сначала — курица или яйцо, продолжался до начала нынешнего столетия [115], пока группа Дж. Сазерленда (2015) не открыла реакции цианосульфатного протометаболизма. После этого стало понятно на экспериментальном уровне, что возможен одновременный путь обоих важных путей развития протоорганизмов. Вместе с тем с 1960–1970-х гг. в одном ряду со спорами и первичности метаболизма или кода развивалась теория мира РНК. Была открыта и позже расшифрована рибосома, рибозимы, различные полиндромы в РНК-молекулах, открыто большое разнообразие молекул РНК вплоть до самых маленьких размеров всего в десяток нуклеотидов. Была выявлена возможность нарушения комплементарности в РНК-молекулах, способность РНК создавать одноцепочечные структуры. Выявлена способность РНК создавать как сложные глобулярные трёхмерные структуры, так и фибриллярные. Обнаружена способность транспортных РНК и транспозонов управлять

и перемещать внутри клеток и органелл другие биологические полимеры. Установлено большее в сравнении с ДНК разнообразие структур РНК-нуклеотидов, содержащих метильные, гидроксильные и карбоксильные группы. Выяснилось, что в энергетике и метаболизме нуклеиновых кислот главными мономерами являются также РНК-нуклеотиды — АТФ, АДФ, ГТФ. В вирусологии также установлена большая активность и разнообразие РНК-вирусов вплоть до вирионов — кольцевых РНК, не имеющих оболочек, что характерно для доклеточного мира. Но главное, что теория мира РНК чётко продемонстрировала возможность одновременных каталитических реакций рибозимами и передачи биологической информации мРНК, тРНК, и рРНК. На сегодняшний день можно констатировать, что РНК является главной молекулой, ответственной за изменчивость, тогда как ДНК является главной молекулой, ответственной на наследственность, если рассматривать нуклеиновые кислоты как функциональные блоки эволюции. Собственно РНК и является молекулой жизни, а ДНК — специальной консервативной молекулой, ответственной за хранение информации. Однако решение проблемы одновременных каталитических реакций и передачи наследственной информации оставляло открытым вопрос о том, откуда появились четыре нуклеотида и РНК-молекулы в такой изобилии, чтобы запустить каталитические системы и обзавестись средой в виде белков, сахаров и липидов, без которых невозможна клеточная жизнь. В связи с этим встал вопрос о среде, в которой жизнь появилась, и о предшественниках нуклеотидам пребиотических (протобиологических) молекул.

Исследования среды, в которой возникали протобионты и нуклеиновые кислоты, были также разбиты на несколько направлений. В отношении абиотической среды в 1980–1990-е гг. были разработаны концепции железо-сульфидного мира, цинкового мира [43; 208]. Данные теории касались долей и концентраций микроэлементов в водной среде, таких как железо, цинк, и других, способных служить катализаторами для биогенного синтеза, в частности, формирования нуклеотидов, нуклеиновых кислот и различного рода каталитических реакций. В отношении органических предшественников нуклеиновых кислот в 2004 г. была предложена теория мира полициклических ароматических углеводородов (мир ПАУ), позже теория мира формамида [189], а также теория формальдегидного мира с синильной кислотой [32; 181]. Данные теории рассматривали различные углеводороды,

в том числе присутствующие в космосе и обнаруживаемые в метеоритах, в качестве исходного субстрата, необходимого для возникновения протобионтов и реакций катализа. Теории состава водной среды, в которой зародилась жизнь, сводились к спорам о морской и пресной воде, где ключевым был вопрос о балансе и динамике микроэлементов. Ведущими теориями до сих пор являются компенсаторные, когда дефицит тех или иных элементов рассматривался в качестве компенсаторного для создания оптимальной среды внутри клеток. Например, считается, что калия было меньше по сравнению с натрием в водной среде, и поэтому он стал доминировать по концентрации внутри клеток организмов по сравнению с натрием. Также магния было в избытке в морской среде по сравнению с кальцием, в связи с чем внутри клеток магний также находится в меньшей концентрации по сравнению с кальцием [101]. Так как с середины прошлого столетия нуклеиновые стали рассматриваться главными молекулами жизни, а аминокислоты рассматривались главными молекулами жизни ещё до открытия нуклеиновых кислот, в последующие годы более пристальное внимание в части возникновения жизни было уделено другим биологическим полимерам — липидам и сахарам. Так, с 1960-х гг. в рамках концепции первичности клетки у живого организма мембрана из липидов рассматривалась, как одна из важнейших органелл [150]. Первичному синтезу протомембран было посвящено большое количество работ начиная от Г. Моравица и заканчивая Дж. Шостаком [101; 153; 165; 174]. Последний даже рассматривал отдельный синтез мембран с последующим захватом нуклеиновых кислот в рамках доклеточной эволюции [165]. К концу 2000-х гг. до настоящего времени стали получать различные компоненты искусственных мембран, от примитивных до включающих необходимые для обмена и транспорта комплексы [132]. Однако Г. Моравицу принадлежит идея первичной среды из липидов так называемого «майонеза», на базе которой возникали другие биологически важные молекулы [174]. Как отмечалось выше, «мир сахаров» был предложен А. Вебером в 1980-е гг. [201]. При этом данная теория включала и наличие углеводов, из которых позже в формамидных и формальдегидных реакциях с цианистым водородом были получены нуклеотиды. Практическое подтверждение эффективности сред из сахаров было получено и в работах А. А. Четверина [112], когда в начале 1990-х гг. стали получать молекулярные колонии, вырастающие на среде

из геля. Следует отметить, что молекулярные колонии из РНК росли на агарных средах в отличие от ДНК-колоний, собирающихся на пептидных субстратах. В экспериментах группы А. А. Четверина также был получен ряд важных особенностей в организации молекул в мире РНК: таких как способность усваивать различные нуклеотиды из среды, способность РНК перестраивать нуклеотидные последовательности и др. В отношении исключительно твёрдой среды в качестве кристаллических матриц минералов, служащих реакционной системой для катализа нуклеиновых кислот, также в начале XXI в. проведено много исследований. Как теоретические выкладки, так и практические эксперименты касались изначально глинистых минералов, позже минералов, включающих в кристаллическую решетку необходимые металлы до возвращения к силикатам, на которых были получены полимеры из полирибонуклеиновых кислот [156]. Основной сложностью до настоящего времени остаётся влияние кристаллических решёток минералов на синтез биополимеров и органелл, а также на их последующую диагностику. В частности, это касается чистоты и достоверности экспериментов, а также подбора оптимальных матриц.

В отношении глобальных сред планетарного уровня, в условиях которых возникала жизнь, существовали также различные подходы. От мирового океана с «первичным бульоном», до геотермальных «чёрных курильщиков» и луж [28; 75; 174]. С развитием знаний об эволюции планеты Земля и с усовершенствованием датировок в палеонтологических методах также становилось всё более очевидным, что первичные представления об океане и лужах в начале формирования Земли были не совсем верны. Во-первых, датировки о времени находок первой жизни всё больше приближались ко времени формирования первого мирового океана при остывании планеты. Причём эти находки касались клеточной жизни. Во вторых открытие ранних метеоритных бомбардировок породило как теории увеличения локальных магнитных очагов, способствующих возникновению протобиологических молекул [41], так и возобновило старые представления о метеоритной «панспермии». Здесь важно отметить, что последняя теория также дала некоторый толчок в решении проблемы: в метеоритах были найдены простые сахара в виде рибозы, простые аминокислоты и их предшественники и упоминаемые выше ароматические углеводороды. Лунный грунт, загрязнённый земными

аминокислотами и порфиринами, наряду с большим количеством исследованной органики в метеоритах, также дал представления о первичных космических протобиологических молекулах. Следует отметить тот факт, что более ускоренная скорость вращения планеты Земля после столкновения с предшественником Луны почти не учитывалась в проблеме возникновения жизни. Но отдельное важное исследование 2010 г. касалось динамики среды: оказалось, что в зависимости от типа перемешивания отбираются и полимеризуются разные по структуре полимеры в супрамолекулярных комплексах [136]. Это позволило исследователям и теоретикам включить фактор гидродинамики среды в методологическую часть проблемы возникновения жизни [57; 101].

Большой вклад в развитие теории мира РНК был сделан экспериментальным методом выращивания колоний нуклеиновых кислот на границах твёрдой, жидкой и газообразной сред. Этот метод получил название молекулярных колоний и был разработан в Пущино А. Б. Четвериним с коллегами [112]. Отдельный вопрос касался определённого соотношения хиральных молекул при возникновении жизни, но он исчерпал себя сам по мере открытия всё большего количества различных путей селективного отбора на хиральность молекул [28; 106], таких как поляризационный свет [198], ультрафиолетовое излучение [69; 70], разделы границ фаз жидкой и газообразной сред [101]. Когда проблема хиральности стала рассматриваться в парадигме мира РНК, на помощь пришли эмпирические данные — были получены рибозимы, копирующие левые и правые копии [191]. Появилась одна из версий, что проблема хиральности — это выбор или организация самой живой материи.

В этот же период ряд технологических и экспериментальных открытий, произошедших в конце первого — начале второго десятилетий XXI столетия, позволил наметить пути искусственного получения самых элементарных и одновременно фундаментальных биологических молекулярных систем [132]. В 2010 г. в лаборатории Крейга Вентера был получен элементарный искусственный геном и помещён в клетку микоплазмы с заменой естественного генома. Затем микоплазма с искусственным геномом продолжала функционировать. Помимо упомянутых выше искусственных мембран, сконструированных в лаборатории Дж. Шостака в 2008–2010 гг., в 2015 г. Ш. Миталиповым было реализовано так называемое тройное оплодотворение, когда в клеточную оболочку

с митохондриями от одной особи помещается неоплодотворённое ядро от другой особи, после чего происходит оплодотворение спермием третьей особи [153]. Таким образом, был поставлен технологический механизм конструирования главных молекулярных органелл клетки — генома, мембраны и митохондрий с другими органеллами. Другими словами, был реализован механизм размножения и развития двуполовых систем в чужеродной клеточной среде. Это даёт возможность использовать клеточные оболочки со средами для изучения функционирования инвазивных органелл, молекулярных комплексов, а также других биотехнологических приёмов. В отношении искусственного генетического кода были получены геномы из двух и восьми нуклеотидов соответственно [167; 207; 211]. Причём генетические последовательности из восьми нуклеотидов функционировали в живых организмах. Это позволило раскрыть ряд важных вопросов как в проблеме функционирования самого генетического кода, так и выявить возможности и пределы его отклонения от нормы. Стало понятно, что азотистые основания в нуклеиновых кислотах могут быть различны. В отношении каталитических реакций вскоре после открытия рибозимов стали появляться их искусственные аналоги, работающие в среде с микроэлементами, например свинцом [157]. В 2000-е гг. появились первые искусственные рибозимы с низкой каталитической активностью, а после 2010 г. — рибозимы, способные работать быстрее и создавать нуклеотидные последовательности длиннее самих рибозимов [157; 203]. Отдельный успех был получен в исследовательской группе Т. А. Линкольна в 2009 г., когда удалось создать рибозимы, которые могут собирать друг друга [162]. Однако при всех успехах в биотехнологических сборках нуклеиновых кислот и белков до настоящих дней не решён ряд проблем в части соединения генома и протеома. Это обусловлено тем, что основную часть всех процессов в клетке выполняют разные формы РНК. В связи с этим пристальное внимание в последние 2–3 десятилетия уделялось изучению структуры и функционирования рибосом. Помимо того, что молекулы РНК более нестабильны, могут отличаться очень маленькими размерами, главной проблемой является отсутствие оптимальных сред, необходимых для изучения и управления процессами взаимодействия нуклеиновых кислот с белками.

Исследования по трансплантологии клеточных органелл Ш. Миталипова и К. Вентера рассматриваются в рамках биотех-

нологий, а искусственные рибозимы, молекулярные колонии А. Б. Четверина и реакции протосульфатного метаболизма уже относятся к отдельным элементам получения искусственной жизни, однако в них идёт работа с уже известными, естественными молекулами жизни. Также данные исследования касались отдельных фаз самоорганизации жизни при её формировании, но не всего процесса в целом. Первая причина столь долгого процесса изучения и получения искусственных биологических компонентов заключается в методологических подходах, которые базировались на стандартных химических, физических и биологических методах. Вторая естественная причина такого длительного и увлекательного процесса заключается в том, что жизнь — это сложное явление, которое на разных этапах своего развития ещё больше усложняется. Сложность эта начинается с изотопного состава углерода — определённые его изотопы наиболее часто включаются в биологические молекулы — и заканчивается спецификой возникновения хромосом, увеличивающих необратимость и дискретность жизни. Отдельной проблематикой является эволюция мембран и сред, в которых проходила эта эволюция. Все эти частные проблемы в возникновении жизни рассматривались по отдельности, в том числе по причине отсутствия задач получения более целостных живых систем и реакций. Это происходило естественным образом, в ходе редукционизма. На сегодняшний день, когда ряд частных проблем возникновения жизни на различных уровнях организации живой материи почти решён, необходима выработка более системного комплексного направления для получения искусственных живых систем, аналогичных естественным, и получения принципиально новых систем, подобных живым. И все эти процессы требуют не только рассмотрения и структуризации, но и практических решений, некоторыми из которых мы постарались дополнить настоящую работу.

В начале XXI столетия выходит ряд русскоязычных монографий, посвящённых проблеме происхождения и возникновения жизни. Среди них «Феномен жизни. Между равновесием и нелинейностью. Происхождение и принципы эволюции» Э. М. Галимова (2001), «Этапы эволюции органических соединений. Вынужденная симметрия биологических систем» В. В. Ярового (2005), «Рождение сложности. Эволюционная биология сегодня. Неожиданные открытия и новые вопросы» А. В. Маркова (2010), «Биофизическая экология» В. А. Твердислова, А. Э. Сидорова, Л. В. Яковенко (2012),

«Происхождение жизни. Мультиматрица» Л. А. Сокова (2012), «Происхождение жизни. От туманности до клетки» М. А. Никитина (2016). В своих работах Э. М. Галимов, В. В. Яровой, В. А. Твердислов возвращаются к проблеме неравновесной самоорганизации, объясняющей многие этапы возникновения жизни. Начало работ по неравновесной самоорганизации, объясняющей механику возникновения жизни, было заложено в 1925–1928 гг. в работах А. А. Богданова (1925–1928), Андропова (1928), Э. С. Бауера (1935). И почти одновременно с разработкой теории возникновения жизни Опарина — Холдейна (1924). Таким образом, второй круг замкнулся. Теория возникновения жизни получила основу в виде теории неравновесной самоорганизации и автоволновой теории, которые независимо были разработаны в один период и соединены друг с другом почти через столетие. Проблема также заключалась и в постоянном применении упомянутой выше теории эволюции к различным, в том числе молекулярным этапам становления жизни. Значительно позже научному сообществу стало понятно, что процесс возникновения новой материи объясняется другими фундаментальными теориями, к которым ближе тектология А. А. Богданова (1928), теоретическая биология Э. С. Бауера (1935), теория систем Л. Берталанфи (1931). Наиболее общей теорией, объединяющей все выше перечисленные, является теория неравновесной самоорганизации. Данные теории, объясняющие механику возникновения новой материи, являются более фундаментальными и глубинными по сравнению с эволюционной теорией, которая описывает развитие уже сформированных живых систем. Однако на сегодняшний день накапливается всё больше данных, позволяющих соединить и интегрировать теорию неравновесной самоорганизации с теорией эволюции.

Автор выражает благодарность члену-корреспонденту РАН, доктору биологических наук А. Б. Четверину, доктору биологических наук Е. В. Четвериной (Институт белка РАН, Пуцзино), кандидату химических наук Е. В. Калите (МФТИ (НИУ), Москва), кандидату технических наук А. О. Шульцу (ЮУрГУ (НИУ), Челябинск).

ГЛАВА 1

Возникновение жизни

1.1. Лунный поляризатор и гравитация

Неоспоримым является тот факт, что жизнь появилась и развивалась на Земле после гигантского столкновения и развития дуальной системы Земля—Луна 4,5–4,3 млрд лет назад. В связи с этим влияние протолуны на Землю на первых фазах возникновения и развития жизни было очень значимым. Луна, приближенная к Земле, могла способствовать отбору хиральности за счёт увеличения количества падающего на планету поляризационного света, влияющего на пространственную организацию молекул. Одна из основных проблем организации жизни — гомохиральность в виде левых аминокислот и правых сахаров. В последние десятилетия появляются эксперименты подтверждающие теорию Вестера — Ульбрихта, где поляризованные электроны способствуют селективной гомохиральности [146; 184; 198]. Исходя из моделей реконструкции системы Земля—Луна можно предложить следующий механизм объяснения гомохиральности. Протолуна после её формирования и выхода на орбиту была приближена к поверхности нашей планеты, по разным оценкам, на расстояние от 22 до 50 тыс. км [31].

Это обеспечило скорость оборота Земли в 5–5,5 ч и стабильное освещение Лунной поверхности планеты с высокой периодичностью (рис. 1). Эти условия могли способствовать как отбору хиральных реакций, так и формированию биофизических и биохимических циклов, объединённых в гиперциклы. Следует отметить ряд других теорий появления гомохиральности, среди которых аэрозольная теория хиральной асимметрии, предложенная В. А. Тверди-



Рис. 1 (начало). Динамика отдаления Луны от Земли с изменением продолжительности суток и шкалой времени

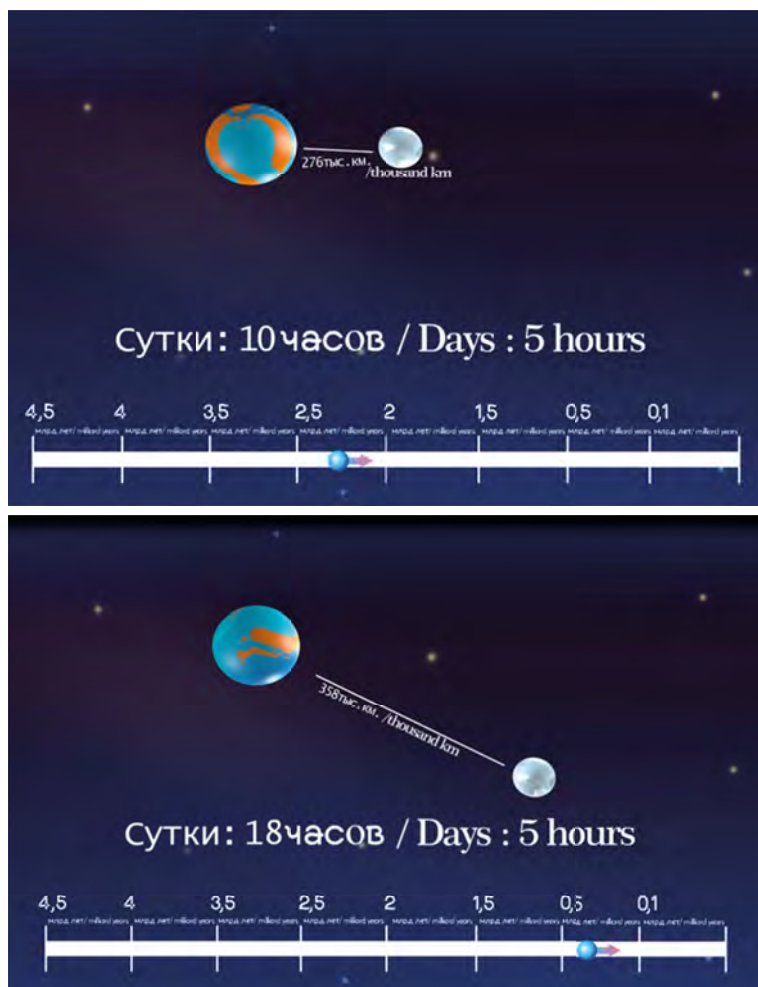


Рис. 1 (окончание)

словым (2012), теория магнитных аномалий, вызванных метеоритной бомбардировкой и спецификой магнитного поля первичной Земли, обеспечивающих селекцию гомохиральности [41], теории организации более эффективных энергозатрат при гомохиральности, так как в живой материи известны исключения в L-аминокислотах и D-углеводах и D-липидах. Данные гипотетические условия среды лишь дополняют друг друга и уменьшают вероятность рацемических смесей. Причём фотический лунный фактор

является наиболее стабильным для хиральной самоорганизации. Таким образом, условия на ранних этапах формирования жизни никак не должны были способствовать рацемической смеси, а для возникновения жизни в отличие от появления других материй определяющими являлись уже неравновесные условия при наиболее слабых взаимодействиях: слабом и гравитационном [146; 198]. Вторым фактором формирования среды, благоприятной для возникновения жизни, является близкое расположение Луны после её формирования к поверхности Земли. Установлено, что даже в современных условиях при расстоянии Луны до Земли в 385 тыс. км Луна оказывает существенное гравитационное влияние в виде морских приливов и поднятия рыхлых слоёв почвы. Также она влияет на локальное изменение атмосферного давления и деформацию земной коры. Расстояние Луны до Земли в 22–50 тыс. км 4,5–4 млрд лет назад, очевидно, оказывало значительно более сильное влияние на механическое перемешивание поверхностных сред или даже геосфер. Это расстояние было на порядок меньше современного, и Луна на сегодняшний день находится в 17 раз дальше от поверхности нашей планеты по сравнению с 4 млрд лет назад. В условиях только сформированной литосферы при отсутствии крупных складчатостей водные толщи и толщи осадочных пород должны были сильно перемешиваться и перемещаться по поверхности планеты. Подобно пылевым бурям на Марсе, но в более постоянных и стабильных условиях перемешивания и соответствующими миграциями вещества, так как движение по орбите Луны было постоянным. Более высокая скорость вращения Земли (5–5,5 ч) должна была ещё больше усиливать данный эффект (рис. 1). Таким образом, вторым фактором влияния Луны на Землю было формирование специфичной среды на поверхности нашей планеты на ранних стадиях её развития.

1.2. Золь-геосфера

Экологические модели и экспериментальные исследования постулируют, что развитие биоты на всех стадиях организации ограничено и функционально связано с тремя основными разделами фаз: жидким, твёрдым, газообразным [25; 26; 56]. При этом биота, изменяя условия окружающей среды, стремится к увеличению

количества фазовых разделов, откуда может извлекать энергию. И именно увеличение качества и количества данных фазовых разделов обеспечивало основные ароморфозы в эволюции биоты [88]. Метеоритная бомбардировка обеспечивала на ранних стадиях развития Земли смешение гидросферы, атмосферы и литосферы, с различной дисперсностью твёрдых частиц от коллоидных до пылеватых. Аналогичным образом происходило перемешивание жидкой фазы, в том числе в виде капельной, зольной и гигроскопической воды, как свободно перемещаемой в пространстве, так и адсорбированной на твёрдых частицах. Следует предположить, что в таких условиях возникала золь-геосфера, которая в планетарной атмосферной циркуляции была подхвачена гравитационными силами Луны, в тот период значительно приближенной к Земле [94]. Золь-геосфера должна была остывать и нагреваться, выпадая в жидкую гидросферу и обратно попадая в воздух благодаря метеоритной бомбардировке. В силу этой же метеоритной бомбардировки в воздух попадали минеральные частицы. Среда становилась более дискретной в пространстве и времени, что обеспечивало дискретность в самоорганизации предбиотических молекул. То есть шёл колебательный процесс, способствующий возникновению нескольких пусковых механизмов для появления жизни и дальнейшей эволюции. Луна способствовала активному перемещению потоков воды в жидком состоянии в виде планетарной циркуляции формирующегося Мирового океана, то есть доклеточная жизнь могла развиваться в атмосфере и при этом на поверхности минеральных частиц, которые передвигались в данной золь-геосфере. Увеличение количества мелкодисперсных частиц обеспечивало условия для накопления органики, возникновения органоминерального комплекса и формирования периодически дискретной золь-гель-геосферы. В золь-гель-геосфере золь рассеивался в газовом пространстве, а гель располагался в порах, трещинах, кратерах, гидротермах и других углублениях на поверхности литосферы. Таким образом, теории «первичного бульона» [75], «первичной пиццы» [208] и «первичного майонеза» [174] можно дополнить теориями «первичной сахарной пудры», «первичной сладкой ваты», «первичного желе» (то есть геля) и «первичного торта». Причём последовательность «сахарная пудра — сладкая вата — желе — торт», вероятнее, должна быть циклична с периодичной сменой всех фаз. Переходя от терминологических аналогий к динамике абиотической среды, в которой зарождалась

жизнь, следует констатировать следующее. Золь-геосфера была продлившейся стадией планетезимали, когда твёрдая оболочка Земли уже сформировалась [60; 87]. В дальнейшем при отдалении Луны от Земли и снижении атмосферного давления доля жидкой и твёрдой фазы в атмосфере снижалась (рис. 1). После формирования системы Земля—Луна наш спутник был максимально приближен к планете и создавал соответствующее перемешивание ещё не сформированных геосфер. После чего дополнительным фактором внесения мелкодисперсного материала в формирующиеся геосферы служили метеоритные бомбардировки. Таким образом, планетезималь из газопылевого материала, вероятно, существовала на поверхности уже твёрдой планеты в виде формирующихся геосфер. То есть первым фактором в создании среды на поверхности нашей планеты было перемешивание Луной формирующихся твёрдых, жидких и газовых сред. Вторым фактором близкого расположения Луны служило её отражённое освещение поверхности Земли.

1.3. Фибриллярная форма организации среды и материи и метеоритная бомбардировка

Начиная с построения теории мира РНК в 1970–1980-е гг. каждое последующее десятилетие открывались новые особенности данной молекулы, позволяющие дополнять данную теорию и укреплять её надёжность. К таким событиям относятся открытые в 1980-е гг. каталитические особенности и вторичные, третичные структуры молекул нуклеиновых кислот, способность, открытая в 1990-е гг., молекул размножаться в пористых ячейках гелей и перестраивать свои нуклеотидные последовательности [112], определение структуры рибосом в начале 2000-х гг., а в конце 2000-х — способность искусственных рибозимов создавать копии РНК молекул [162]. Недостаточно оценённой оказалась работа, демонстрирующая механохимические особенности среды, которые определяют построение различных типов супрамолекулярных и полимерных молекул в зависимости от типа перемешивания [136]. Вместе с тем положение о том, что жизнь базируется преимущественно на организации биологических полимеров, было сформулировано ещё

в прошлом столетии [28]. Данные положения вместе с закономерностями, устанавливаемыми при падении метеоритов [37; 45; 67], позволяют дополнить характеристики среды при абиогенезе. Метеоритная бомбардировка как один факторов возникновения жизни рассматривалась давно в связи с доставкой химических элементов, органических веществ, воды, магнитных эффектов, способствующих хиральности полимеров, термических характеристик на поверхности планеты (рис. 1). Кроме того, сроки окончания крупной массовой метеоритной бомбардировки (4–3,9 млрд лет) примерно совпадают с датировками появления первичных протобионтов. Теперь данная модель дополнилась механохимическими и гидродинамическими механизмами. С экологических позиций можно предложить ещё три фактора, обусловленных метеоритной бомбардировкой и способных обеспечить новый тип самоорганизации: количественное и качественное увеличение разделов трёх фаз вещества, дискретность и фибриллярность сред. Увеличение разделов фаз твёрдого, жидкого и газообразного вещества в пределах трёх основных геосфер Земли способствует активизации процессов протометаболизма на поверхностях фазовых разделов и обеспечивает появление основной среды, необходимой для протекания первичных биохимических реакций, — возникновение органоминерального комплекса вследствие выбивания из монолита мелкодисперсной фракции. Под дискретностью сред подразумевается дифференцировка и локализация органических пулов, как вследствие дробления самих органоминеральных комплексов, так и путём извлечения органики из геотермальных источников, метеоритного, кометного вещества и аккумуляции различной по составу органики в различных средах. Среди такой органики могут быть не только углеводороды, но и биоорганические молекулы в виде жирных кислот и углеводов. Наши исследования донных отложений сразу после падения Челябинского метеорита и год спустя показали следующие результаты (рис. 2). В зависимости от плотности среды снег—лёд—вода—или распределение различных фракций по глубине залегания было неравномерным. В эпицентре погружения самого крупного (500 кг) куска метеорита фракции донных отложений были более мелкодисперсные, чем год спустя (рис. 3). Это обусловлено взмучиванием и выпадением более мелкой фракции пелита в верхние слои. Количество и разнообразие биоты в виде одноклеточных водорослей, трихомных водорослей и панцирей

ракообразных сразу после падения крупного фрагмента метеорита в ил также было выше, чем через год (рис. 3). Год спустя пробы, взятые в эпицентре и в 100-метровом отдалении на север, юг, восток и запад от эпицентра падения, показали схожие соотношения гидробионтов. Данный эффект, при котором с помощью взмучивания и рыхления донных отложений повышают кормовую базу

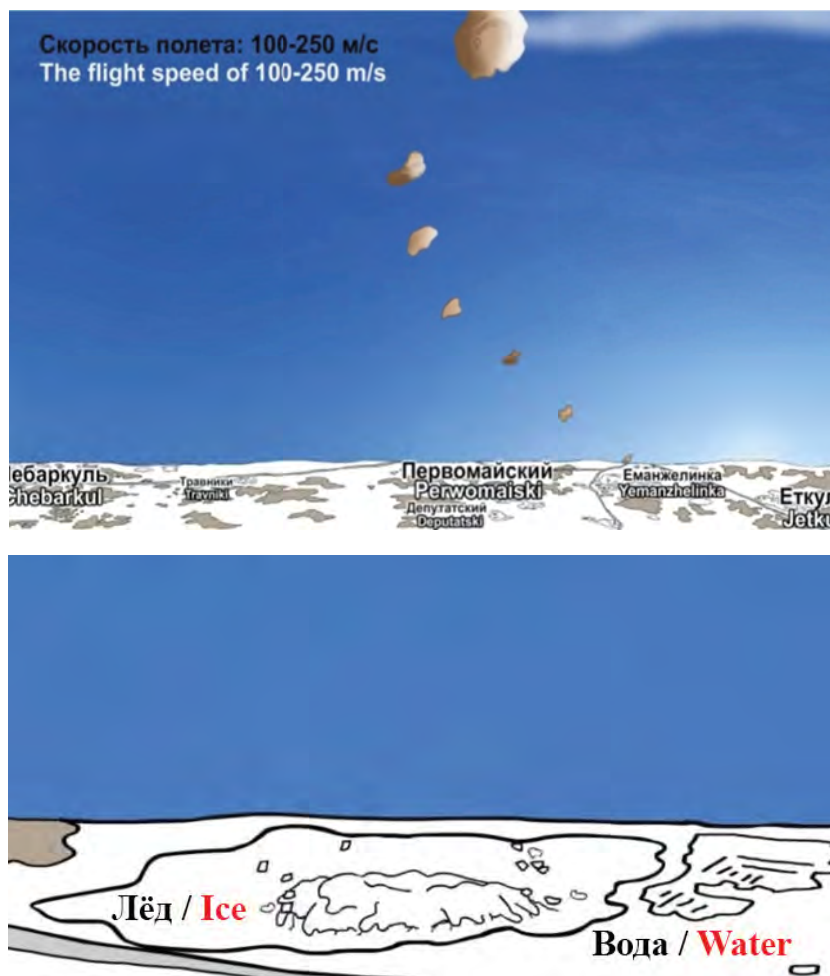


Рис. 2 (начало). Схема падения Челябинского метеорита, фото полыньи (2013 г.) и схема погружения метеорита в донные отложения и его доставки на поверхность



*Схема движения и добычи
фрагментов метеорита
Челябиск в озере
Чебаркуль в 2013 г.*

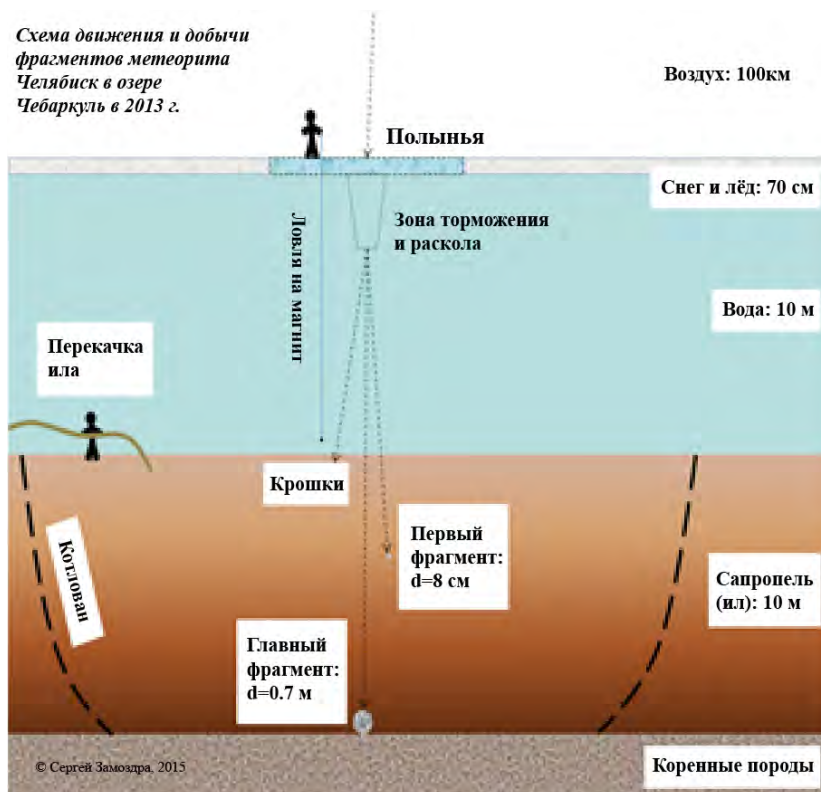
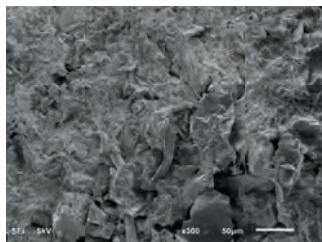
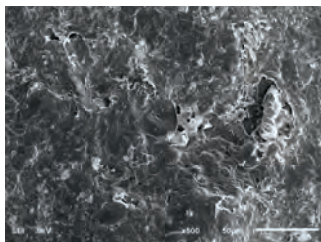


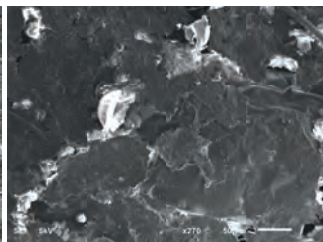
Рис. 2 (окончание)



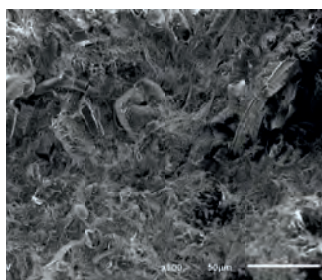
В эпицентре через неделю
после падения (2013 г.)



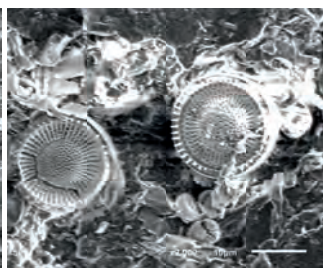
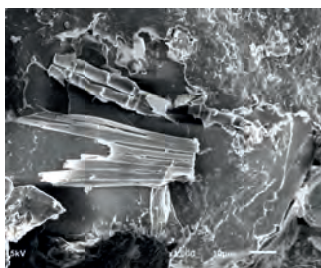
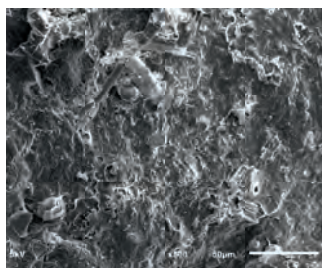
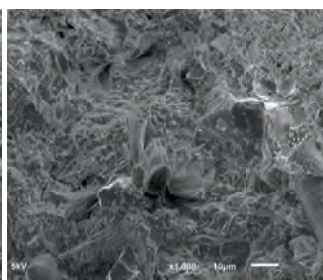
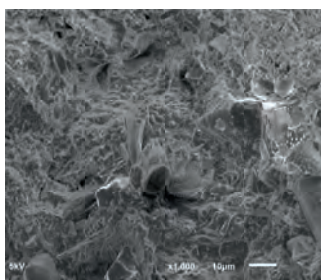
В эпицентре спустя год после
падения (2014 г.)



В 100 м на юг от эпицентра
спустя год после падения
(2014 г.)



Гидробионты в донных отложениях спустя неделю после падения метеорита (2013 г.)



Гидробионты в донных отложениях спустя год после падения метеорита (2014 г.)

Рис. 3. Общий вид донных отложений и биота в верхнем слое донных отложений озера Чебаркуль после падения Челябинского метеорита

водоёма, известен на практике давно [89]. Падение метеорита, как естественный процесс, только подтвердило этот опыт. Также установлено снижение концентрации микроэлементов в центральной части донных отложений — в эпицентре падения вследствие откачки вертикального столба донных отложений и натекания сверху менее загрязнённых верхних слоёв (данные не опубликованы). Данный эффект может быть также обусловлен изменением плотности донных отложений в месте откачки. Фибриллярный аспект, отмеченный выше, подразумевает значительный избыток по сравнению с современными условиями волокнистых и фибриллярных минералов, которые образуются при падении метеоритов и извержении вулканов [13; 37; 45; 67]. Волокнистые минералы также образуются в процессе выветривания, гидролиза, на пористых средах и перенасыщенных растворах [13; 45; 67]. Все перечисленные характеристики в избытке должны были соответствовать условиям ранней Земли и метеоритной бомбардировке (рис. 4), а также многие формы нитевидных минералов образуются в избытке цинка, что подтверждает цинковую гипотезу среды [43]. Благодаря волокнистым минералам, во-первых, обеспечивается прочность формирующихся органоминеральных комплексов и их пористая структура [56], а во-вторых, прослеживается параллель фибриллярные минералы — фибриллярные биополимеры как ведущая форма самоорганизации вещества. Данная гипотеза не рассматривалась в контексте среды при формировании и развитии полимерных РНК-молекул. Эти условия среды могли обеспечивать устойчивость РНК-молекул при их выносе в атмосферу за счёт расположения на поверхности воды более устойчивых к ультрафиолету гидрофобных азотистых оснований, тогда как фосфатные группы оказывались погружёнными в водно-органическую среду пор минералов. Волокнистые минералы в отличие от глобулярных могут дольше задерживаться в атмосфере за счёт больших удельных поверхностей [13; 42; 45]. Это обеспечивало большую продолжительность нахождения в воздушной среде минералов с поверхностной плёнкой воды на их поверхностях и в порах. При жёсткой радиации происходило испарение жидкой водной фазы с поверхности минералов с соответствующей конденсацией, что способствовало полимеризации органических веществ на твёрдых поверхностях. Кроме того, нуклеотидные и другие органические полимеры могли конкурировать и отбираться в различных условиях среды, а также связывать дискретные минеральные



Базальтовые нити у вулкана на металлической конструкции



Базальтовые нити у вулкана на горной породе



Базальтовые нити в микрометеоритах

Рис. 4. Базальтовые нити естественного происхождения около вулкана и в микрометеоритах

частицы, что приводило к образованию органоминерального комплекса. Волокнистые или нитчатые минералы характеризуются большими удельными поверхностями по сравнению с глобулярными, что также способствует большей интенсификации обменных процессов на их поверхностях, необходимых как для полимеризации, так и различных протометаболических циклов (рис. 5).

1.4. Плотность геосферы

По разным оценкам, атмосферное давление на поверхности сформированной твёрдой Земли колебалось в пределах от 2 до 10 атмосфер. Наиболее вероятные цифры большинство исследователей приводят в пределах от 0,5 до 2 от современной атмосферы. То есть давление на поверхности планеты если и было повышено, то незначительно. Тем не менее даже увеличение давления в 2 раза ведёт к изменению структурно-функциональной организации предбиотических и субстратных молекул. Во-первых, увеличение плотности атмосферы ведёт к интенсификации электростатических свойств, увеличению электропроводности среды. Здесь следует отметить, что эксперименты С. Миллера и С. Фокса также проводились в электрически заряженных условиях среды, в которых были получены аминокислотные и пептидные агрегаты. Что касается молекулы РНК, то также известно, что в отличие от ДНК рибонуклеиновая кислота становится более изменчивой под влиянием электричества [22]. Увеличение электропроводности может также способствовать интенсификации каталитических свойств минеральных и металлических субстратов, на которых шёл первичный синтез биополимеров. Также следует отметить, что колебания давления могут способствовать изменению длин волокон в полимерах. Это в соответствующих условиях периодичности может способствовать накоплению полимеров в среде. Вторым важным благоприятным фактором является сжатие и уменьшение объёма молекул [7; 16; 17]. Этот механизм может способствовать конденсации и накоплению протобиологических молекул в порах минералов и матриксах катализаторов. Что касается органических и биоорганических молекул, служивших сырьём для первых биологических полимеров, их свойства при

повышении давления характеризуются следующими особенностями. Под высоким давлением молекулы сближаются, что усиливает межмолекулярные взаимодействия, в том числе диполь-дипольные и дисперсионные силы. Это может способствовать смене ориентации молекул. Молекулы становятся более поляризованными. Поляризационный эффект является одним из ведущих как в структурной, так и в функциональной организации биологических молекул. Увеличение давления в атмосфере ранней Земли также способствует задержке всех мелкодисперсных фракций в циркулирующей среде и делает среду благоприятной для формирования выше описанной золь-геосферы.

1.5. Магнитное поле

При достаточно продолжительном развитии такого направления, как магнитобиология, ни один из её разделов напрямую не касался проблемы происхождения жизни. В 2009 г. В. А. Даванковым была предложена модель появления хиральности и дисбаланс энантиомеров органических молекул в плазменном факеле, возникающим при метеоритной бомбардировке. Условия, возникающие при данном воздействии, ещё раз подтверждают неравновесность среды, способствующей появлению жизни. Однако метеоритная бомбардировка способствует слишком высокому диапазону колебаний температур, не всегда благоприятных даже для предбиологических молекул. В то же время существует другой неравновесный механизм колебаний магнитного поля. В первые фазы формирования Земли, когда её ядро ещё не полностью сформировалось, а Луна наиболее активно взаимодействовала с планетой, напряжённость магнитного поля, вероятно, флуктуировала сильнее современного состояния. И в этой связи наиболее вероятным физическим кандидатом, обусловившим хиральность и дуальную симметрию предбиотических и биотических молекул, является эффект Холла. Причём разные его модификации (квантовый эффект Холла, спиновый эффект Холла) могут способствовать образованию таких радиально-симметричных молекул, как коррины, корролы, порфирины, а в других случаях — супрамолекулярных комплексов. Более того, в повышенном магнитном поле эффект Холла наиболее оптимален для возникновения транс-изомерии.

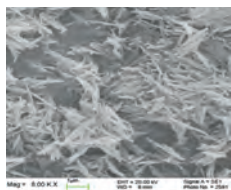
Однако флуктуации магнитного поля должны быть значительно выше современных. Теперь рассмотрим биологические эффекты, вызываемые сильным и слабым магнитным полем на биологические объекты и биологические молекулы.

В 1970-е гг. было установлено, что магнитное поле вызывает электродвижущую силу, влияет на заряженные частицы и свободно-радикальные соединения, что проявляется у органических и биоорганических молекул [71; 78; 104]. В это же время становится понятно, что экранирование магнитного поля блокирует многие биологические процессы [78]. Так, экранирование магнитного поля Земли снижает темп развития микробов и удлиняет процесс коагуляции молока. Также экранирование магнитного поля задерживает рост азотфиксирующих бактерий, стафилококка, фитопатогенных бактерий и грибов [12; 78]. Происходит замедление роста, появляются гигантские и бескапсульные клетки, утрачивается биохимическая активность, выделяется больше слизи, клетки округляются, угнетается ферментативная активность. После магнитных бурь, вспышек на Солнце, наоборот, наблюдается прирост продукции микроорганизмов. Отмечено, что в горизонтальном повышенном поле от 0 до 239 А/м увеличивается продукция фага в 6–7 раз. Повышение магнитного поля ускоряет рост дрожжей и эукариотов. При этом повышение магнитного поля замедляет фотосинтез, уменьшает концентрацию радиоуглерода. Увеличение магнитного поля снижает потребление кислорода ранних эмбрионов и онкологических клеток. То есть многоклеточные культуры тканевых эукариот тормозятся в развитии, дрожжи и прокариоты при этом, наоборот, получают стимул в росте. Таким образом, в повышенном магнитном поле преимущество получают брожение, окисленные формы, хемосинтез, но не дыхание. На молекулярно-биологическом уровне наблюдаются следующие особенности. В первую очередь магнитное поле способствует повышению образования углеводов и ненасыщенных жирных кислот. В условиях повышенного магнитного поля наблюдается ускорение полимеризации, ферментативных реакций и стабилизация белков [30; 78]. В слабом магнитном поле снижается полимеразная активность вирусов и ускоряется гидролиз белков и пептидов [74]. В кислой среде (рН 3–5) магнитное поле сильнее сказывается на метаболизме. Каталаза более интенсивно функционирует, и все реакции окисления более активны. Главная молекула жизни — РНК — также стимулируется повышенным

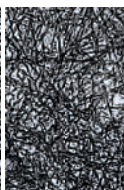
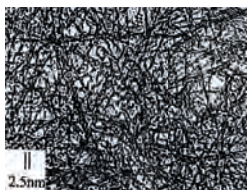
магнитным полем. Повышение магнитного поля замедляет распад РНК, увеличивает накопление массы РНК. Поле $4-8 \cdot 10^2$ А/м ускоряет катализ, в том числе РНК [78; 105]. Космические исследования в ослабленном магнитном поле также продемонстрировали возможность возникновения нуклеозидподобных систем именно в РНК, а не в ДНК [2]. И наконец, повышенное магнитное поле способствует полимеризации сахаров и выстраиванию из них доменов супрамолекулярных комплексов [93]. Наиболее вытянутые молекулы более подвержены воздействию поля [29; 78]. Эти молекулы становятся более ориентированы [30; 93] (рис. 6). Причём с увеличением молекулярной массы полимера ориентация молекул в поле падает. Таким образом, получаются автоматические ограничения роста супрамолекулярных комплексов, в чём проявляется гиперцикл. Кроме того, повышенное магнитное поле способствует уплотнению воды, повышаются поверхностное натяжение, вязкость. Это способствует изменению центров кристаллизации, и магнитное поле превращает воду в жидкие кристаллы, а полимеры слипаются с водой внутри клетки. Это, видимо, и являлось фактором, связывающим среду в виде полисахаридов вокруг нуклеиновых кислот. Супрамолекулярные комплексы сахаров обеспечивали каркас, необходимый нуклеиновым кислотам для энергетического обмена. Также магнитное поле могло способствовать растягиванию молекул при формировании порфириновых гемов, что рассмотрим позже (рис. 6).

1.6. Неравновесные балансы

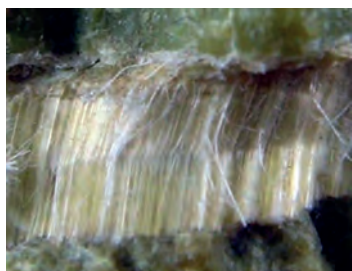
Средовые факторы, обеспечивающие неравновесность среды, также обеспечивали неравновесные балансы восстановительных и окислительных сред в геосфере. Вероятнее первичная атмосфера была всё-таки восстановительной, а локальные окислительные среды имели гидротермальное и метеоритное происхождение. То есть газовый баланс в неравновесных условиях был сдвинут в сторону восстановительных газов. При этом газовый баланс в соотношении доминирующих газов мог также меняться по мере взаимодействия эндогенных и экзогенных процессов на планете по мере её формирования. В частности, CO , CO_2 и другие газы могли локализоваться вблизи гидротерм, которые служили источником



Галлазит $(\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4)$



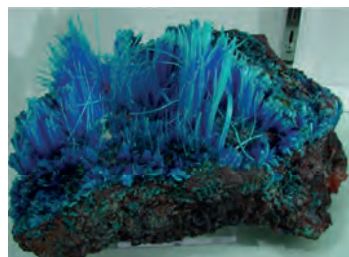
Имоголит $(\text{OH})_3\text{Al}_2\text{O}_3\text{SiOH}$



Хризотил-асбест $(\text{Mg}_3(\text{Si}_2\text{O}_5)(\text{OH})_4)$



Самородная волокнистая сера (S)



Халькантит $(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$



Актинолит-биссолит $(\text{Ca}_2(\text{Mg}, \text{Fe})_3[\text{Si}_6\text{O}_{22}](\text{OH}))$

Рис. 5. Волокнистые или нитевидные минералы естественного и происхождения

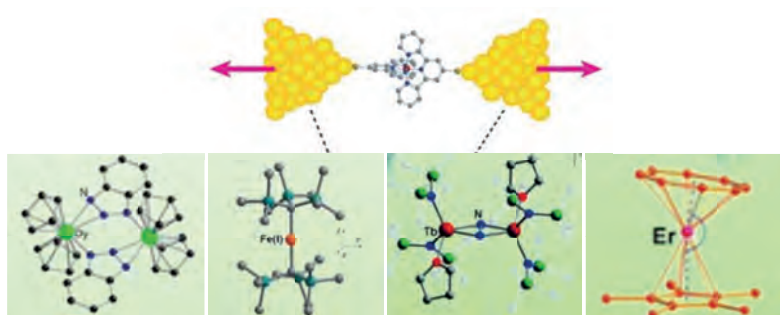
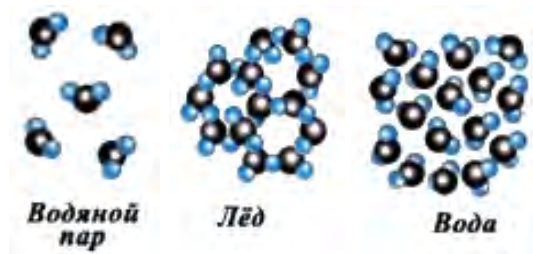
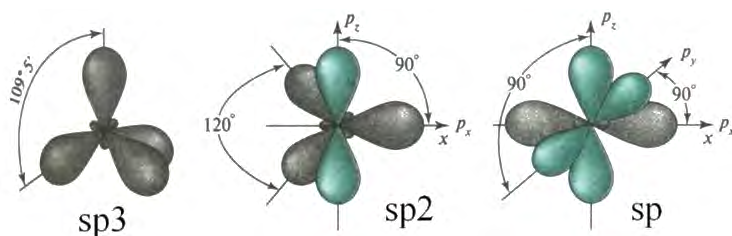


Рис. 6. Растягивание молекулы магнитным полем и молекулы-магнетики [180]

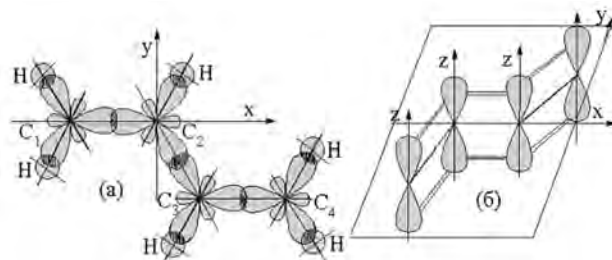
сред для фиксации протобионтов в порах и расколах монолитной литосферы, где аккумуляровались органоминеральные комплексы. То есть существовал динамичный баланс окислительной и восстановительной сред. Однако калий-натриевые и кальций-магниевые неравновесные балансы внутри клетки также могли выработаться позднее и были обусловлены дефицитом элементов в среде, которые были приобретены протоклетками для стабилизации метаболизма. Аналогичным образом мог быть выработан баланс L-аминокислот и D-сахаров [60]. Оба механизма появления неравновесных балансов помимо предложенных теоретических моделей [101] нуждаются именно в экспериментальной проверке. Ряд ключевых элементов неравновесной самоорганизации биоты также формировались в среде неравновесной дуальной системы Земля—Луна. Первыми неравновесными балансами до гомохиральности молекул и натрий-калиевых балансов можно считать приобретение бензольными кольцами в виде азотистых оснований положительно заряженных аминогрупп, с одной стороны, и отрицательных кислородных — с другой. Это усилилось с появлением гидроксильных и фосфатных групп при формировании нуклеотидов. Таким образом, первичное звено жизни — нуклеотид, а вслед за ним и нуклеиновые кислоты приобрели гидрофобную и гидрофильную части внутри одной молекулы. Вслед за этим возникли гидрофобности и гидрофильности других биоорганических молекул. Возникновение континуальных неравновесных полимерных биоорганических молекул в дискретной среде неравновесных водных кластеров также обеспечивало неравновесный баланс: дискретная среда — континуальная материя с последующим обратным процессом — дискретная материя в континуальной среде. В этих условиях происходило первичное отделение новой материи от среды и одновременная опора этой материи на среду при дальнейшей организации и самоорганизации. То есть асимметричные атомы углерода и полимеры, построенные на их основе, также взаимодействовали с асимметричными молекулами воды (рис. 7). Далее по каскадному механизму взаимодействие было выражено в виде конформации полимеров — кластеры воды и мицеллы протоорганизмов. Водород с атомом кислорода у воды и углерод с атомом водорода у углеводородов. Асимметричный атом углерода при присоединении водорода и образовании углеводородов получил сначала положительный заряд с полюсом, а при присоединении кислорода и образовании сахаров — отрицатель-



Различные агрегатные состояния молекул воды

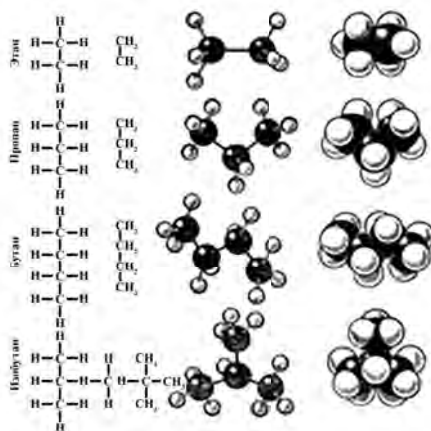


Виды гибридизации асимметричного атома углерода



▲ ► Периодичность в симметрии
и асимметрии при полимеризации
углерода и углеводородов

Рис. 7. Асимметричная молекула воды и асимметричные молекулы углерода, способствующие периодичности в симметрии и асимметрии при полимеризации; организация углеводородов, способствующая периодичности и транс- и цис-симметрии



ный заряд. Таким образом, сахара стали первичными полимерами, способными к усложнению. Аналогичным образом происходила эволюция аминокислот и пептидов с возникновением кислых аминокислот. Основным отличием нуклеотидных полимеров от других и предпосылкой к возникновению жизни являлась их возможность к самоорганизации и эволюционному развитию [11; 32]. В связи с этим следующим этапом дуального неравновесного баланса являлась комплементарность в нуклеиновых кислотах при формировании пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Далее шёл баланс анаболизма/катаболизма в виде продукции и деструкции, замыкающий аспект дискретности и вместе с тем континуальности при возникновении новой живой материи. Континуальность новой материи проявлялась в виде постоянно развивающегося гиперцикла с полярными и противоположными друг другу стадиями анаболизма и катаболизма. Появление дуального баланса в нуклеиновых кислотах в виде ответственной за изменчивость РНК и обеспечивающей наследственность ДНК повлекло начало эволюционных механизмов. Дальнейшая полярность (аэробность/анаэробность, фотосинтез/дыхание, мужской/женский пол) была уже обеспечена принципами дуальной каскадной самоорганизации биотических систем.

1.7. Дискретность самоорганизации

Динамика пространственно-временной дискретности среды в виде золь-геосферы и более динамичного взаимодействия системы Земля—Луна вследствие более быстрого вращения планеты обусловила два ключевых фактора дискретности в организации новой — живой материи. Первый — появление гиперцикла первичных биохимических путей обмена со средой при различной степени замкнутости протобионтов, второй — пространственной дискретности — возникновении клетки. Скорость многих биохимических циклов в многоклеточных организмах, характеризующаяся двухчасовой периодичностью, двухчасовая периодичность, наблюдающаяся в фазах развития колоний прокариотов, а также часовой ритм синтеза белка могут иметь происхождение, связанное со скоростью оборота Земли, которая в фазе формирования системы Земля—Луна по некоторым расчётам составляла 5–5,5 ч

[3; 31; 94]. С циклом в 5–6 ч связаны многие биохимические реакции, например регуляция экспрессии генов и синтез белков, ответ клеток на гормоны, ферменты, участвующие в синтезе липидов. При этом продолжительность дня в данном цикле Земля—Лена составляла 2–2,2 ч день и столько же ночь. Ритмы, связанные с 20–30-минутной периодичностью, подобные гликолизу, реакциям рибозимов, липолизу, циклу цитокинов, распаду вторичных мессенджеров (цГМФ, цАМФ), делению прокариотической клетки, возможно, связаны с другими средовыми периодами — вращением Луны, периодическим нагревом поверхности планеты, циклом геосферной миграции органических молекул. Например, миграция твёрдых глинистых частиц и капель воды к верхним слоям золь-геосферы, которая могла происходить в течение 20–30 минут. На более интенсивную высокочастотную фотическую периодичность освещённости ранней Земли также указывают особенности развития наиболее древних прокариотов — цианобактерий, способных активно развиваться в отличие от высших растений при непрерывной освещённости. В целом более интенсивная частота колебаний условий среды ранней Земли обеспечила автоколебательный процесс в самоорганизации жизни. Вне зависимости от возможности исторической обусловленности перечисленных циклов, связанных с динамикой среды, можно констатировать следующее. Два аспекта дискретности (биохимический гиперцикл и протоклетка) в возникновении жизни связывают данную фундаментальную общебиологическую проблему с другой, также не до конца решённой — проблемой старения. К последней проблеме впоследствии добавляется ещё структурная дискретность или генетическая — вертикальный перенос генов, что увеличивает необратимость в развитии жизни. Таким образом, решение одной из проблем может дать ответы на многие вопросы другой общебиологической проблемы. Фундаментальным следствием биохимического гиперцикла и временной дискретности жизни является то, что увеличение степени необратимости и выверенности биологических систем ускоряет эволюцию. В эволюции многоклеточных организмов это известно в виде увеличения разнообразия билатеральной симметрии.

1.8. Континуальная и дискретная организация среды

Общий генетический предок, по всей видимости, жил и развивался в органоминеральном континууме [56]. Его генетическая однородность также способствовала однородности среды обитания — структуре органоминерального комплекса (рис. 8). Вертикальный перенос генов и эволюция начались на краях органоминерального континуума. Эти формы, отделившиеся от общего предка, получали больше преимуществ за счёт усвоения энергии среды на дискретных биотопах — то есть краях биотопа при выработке соответствующих молекулярных ароморфозов. Генетическая изоляция, как и пространственная, была необходима для освоения новых сред и избавления от препятствующих освоению новой среды предшествующих реакций метаболизма. Вертикальный перенос генов в связи с появлением нетипичных краевых условий мог выработаться не только благодаря энергетическим преимуществам, но и по причине периодического истощения ресурсов в отсутствие оптимального катаболизма, на фоне длительной изоляции раздробленного некогда общего генома. Однако доклеточные протобионты также должны были развиваться в органоминеральном субстрате, где накапливали свою биомассу. В органоминеральной континууме матрицей для синтеза первичных биологических репликаторов могли являться две структуры — органические матрицы (гель) и минеральные,

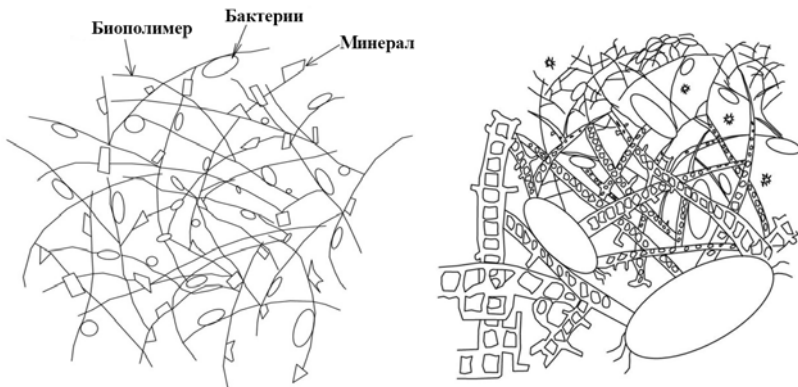
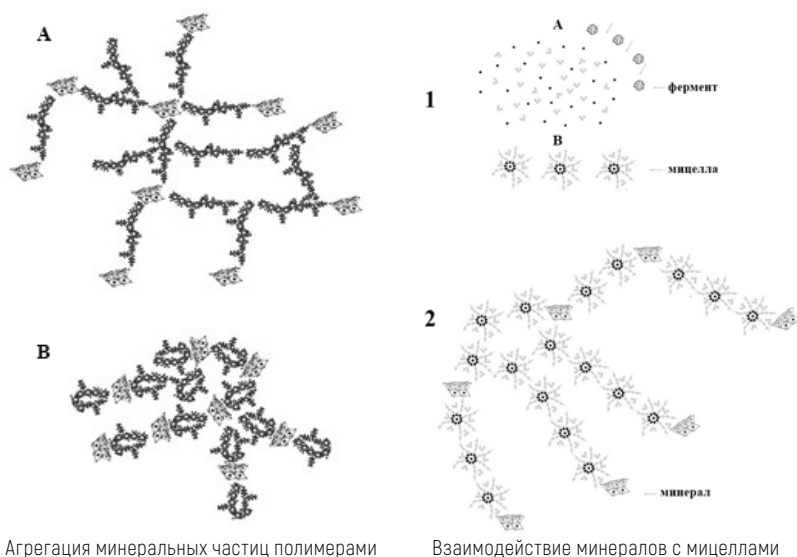


Рис. 8. Континуальный органоминеральный комплекс из органических веществ в виде полимеров и минералов

как в виде дискретных частиц, так и пористых пород (рис. 9). Первые нуклеотидные комплексы, выходя на минеральный матрикс, взаимодействовали с органическим веществом, быстро катализируя реакции на минералах. Органоминеральные субстраты вследствие метеоритных бомбардировок разрушались и выбрасывались в золь-систему вместе с предбиотическими самореплицирующимися системами. Постоянные увеличения дискретности жидкого и органического вещества в пространстве, изменение термических, электромагнитных и механических колебаний вследствие метеоритных бомбардировок способствовали дроблению полимерных цепочек нуклеотидов, их распространению в геосфере и синтезу новых протонуклеотидных систем. Затем при соответствующем в золь-геосфере мицеллярно-глобулярном типе организации появлялись предпосылки к клеточной центрально-симметричной самоорганизации. Возможно, поздняя метеоритная бомбардировка, обеспечившая дробление органоминерального континуума, также способствовала дифференцировке последнего общего генетического предка с единым геномом и его дальнейшей эволюции при попадании на вновь сформированные органоминеральные биотопы.



Агрегация минеральных частиц полимерами

Взаимодействие минералов с мицеллами

Рис. 9. Полимеры в органоминеральном комплексе при взаимодействии с минералами:

А – развёрнутый вариант с минералами, В – свёрнутый вариант с минералами

1.9. Дуальные стратегии и необратимость организации

На молекулярном уровне жизнь формировалась на дуальном балансе двух противоположных взаимодействий, таких как разная заряженность концов нуклеотида, возникновение баланса пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, комплементарность нуклеиновых кислот, хиральность аминокислот и сахаров. Но и на уровне протоклеточных более сложных протобионтов происходило функциональное разделение стратегий. Далее происходило вертикальное разделение жизни по питательным средам, энергетическим и экологическим условиям в целом. Протоклеточная жизнь спустилась в осадки донных отложений, где внутри клеток выработались специализированные молекулярные структуры — ДНК, обеспечивающие более точное копирование информации, ферменты-катализаторы, обеспечивающие ускорение химических реакций и более полное, оптимальное освоение среды. В органоминеральном континууме и в осадках в целом условия более стабильны и в то же время специфичны в плане органических ресурсов, что также может способствовать большей специализации — появлению ДНК. А доклеточные организмы — предки вирусов, фагов и вирионов остались сверху, в атмосфере и гидросфере. Доклеточные и клеточные организмы обменивались нуклеотидными последовательностями и внедрялись каждый в среду соседа. В случае первичного возникновения ДНК в протовирусных системах более обоснованным является предположение, что ДНК системы были захвачены более разнообразными и сложными РНК-протобионтами. Вертикальная экологическая дифференцировка происходила и в клеточном мире. Прокариоты разделились на протобактерий и протоархей, где вторые, возможно, ещё не обладая ДНК, ушли в донные отложения и их липидные мембраны катализировались на РНК-молекулах в иных условиях. А у бактерий уже специализированные белки выстраивали клеточные оболочки. Синтез транс- и цис-изомеров липидов на различных нуклеиновых кислотах также нуждается в экспериментальной проверке. Здесь следует отметить, что датировки первых клеточных организмов совпадают с возникновением Мирового океана. Таким образом, наблюдается аналогия: гидросфера Земли — клеточная оболочка. По аналогии одновременного возникновения ядра Земли и ядра у клеток эукариотов [70]. Таким образом, вирусы, возможно, изначально являлись

адаптационной формой для освоения новых сред при передвижении по воздуху и агентами для горизонтального переноса генов между изолированными средами, а также при высыхании среды. То есть вирусные и фаговые элементы жизни приобрели белковые оболочки, отличающиеся высокой прочностью, необходимой в экстремальных условиях среды. Остальные геномные элементы нуклеиновых кислот в благоприятной для размножения среде обособились в углеводных и липидных оболочках. Дуальные взаимодействия основных биополимеров можно наблюдать и сейчас на различных биологических реакциях в виде таких связей, как РНК—ДНК, РНК-пептиды, сахара-РНК, РНК-липиды. То есть происходил каскад дуальных взаимодействий между различными полимерами, пока не выработался полноценный клеточный гиперцикл у первой протоклетки LUCA, давшей начало другим формам клеточной самоорганизации. Таким образом, сахарная и липидная среда для нуклеиновых кислот в виде клеточных оболочек и полисахаридных биоплёночных матриц возникает в благоприятной среде, а белковая — в виде капсул вирусов и спор бактерий — в неблагоприятной по термическим и водным условиям среды. Но перед тем, как начать рассматривать возникновение более сложных живых систем, следует рассмотреть особенности первичного субстрата в виде нуклеотидов и особенности их организации при возникновении нуклеиновых кислот.

1.10. Мир нуклеотидов

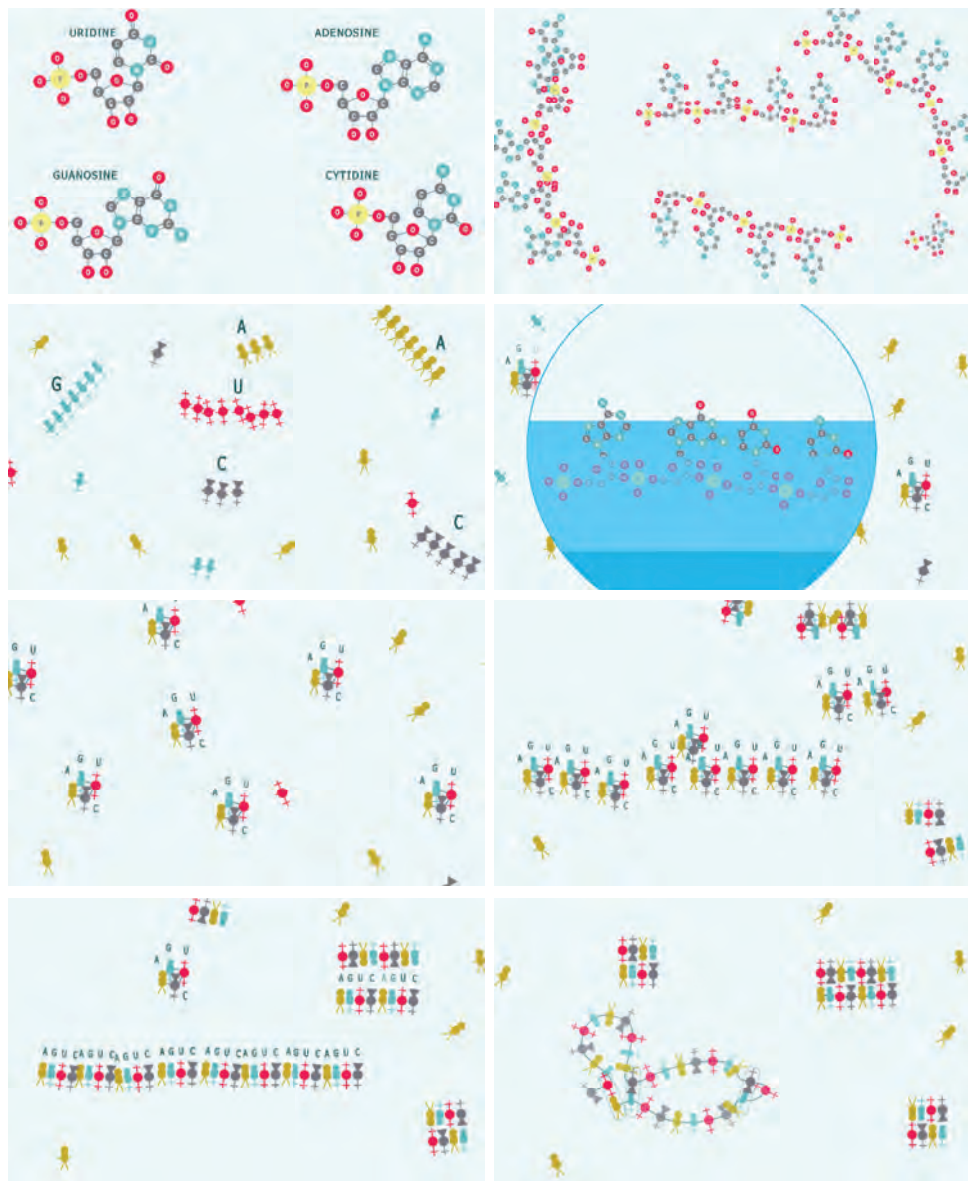
После разработки теории мира рибонуклеиновых кислот в конце прошлого столетия, в последние десятилетия настоящего столетия появились концепции миру ПАУ (полициклических ароматических углеводородов), гипотеза мира формамидов и цианосульфатного протометаболизма [181; 186; 187]. В это же время мир РНК становится не теорией, а экспериментальной базой, демонстрирующей все возможные пути доклеточной молекулярной эволюции жизни. Вместе с тем, если появление условий для возникновения нуклеотидов получило ряд экспериментальных и теоретических обоснований, то организация именно четырёх нуклеотидов, лежащих в основе жизни, экспериментально апробировалась недостаточно. Существуют две противоположные теории возникновения

четырёхбуквенного алфавита нуклеотидов. Первая теория основана на эволюции нуклеотидов из одного или двух. Например, Э. М. Галимов (2001) полагал, что первичной молекулой был аденозинтрифосфат или аденозинмонофосфат. Другие исследователи предложили эволюцию четырёх нуклеотидов из двух изначальных [207]. Вторая теория возникает из прямо противоположной тенденции: возникновение четырёхбуквенного алфавита в мире нуклеотидов для дальнейшего построения нуклеиновых кислот могло происходить путём отбора или выбора четырёх наиболее оптимальных нуклеотидов из значительно большего количества. Примеры искусственного построения и функционирования нуклеиновых кислот, состоящих из 6 и 8 нуклеотидов, также реализованы на практике [167; 209; 210]. Появление и отбор именно четырёх нуклеотидов подробно рассмотрены в наших предыдущих работах [60; 62]. По всей видимости, условия вследствие метеоритных бомбардировок способствовали образованию достаточно разных органических молекул, в том числе нуклеотидных пуриновых и пиримидиновых оснований. Возникновение различных азотистых оснований из формамидного, цианисто-водородного и углеводного миров вполне обосновано как теоретически, так и экспериментально [181]. Вторым подтверждением выбора именно четырёх нуклеотидов из большего набора являются особенности их организации, выявленные в мире РНК. Так, в некоторых РНК урацил встаёт не только напротив аденина, но и напротив гуанина, то есть нуклеотиды не всегда комплементарны. То есть комплементарность — не жёстко детерминированный закон, включающий исключения и свидетельствующий о некоторых возможностях выбора в комплементарных парах. Также РНК могут строить цепочки из нескольких повторяющихся друг за другом одним и тем же нуклеотидом. В частности, аденин и урацил могут выстраивать собственные повторы из 4–5 стоящих одинаковых нуклеотидов в псевдоузлах РНК, без соответствующих комплементарных пар. И третьим аргументом в пользу гипотезы выбора четырёх нуклеотидов из большего множества является наибольшая устойчивость радиально-симметричных кластеров, состоящих именно из четырёх азотистых оснований (рис. 10). Большое количество нуклеотидов в кластере, состоящем из пяти, шести и более нуклеотидов, делает нуклеотидную цепочку менее устойчивой вследствие возможности попадания в её центр других молекул, механических деформаций, приводящих

к нарушению структуры и другим схожим причинам. Четыре азотистых основания и соответствующих нуклеотида являются первичной формой радиальной симметрии, также являющейся более устойчивой по сравнению с двойными парами и тройными нуклеотидами. Таким образом, четырёхбуквенный код является следствием радиальной симметрии, возникающей на границах разделов фаз подобно ячейкам Бенара.

На разделе фаз вода—газ агрегируются поверхностно-активные вещества. Среди них часто преобладают гидрофобные молекулы. Полимеры и другие высокомолекулярные соединения располагаются гидрофобными частями молекулы к поверхностной плёнке воды. Это касается не только липидов и жирных кислот, но и основной молекулы жизни — нуклеиновой кислоты. В молекуле нуклеиновой кислоты азотистое основание гидрофобное, тогда как фосфатный остаток гидрофильный (рис. 10). Так как количество испарений и выпадений в осадок первично формирующейся гидросферы на поверхности Земли характеризовалось пространственно-временным увеличением частоты раздела фаз, количество плёнок воды, как на границах с минералами, так и с газовой средой было повышенным. Известно, что на поверхности минералов образуются двумерные гексагональные структуры воды [116], а также трёхмерные кластеры, образующиеся при нуклеации паров на поверхности кристалла [116; 117]. Подобная самоорганизация плёнки воды при её испарении способствует соответствующему периодическому размещению других амфифильных молекул, благодаря чему азотистые основания и нуклеотиды могут образовывать схожие двумерные кластеры. Полимеризация нуклеотидных цепочек и протонуклеиновых кислот может возникать при одновременном взаимодействии двух разделов фаз — твёрдой и газообразной при дефиците воды, а также на границах липидных, полисахаридных и пептидных слоёв.

Таким образом, одна из центральных идей мира нуклеотидов заключается в том, что изначально самоорганизация биологических молекул базировалась на радиальной симметрии, которая является наиболее простой в своей организации. Это служило предпосылкой к четырёхбуквенному коду. Вторая идея заключается в том, что эта организация происходила в водных плёнках, в некоторых случаях при испарении оказываясь на поверхности минералов, где плёнка уже содержала другие органические



вещества наряду с протонуклеиновыми кислотами. Мир нуклеотидов формировался на границах раздела фаз и был представлен различными пуриновыми и пиримидиновыми основаниями. Выбор четырёх нуклеотидов из большого количества, в ходе которого образовывались комплементарные пары и дальнейшая эволюция на основе трансляционной симметрии в мире РНК, является наиболее обоснованным. Неиспользованные нуклеотиды, не включённые в самоорганизацию четырёхбуквенных кластеров, использовались в качестве субстратной среды в дальнейшем синтезе сахаров и аминокислот. Гиперцикл первичного метаболизма был сформирован на базе репликативных систем с четырьмя основаниями.

1.11. Четырёхбуквенный код

Если не останавливаться на мире полициклических ароматических углеводов (ПАУ), формальдегидном и формамидном мире как первичном субстрате, необходимом для синтеза нуклеотидов, и мире рибонуклеиновых кислот, который уже в полной мере можно считать живым, остаётся промежуточное звено, в котором должен был сформироваться четырёхбуквенный алфавит. Это мир нуклеотидов. То есть наряду с уже широко используемыми в научной терминологии мирами ПАУ и РНК вполне обоснована возможность разработки концепции мира нуклеотидов и введение соответствующего термина [57]. В 2001 г. Э.М. Галимовым была предложена теория возникновения нуклеотида и высказана идея об АТФ как о первичной молекуле жизни. Через 10 лет и вплоть до настоящего времени стали появляться экспериментальные данные о возможностях синтеза в искусственных условиях различных нуклеотидов, нуклеозидов и азотистых оснований [128; 167; 188; 189]. Стали появляться теории мира нуклеотидов и прото-РНК [57; 137]. В последние годы появляются данные о высокой эффективности каталитической активности аденина [170]. Физико-химические условия и механизмы получения нуклеотидов свидетельствуют о том, что пути возникновения нуклеотидов могут быть различны. В это же время появляется ряд теоретических [207] и экспериментальных [167; 210; 211] данных о возможностях функционирования нуклеиновых кислот с 2, 6 и 8

нуклеотидами вместо 4. В этих исследованиях обсуждаются возможности эволюции генетического кода [210]. Исходя из данных исследований можно предположить, что некоторые нуклеотиды могли быть избыточными в окружающей среде, что косвенно подтверждает теоретические положения Э. М. Галимова. С другой стороны, вполне вероятно, что в мире нуклеотидов, когда шёл их интенсивный синтез, в окружающей среде разнообразие этих нуклеотидов на базе азотистых оснований могло быть гораздо шире, чем 4 (рис. 1). В связи с этим обоснование мира нуклеотидов и нуклеозидов кажется вполне обоснованным. И в этом аспекте решается ещё одна проблема, поставленная Дж. Шостаком [138], согласно которой продуктов синтеза должно быть больше, чем реплицирующихся систем. Чтобы из нуклеотидов смогли выстраиваться полимеры, первых должно накопиться в окружающей среде в избытке. Эти пути естественного синтеза нуклеотидов в формамидной, цианосульфатной и сахарной средах вполне обоснованы экспериментально и теоретически [181]. Излишние же продукты синтеза нуклеиновых кислот в виде сахаров, аминокислот и других органических веществ могли отсеиваться средой в виде разрушения их ультрафиолетом. Более сложные самоорганизующиеся РНК-системы могли выживать под действием ультрафиолета благодаря устойчивости азотистых оснований и специфическому сворачиванию (фолдингу) в компактные структуры, снижающие фотоповреждение. Однако сам факт высокого разнообразия нуклеотидов в среде и разной доли их видов позволяет посмотреть на проблему иначе. Здесь следует отметить, что различные виды нуклеотидов могли возникать в различных неравновесных условиях среды: от синтеза азотистых оснований в верхних слоях золь-пыль-геосферы посредством бомбардировки тяжёлыми протонами и ультрафиолетом до термической конденсации их в порах минералов [188]. Смешение же различных видов нуклеотидов в одних и тех же средах могло происходить посредством метеоритных бомбардировок, выбивающих минеральные частицы с поверхности Земли в газопылевую атмосферу и смешивающих различные её слои. Если же смоделировать взаимодействие большого количества разных нуклеотидов в среде, то можно выделить следующие возможности их самоорганизации. Первый — это построение отдельных цепочек из мономеров на базе одного нуклеотида, что наблюдается сейчас на примере некоторых специализированных (аденозиновых) молекул (НАД)

и используется в РНК, когда её некоторые достаточно длинные фрагменты (5 и более нуклеотидов) состоят из одного нуклеотида. Экспериментальные исследования с другим пуриновым нуклеотидом — гуанозинмонофосфатом подтвердили возможность полимеризации с последующей самосборкой в цилиндрические спирали [137]. Схожие тенденции к мицеллярной организации были выявлены и у аденозинмонофосфата [127].

Одним из аргументов избытка отдельных нуклеотидов и возможности построения полимеров из одного нуклеотида является использование нуклеиновыми кислотами некоторых из них, например аденозинтрифосфата в качестве энергетической молекулы и молекулы, являющейся субстратом. Переносная симметрия является в данном случае одной из первичных в организации жизни, что проявляется и на других уровнях организации живой материи, не только молекулярной, но и клеточной, тканевой [124]. Однако полимер из одной молекулы функционально и репликативно более ограничен по сравнению с полимерами из различных звеньев, что наблюдается не только в отношении нуклеиновых кислот, но и белков, полисахаридов и даже неживых органических полимеров. Тем не менее построение полимеров из одного нуклеотида в локальных и даже смешанных средах на первых фазах организации нуклеиновых кислот можно считать обоснованным (рис. 10). Вместе с тем дискретность золь-пыль-геосферы, температурные перепады способствуют разрушению полимеров на отдельные звенья [60; 73], что является следующим дальнейшим этапом эволюции нуклеотидного мира (рис. 10). Вторым этапом самоорганизации являются предпосылки к организации нуклеотидов в новых условиях среды. Здесь следует отметить, что дискретность золь-пыль-геосферы и периодическое выпадение воды в осадки на сушу с последующим испарением способствует увеличению разделов фаз жидкость—газ, жидкость—минерал [56]. И в этих условиях нуклеотиды должны выстраиваться в виде плёнки на разделе фаз азотистыми основаниями к газовой среде, а гидрофльными фосфатными группами — в воду или водно-органическую среду (рис. 10). И на данном разделе фаз организация нуклеотидов должна выглядеть иным образом [55]. Из множества нуклеотидов должны образовываться структуры, наиболее устойчивые в среде (рис. 10). В этих условиях наиболее устойчивыми будут супрамолекулы с аксиальной или радиальной симметрией (рис. 10). Причём из радиально-симметричных наиболее устой-

чивыми окажутся структуры с минимальным количеством звеньев — четырёх, так как структуры из шести, восьми и более звеньев в данных условиях менее устойчивы и их устойчивость падает с увеличением количества звеньев. И здесь вторым важным фактором среды помимо раздела фаз является магнитное поле. Экспериментально установлено, что магнитное поле воздействует на молекулы с аксиально-симметричным потенциалом и магнитосомы, вязко-упруго закреплённые в цитоскелете [14; 30; 64]. То есть повышение магнитного поля и более широкий диапазон величин его флуктуации способствовали радиальной симметрии во взаимодействии нуклеотидов. Из этих радиальных четырёх составных супрамолекулярных нуклеотидных комплексов могли образовываться как цепочки, так и двумерные слои в виде ячеек (рис. 10). Цепочки из периодичных нуклеотидов и комплементарных пар получают уже ряд функциональных преимуществ, что существенно ускоряет их самоорганизацию [60; 62]. Появляется возможность формирования из нуклеотидных цепочек более сложных трёхмерных структур. Это открывает предпосылки к сферической и векторной (билатеральной) симметрии в организации жизни. При взаимодействии нуклеотидных цепочек некомплементарными парами, как и комплементарными, могут образовываться петли (рис. 10). И в данных условиях РНК-системы могли эволюционировать, захватывая другие молекулы (сахара, аминокислоты, липиды) свободными нуклеотидами, а комплементарные пары использовали как реплицирующиеся системы. То есть в данных условиях получается и создание копий на четырёхбуквенных репликаторах, и метаболические процессы на свободных нуклеотидах и с использованием этих нуклеотидов. И в этом случае избыточные нуклеотиды (АТФ, ГТФ) в одних случаях функционируют в неизменённом виде, в других — участвуют в процессах катаболизма. Также моделирование показывает, что РНК-молекула с двумя типами оснований характеризуется большим разнообразием вариантов сворачивания в шпильчатые структуры, чем с четырьмя основаниями, способными образовывать одну или две устойчивые структуры [196; 197]. Рибозимы из РНК с двумя основаниями также возникают реже, и их эффективность ниже, чем у рибозимов с четырьмя основаниями [73]. То есть возникает периодичность в организации разнообразия и симметрии с возникновением ограничений. Периодические ограничения накладывает жизнь сама на себя, то есть ограни-

чивает типы сворачивания в трёхмерном пространстве. При этом растёт выверенность живой системы на молекулярном уровне. Двухбуквенные нуклеотиды — путь к большему разнообразию, большей энтропии и меньшей упорядоченности. Поддержание баланса четырёх нуклеотидов в клетке также сложнее реализовать, чем двух, и требует больше ферментов. Это также свидетельствует о периодичности, возникающей в снятии ограничений на разнообразие. По мере роста и усложнения ферментативных систем молекулярное разнообразие продолжало расти, но накладывалось ограничение на другие виды организации и обмена. При этом шло смещение функционала с РНК на белково-пептидные системы. Организация радиальной симметрии четырёхнуклеотидного алфавита в нуклеиновых кислотах позволяет перейти ко второй ключевой молекуле в живых системах — порфиринам.

1.12. Порфирины

Порфириновые гемы наряду с нуклеотидами являются одними из основных функциональных молекул жизни. Однако функционируют они в других полимерах — белках. Так как первичные полимеры жизни — нуклеиновые кислоты и их элементарные звенья — нуклеотиды функционировали в сахарной среде, то для оптимизации биохимического развития нуклеиновые цепочки захватывали противоположные сахарам аминокислоты. Таким образом, возникал очередной дуальный баланс, где с одной стороны были углеводы с кислыми группами, а с другой — аминокислоты с восстановительными [60]. То есть в среде при возникновении жизни был избыток сахаров, поэтому жизнь захватила и продуцировала белки. Аминокислотная среда быстрее осваивалась нуклеиновыми кислотами и эволюционировала интенсивней сахаров, при этом ключевые метаболические процессы происходили с сахарной средой, где выработались основные циклы и биохимические пути. Так как сахара в равной степени участвовали как в процессах анаболизма, так и катаболизма, аминокислоты, пептиды и белки получили ферментативный вектор развития. Белковые системы помимо структурно-функционального развития получили возможность взаимодействия с другими молекулами и включения их в свой состав. И здесь опять функциональную

роль может выполнять магнитное поле, которое флуктуировало наравне с флуктуациями гидросферы, выпадающей на поверхность Земли и испаряющейся в атмосфере [60; 73]. В конденсирующей и циркулирующей золь-пыль-геосфере часть нуклеиновых цепочек разрушалась в верхних слоях атмосферы под действием ультрафиолета, и азотистые основания могли служить источником пирролов. Вторым путём возникновения пирролов мог служить не внешний, средовой механизм, а внутренний биохимический, когда из полисахаридов, таких как слизевая кислота, при взаимодействии с аминогруппами и спиртовыми группами образуются пирролы. Однако возможен и прямой путь возникновения порфиринов из ароматических углеводородов вследствие воздействия повышенного магнитного поля, которое способствует аксиальной симметрии в организации молекул [9; 12; 14; 120]. То есть повышенное магнитное поле при ультрафиолетовой бомбардировке азотистых оснований могло способствовать радикальной симметрии в организации таких молекул, как коррины, корролы и порфирины. Эти молекулы в отличие от супрамолекулярных нуклеотидных аксиальных комплексов имели уже более жёсткую структуру. Как и в случае различных возможностей возникновения нуклеотидов, формирование порфиринов может происходить в других экстремальных условиях, например в геотермальных источниках с избытком продуктов серы. То есть возможности возникновения порфириновых молекул могут быть различными, и на сегодняшний день известны разные пути абиогенного синтеза данных молекул.

Однако для возможностей формирования полноценного гема необходимо ещё одно условие — встраивание металла в активный центр. И здесь наиболее вероятным выглядит встраивание иона металла в центр порфириновой молекулы вследствие растягивания её магнитным полем [180]. Таким образом, в формирующиеся или оказывающиеся в повышенном магнитном поле порфириновые молекулы встраивались ионы металлов, которые были в окружающей среде в избытке, — магний, железо и другие. Современные экспериментальные данные подтверждают функциональную связь свободных ионов металлов в биологических системах с колебаниями магнитного поля. Так установлено, что среди первичных микроэлементов со слабыми магнитными полями взаимодействуют Ca^{2+} , Mg^{2+} и K^+ [12]. Здесь следует обратить внимание, что это основные свободные элементы внутриклеточ-

ной среды. Кроме того, магнитное поле воздействует на белки непосредственно через активные центры — гемы. Современные магнетохимические методы также демонстрируют возможность возникновения порфириноподобных молекул вследствие функциональных связей с магнитным полем с непосредственным связыванием ионов металлов (рис. 11) [64]. Но самое главное — повышенное поле, в том числе посредством холловского эффекта, способствует именно транс-симметрии органических и биоорганических молекул (рис. 11) [64]. Существует также множество путей синтеза порфиринов из азотистых оснований нуклеотидов, в частности, из спиралевидных образований в виде G-тетрад [137]. Одним из очевидных факторов может являться ультрафиолетовое облучение, способствующее более жёсткой кристаллизации порфиринов из G-тетрад и возможных четырёхбуквенных прото-ячеек кода. Таким образом, нуклеиновые кислоты, синтезируя порфириновые гемы, при использовании ресурсов окружающей среды могли включать данные молекулы в свою структуру на начальном этапе развития РНК-мира. Причём данные порфирины первоначально могли являться побочным продуктом метаболизма и органическим субстратом, пока им не нашлось функционального применения. Впоследствии нуклеиновые кислоты, окружая себя белками и совершенствуя функции последних, связывали их с порфириновыми гемами и качественный функционал белков обогатился новым ароморфозом. Здесь также следует рассмотреть возможность выстраивания на поверхности нуклеиновых и белковых полимеров порфиринов как средство защиты от ультрафиолета, которое впоследствии приобрело энергетическую функцию.

Таким образом, магнитное поле было сильнее, что способствовало параллельному дрейфу молекул друг напротив друга. Сильное магнитное поле не давало им отталкиваться. То есть организация четырёхбуквенного кода могла происходить по биофизическому механизму и была первичной, а далее происходили усложнение нуклеотидных систем и дальнейшая эволюция. Важно отметить, что формирование четырёхбуквенных ячеек в принципе может происходить и без воздействия магнитного поля посредством других лимитирующих факторов среды, однако энергетическое, функциональное и структурное преимущество именно четырёхбуквенных радиальных структур не вызывает сомнения. В молекулярной эволюции биоты неоднократно возникали аксиально-симметричные структуры, играющие клю-

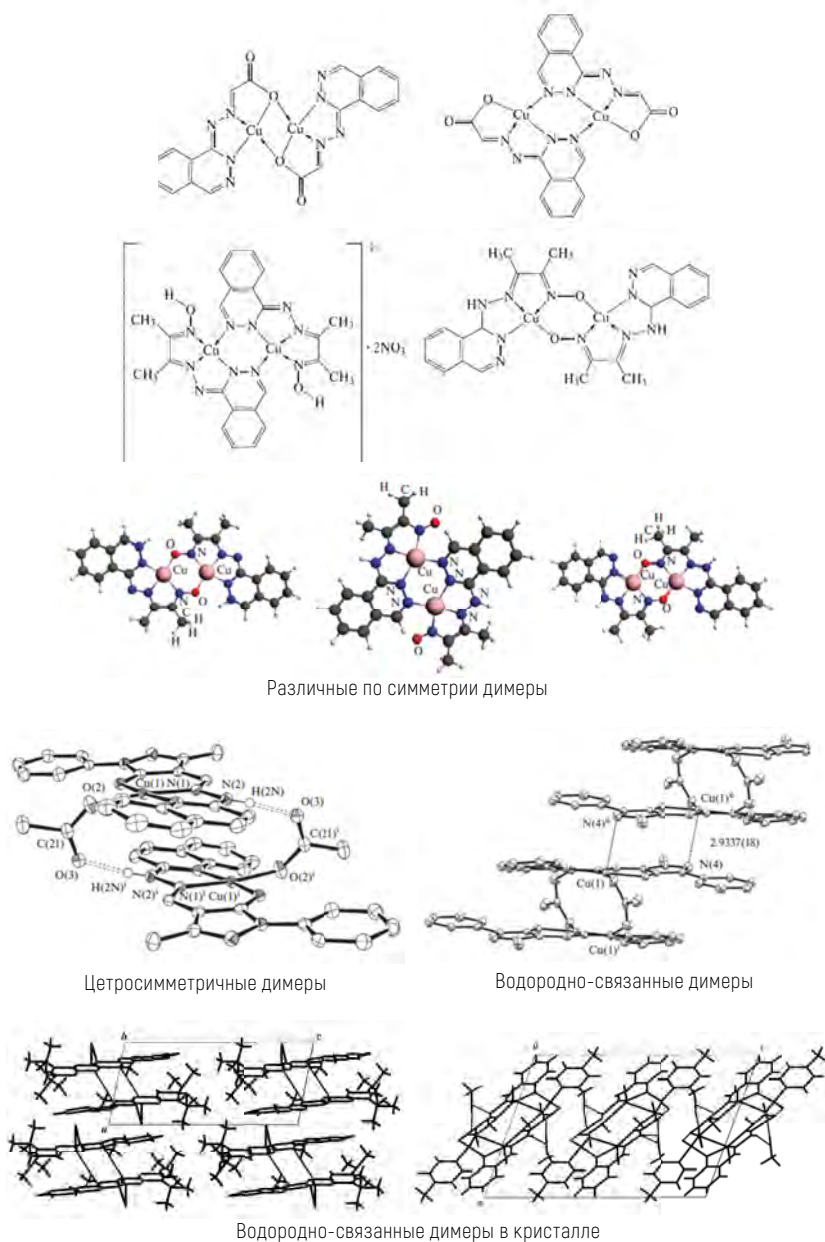


Рис. 11. Различные типы симметрии и укладки полимеров биоорганических молекул с использованием повышенного магнитного поля: димеры и их комплексы [64]

чевую роль в повышении функционала жизни. Например, «ротаторная» мембранная АТФаза, четырёхдоменные белки-катализаторы, апоптосомы, трилистники РНК-петель, имеющие четырёххосевую основу, и ряд других. Отличие возникновения четырёхбуквенного нуклеотидного комплекса от порфиринового гема заключается в том, что последний возникал в более ограниченных и жёстко детерминированных условиях среды, поскольку в слабом магнитном поле преобладают информационные параметры, способствующие развитию супрамолекулярных систем, а в сильном — энергетические. В связи с этим необходимо рассмотреть ещё один важный молекулярный ароморфоз в контексте изменения параметров магнитного поля Земли. Появление ядра и внутриклеточных органелл у эукариот рассмотрено в контексте концепций эндосимбиотизма и фагоцитоза. Однако возникновение незамкнутых цепочек нуклеиновых кислот в виде хромосом, обеспечивающих необратимость в развитии жизни обычно и обсуждается в контексте проблемы старения, а особенностям условий среды, обеспечивающей возникновение необратимости развития, уделяется меньше внимания. При этом совпадение времени формирования ядра Земли и эукариот обосновывалось интенсификацией магматических процессов [56; 70]. Вместе с тем формирование ядра Земли и связанные с этим перестройки обеспечивают изменение параметров гравитационного и магнитного полей. Изменение параметров магнитного поля могло способствовать организации новых симметричных ансамблей хромосом и их ассоциаций с гистонами подобно возникновению комплементарных пар и двойных цепочек нуклеиновых кислот на начальных этапах возникновения жизни. В свою очередь, помимо увеличения числа флуктуаций магнитного поля, интенсивность магматических процессов оказывает влияние не только на разрушение континуальных биотопов, но и на увеличение разделов фаз жидкость—газ, что интенсифицирует продукцию оболочек клеток: мембран, клеточных стенок. Одной из таких органелл является эндоплазматический ретикул, явно свидетельствующий об интенсификации процессов синтеза липидных оболочек. Таким образом, решалась проблема отделения продуктов метаболизма — консервации газов (кислород, диоксид углерода, метан, водород), кристаллических минералов (магнитосомы, минеральные скелеты) и одновременно ресурсов, необходимых для метаболизма, — компартментов живых систем. То есть эноплазматический ретикул — это первичный орнано-

минеральный комплекс, встроенный внутрь клетки. При этом основной активной единицей в данном субстрате опять являются рибосомы. В данном субстрате рибосомы выполняют функциональную роль, подобную клеткам бактерий в органоминеральном комплексе, мате или биоплёнке [56]. То есть на начальном этапе формирования жизни в РНК-мире роль протоклеток выполняли рибосомы, передвигающиеся как в жидкости, так и на поверхности субстратов [60]. И здесь появляется третий структурный тип в организации живой материи — переход к сферической симметрии. Этот переход, как и переход от трансляционной к радиальной, происходил через триаксиальную симметрию, являющуюся бифуркационной формой. Этот переход опять связан с увеличением амплитуды колебаний магнитных, электромагнитных полей, термоградиентов и химических флуктуаций. Так, из электрических эффектов известно стимулирование синтеза РНК [29]. Многократное испарение и выпадение на поверхность Земли воды с различными включениями в период 4,4–4,1 млрд лет способствовало интенсификации всех вышеперечисленных процессов. Причём в период ослабления магнитного поля при стабилизации скорости осаднения и выпадения осадка образовывалась золь-среда, а в повышенном поле — дискретная, где интенсифицировались электрические, электромагнитные и фотохимические процессы. Но ключевым фактором данных флуктуаций является стимулирование различных типов «клубок-стратегий» в полимерах РНК. Среди них клубок-спираль, клубок-катушка, многолучевые комплексы. Все данные типы, обусловленные включениями в РНК-молекулы различных других органических веществ, способствовали переходу к сферической форме организации. Затем вновь последовали трансляционная и радиальная симметрии.

1.13. Молекулярная самоорганизация и эволюция

Вопрос о том, появилась ли клеточная мембрана, когда ещё была только РНК или когда уже образовалась ДНК, остаётся открытым. Вероятнее РНК была уже в протоклетке, и приобретение специализированных молекул — ДНК и ферментов — способствовало тому, что в экологическом смысле такие более специализированные организмы активнее осваивали среду и вытеснили — полностью

подавили — организмы, имевшие только РНК без ДНК и ферментов. Вторым преимуществом ДНК являлись более точное копирование и синтез соответствующих органелл, включая мембрану посредством более точного и выверенного синтеза соответствующих белков. Средовым фактором появления ДНК опять выступает метеоритная бомбардировка. Поздняя бомбардировка отделяла РНК от субстрата, в связи с чем при существенном разнообразии РНК-молекул отдельные её фрагменты, попадая под ультрафиолет, приобрели более жёсткую структуру — ДНК. Структура ДНК, образующая устойчивые комплексы с пептидами, отличалась повышенной стабильностью. То есть реализация через протовирусный путь, когда молекулы ДНК и протовирусы возникали вне клеток и позже встраивались в клеточные протобионты. Однако вероятнее, что ДНК выработалась позже внутри клетки как консервативная система наследственности и необратимости развития. Вместе с тем протоклетка, в которой формировалась ДНК, была представлена изначально сахарными оболочками и стенками клеток. Вторая группа клеточных оболочек была представлена пептидами и простыми белками в РНК-пептидных системах. На базе второй группы сформировались РНК- и ДНК-вирусы. Оба пути также требуют дополнительных экспериментальных уточнений. В то же время возникновение ДНК и клеточной липидной мембраны может быть функционально и биохимически связано, и время их возникновения, очевидно, близко функционально вследствие синергичной обусловленности. Большинство авторов по реконструкции жизни ставят эти два этапа также достаточно близко по каскаду событий, но с начальным возникновением ДНК (рис. 12). По всей видимости, для возникновения и синтеза полноценной функциональной мембраны должна была быть сформирована полноценная система ДНК-РНК-пептиды для обеспечения всех функций метаболизма. РНК-пептидные системы также могли жить в сахарной среде и постепенно менять сахарную и пептидную оболочки на липидные. Первичные мембраны и оболочки протоклеточных структур, вероятно, состояли из сахарных оболочек, а по мере развития метаболизма переходили почти к полностью липидным. Об этом свидетельствует уменьшение доли полисахаридной стенки в клеточной оболочке в ряду грамположительные бактерии — граммотрицательные бактерии — эукариотические простейшие.

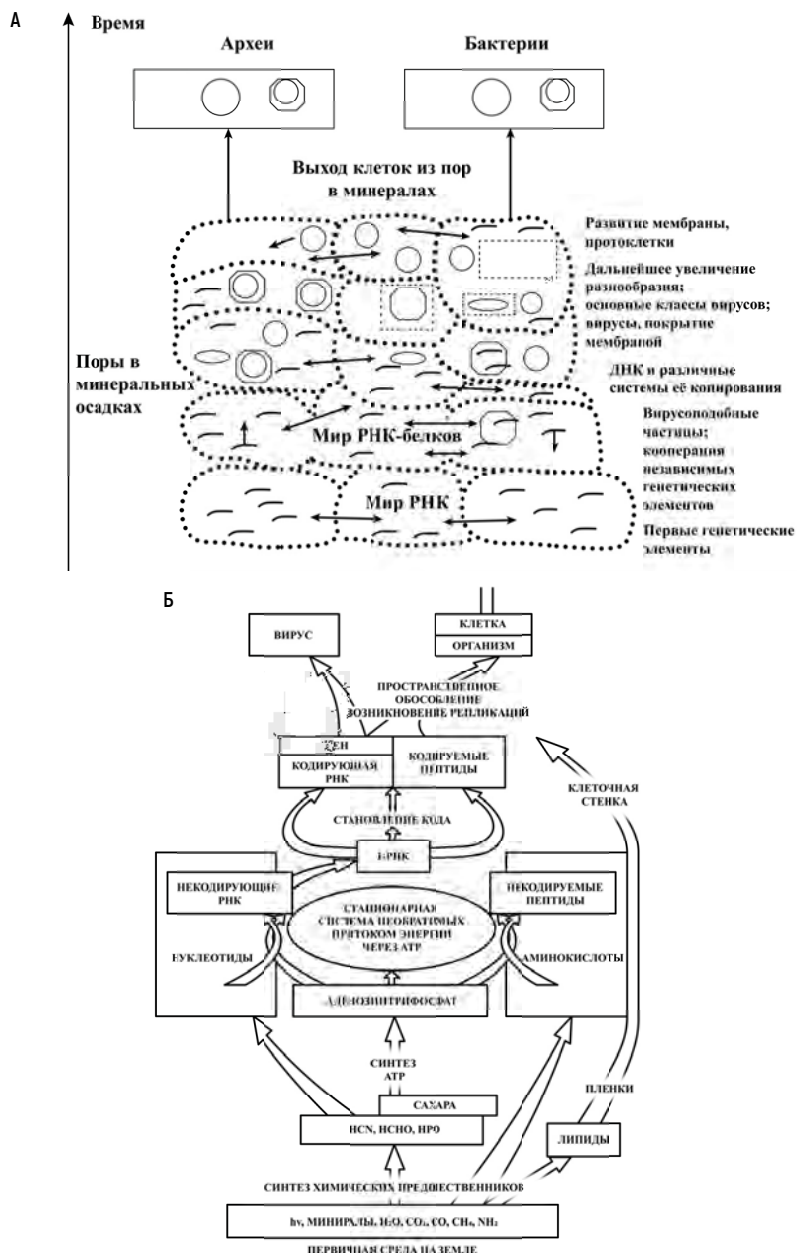


Рис. 12 [начало]. Реконструкция молекулярной жизни до клетки по представлениям различных авторов. А – эволюция сообщества генетических элементов и происхождение из него вирусов и клеток [автор М. Никитин [73]]; Б – схема начальной стадии эволюции жизни [автор Э. М. Галимов [32]];

B

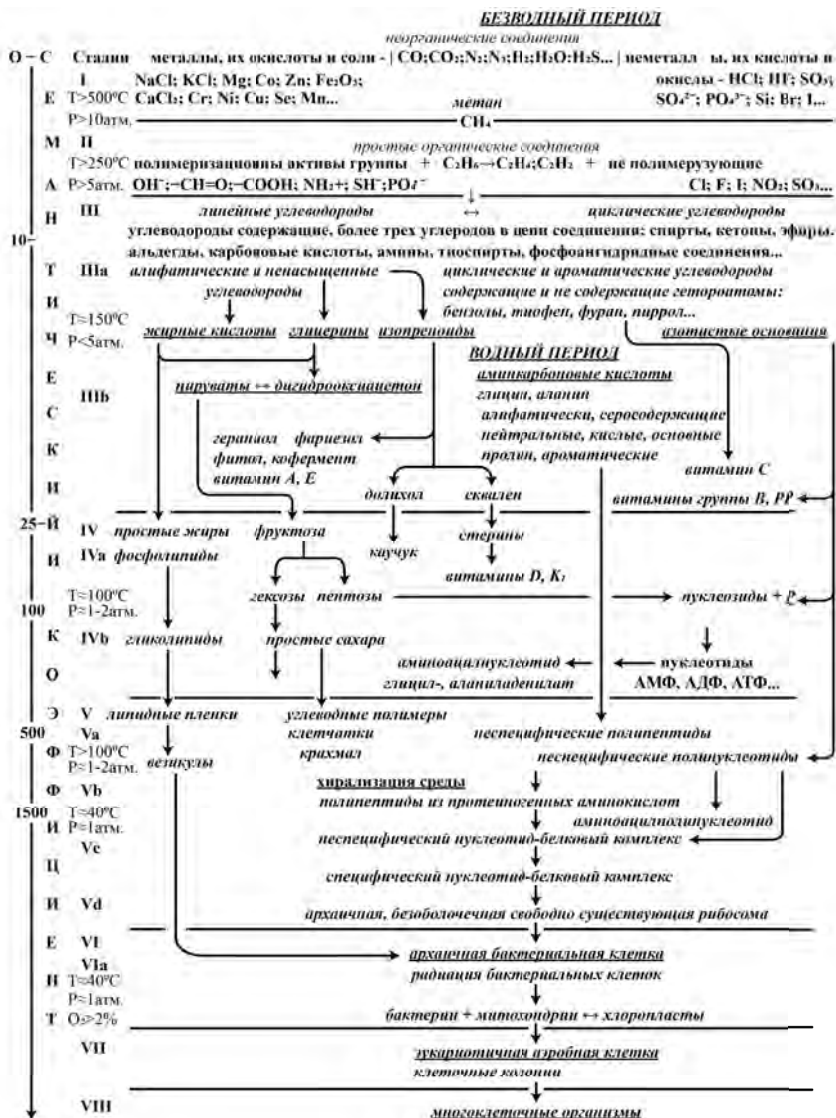


Рис. 12 (окончание). В – бесконечный период жизни [автор В. В. Яровой [124]]

1.14. Углеводная среда

Рассматривая концепцию мира РНК с экологических позиций, можно прийти к выводу, что аминокислоты и сахара являлись средой, необходимой для функционирования первичных нуклеиновых кислот. Данные биоорганические молекулы выполняли роль дуальной среды в виде положительно заряженных аминокислот и отрицательно заряженных сахаров. Третьей группой биоорганических молекул являлись жирные кислоты как предшественники липидов, однако данные полимеры метаболически наиболее отдалены от нуклеиновых кислот. Остаётся выяснить, какая из первых двух групп биоорганических молекул являлась наиболее значимой в мире РНК. С одной стороны, оба вида обмена, построенные на углеводах и аминокислотах, взаимообусловлены. С другой стороны, в неравновесной среде один из факторов должен быть наиболее значим. Факторы углеводной [201], жирнокислотной [174] и аминокислотной [115] среды для возникновения жизни уже рассматривались различными исследователями. В 1980-е гг. А. Л. Вебером была предложена гипотеза сахарного мира, связанная с формамидным и формальдегидным субстратами [201]. Позже Э. М. Галимовым данная гипотеза была доработана в части теоретических обоснований возникновения нуклеотидов [32]. Одновременно с этим экспериментальные данные подтверждали прямую связь нуклеотидов и их последовательностей в построении полисахаридов [114]. Кроме того, одним из главных свидетельств роли сахаров в возникновении нуклеотидов и их последовательностей является присутствие сахара в самом нуклеотиде. Ещё одним из свидетельств ведущей роли углеводов в формировании нуклеотидов и их последовательностей является совпадение хиральности сахаров и нуклеиновых кислот в противовес обратной хиральности аминокислот. Белки эволюционируют вместе с нуклеиновыми кислотами, усложняя структурное разнообразие самих живых организмов, тогда как сахара эволюционируют не настолько интенсивно и разнообразно, являясь при этом постоянным субстратом. Опыты по культивированию молекул РНК и их колоний выявили первичную необходимость углеводной среды в виде агарозы при наличии праймеров и репликазы для их копирования [112]. То есть развитие и построение нуклеиновых кислот РНК также происходит в сахарной среде [112]. К вопросу о функциональной роли

среды: сахара и полисахариды наилучшим образом подходят для разрушения ещё не окисленных минералов, из которых биоте необходимо получать микроэлементы, в первую очередь в виде фосфора. Полисахаридное биовыветривание также способствует извлечению из минералов металлов необходимых в построении гемов и негемных белков [6; 59]. В свою очередь аминокислоты в аминокислотах, повышающие рН, также способствуют выщелачиванию горных пород и минералов. Компенсаторная теория построения клеточной среды при избытке внутри клеток калия над натрием и кальция над магнием в противовес морской среде также свидетельствует об избытке сахаров в мире РНК в окружающей среде [101], так как углеводов по сравнению с белками прокариоты содержат в наименьшем количестве. Наконец доля сахаров в клеточной стенке увеличивается на пути к более предковым формам и самым ранним первичным организмам. Так, у прокариот доля сахаров в клеточной стенке значительно превосходит долю таковых у эукариот. В свою очередь, у более древних и консервативных грамположительных прокариот доля углеводов в клеточной стенке значительно превалирует над долей углеводов у более прогрессивных форм — грамотрицательных бактерий. То есть можно предположить, что изначально первичные РНК-организмы создавали оболочку протоклеток из сахаров окружающей среды, а также могли синтезировать и выстраивать вокруг себя чехол из полисахаридов. По мере дальнейшей эволюции в полисахаридный чехол протоклеток встраивались жирные кислоты, липиды, пептиды и белки. И наконец, в аспекте основных путей обмена первичными и наиболее функционально значимыми опять являются углеводы. Так, основные первичные метаболические циклы и пути (Вуда — Веркмана, Вуда — Льюнгдала, Кребса, Кальвина, пентофосфатный и т. д.) связаны с сахарами и углекислотой и базируются на углеводном обмене. То есть первый метаболизм или гиперцикл выстраивался в среде сахаров. При этом в части катаболизма функционирует два пути, направленные на образование различных субстратов: из пуринов образуются сахара, а из пиримидинов — аминокислоты, где опять наблюдается дуальный баланс продуктов метаболизма нуклеиновых кислот. При этом также наблюдаются и другие метаболические пути, тогда как при синтезе нуклеотидов также реализуется обратный путь — из пиримидинов образуются сахара, из пуринов — аминокислоты [168]. В этом дисбалансе проявляется

метаболическая асимметрия, важным аспектом которой является избыток аминокислот.

1.15. Оптимальная и экстремальная среда для первичных биополимеров

Открытыми остаются вопросы среды в отношении формирования клеточных оболочек. Клеточная липидная стенка возникала либо по мицеллярному типу в жидкой среде, либо механическому в газодисперсной — путём разрыва континуальных органических плёнок вследствие механических, ударно-волновых эффектов, которые также могли способствовать смене концентраций вещества и изолировать протоклетку в газовом пространстве [82; 98; 101]. Оба этих фактора среды способствовали ограничению времени жизни клеток и одновременному распространению по средам обитания. Вероятно, имел место и первый и второй путь, что проявлялось в разных фазах самоорганизации жизни при одновременном функционировании фазы золь-геосферы, но это также требует экспериментальных проверок. И существует другой путь, когда РНК-система оказывалась в средах с ограниченным количеством органического вещества в виде пищевых ресурсов и условия способствовали тому, что у неё возникала мембрана. То есть РНК-информационная система должна была упорядочивать пространство органической среды в виде ресурсов вокруг себя. РНК-нуклеотидные полимеры в специфичных межфазных условиях могли формироваться в глобулярные структуры, где внешняя поверхность глобулы была представлена азотистыми основаниями [60; 62]. Таким образом, условия при количественном увеличении разделов фаз и изменении концентраций органических веществ должны были способствовать глобулярному, сферическому центрально-симметричному типу самоорганизации. При этом РНК-полимеры обладали уже всеми типами симметрии в виде трансляционной/переносной симметрии, образующейся при полимеризации и представленной собственно нуклеиновой кислотой; радиальной симметрией, представленной петлями и трилистниками; билатеральной симметрией, представленной комплементарностью нуклеиновых кислот с функциональными

концами; и сферической симметрией, характеризующейся способностью РНК образовывать глобулы (рис. 13). Создание РНК-миром

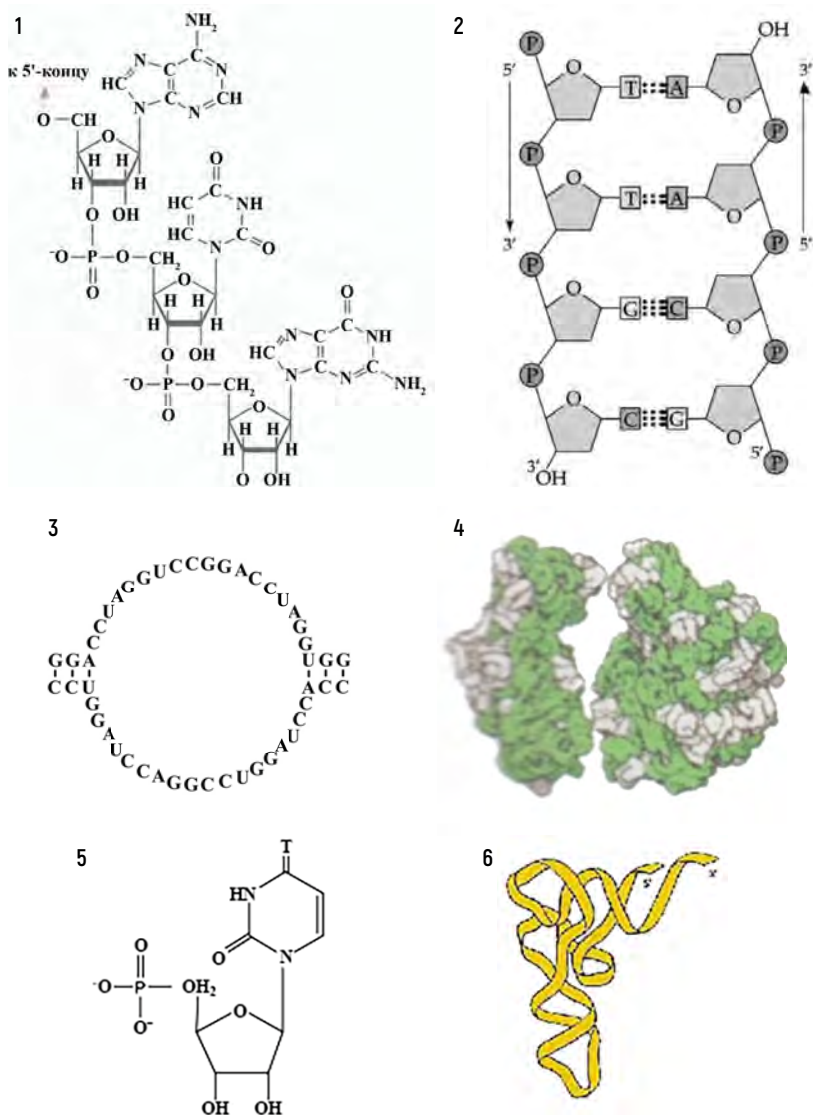


Рис. 13. Различные по типу симметрии укладки РНК: 1 – переносная или трансляционная симметрия; 2 – двусторонняя симметрия; 3 – радиальная симметрия (кольцевая РНК); 4 – сферическая трёхмерная симметрия (рибосома). Асимметричные элементы РНК: 5 – нуклеотид; 6 – трилистник РНК

более специализированных структур в виде ДНК, хранящей и более жёстко регламентирующей информацию, и белков, создающих более сложные структуры, интенсифицировало и увеличило функционал жизни.

1.16. Протоядро

В развитии жизни на различных уровнях организации повторяются схожие структурные формы, зачастую с различной функциональностью. В связи с этим следует рассмотреть концепцию протоядра, то есть появления условного центра у нуклеиновых кислот. Протоядро — это центральный или центрально-лучевой тип симметрии, где в центре находится участок многолучевой молекулы РНК с белком по типу рибосом, полимераз и других глобулярных функциональных белков. Причём эти белки и пептиды также в зависимости от условий могли передвигаться по нуклеотидной цепочке, синтезируя соответствующие молекулы и увеличивая биомассу биоорганических молекул. Фибриллы нуклеотидных полимеров также могли скручиваться и закручиваться по типу «клубок-катушка» [82]. Но окружающий нуклеиновые цепочки средовой баланс должен содержать и положительные аминокислоты с пептидами и белками, и отрицательные моно- и полисахариды. Поэтому можно предположить функциональную дифференцировку РНК на участки или молекулы, специализирующиеся на сборе органики и системах самокопирования. Для интенсификации синтеза и фиксации строительного материала РНК-полимеры могли «таскать» с собой аминокислоты и пептиды на функционально значимых участках полимера, а передвигаться могли в среде моно- и полисахаридных комплексов. Центрально-лучевая система симметрии нуклеиновых кислот в виде «клубка» характеризуется векторным типом развития и при этом может обеспечить переход к центральной шарообразной симметрии как энергосберегающей форме самоорганизации (Яровой, 2005). То есть РНК или протонуклеиновая кислота должна была попасть в такой комплекс условий органической среды (аминокислоты, углеводы, липиды), чтобы получить векторную область развития, дискретную область развития и необратимую область развития. Таким образом, проторибосомы и можно представить некоторым

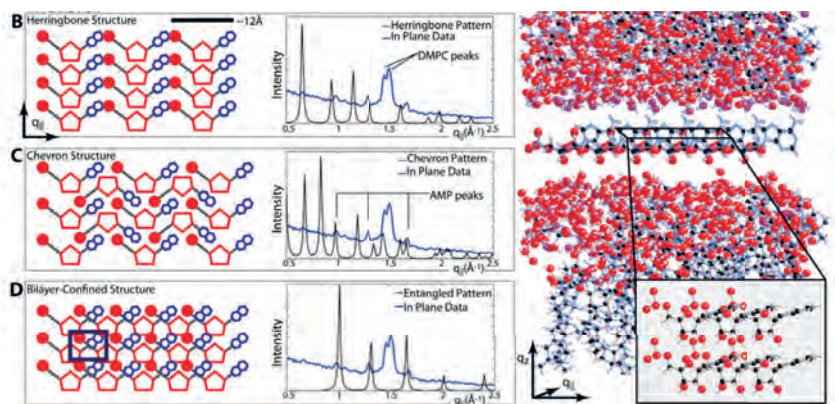
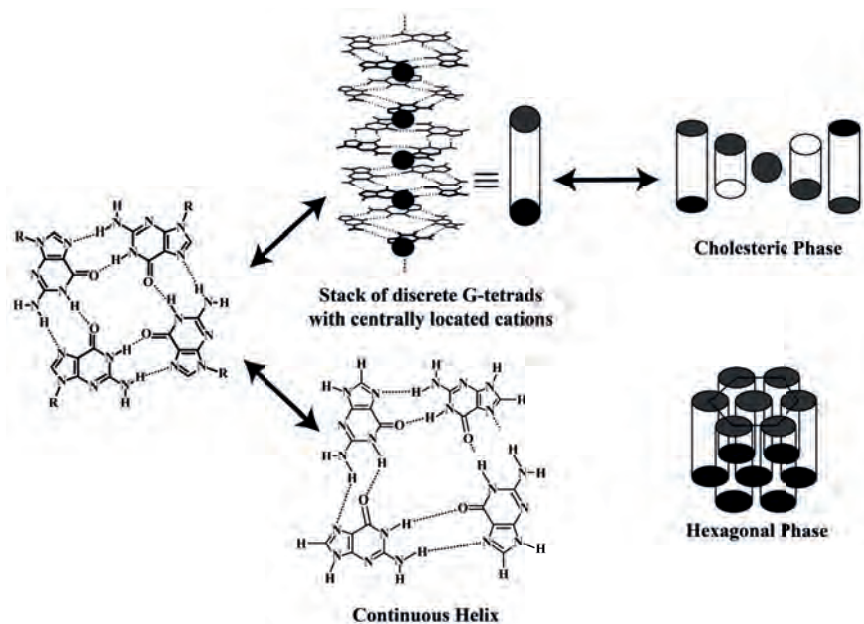


Рис. 14. Цилиндрические нанотрубки на основе гуанозинмонофосфата (ГМФ) и различные по типу укладки слои из аденозинмонофосфата (АМФ): С – шеврон-структуры, В – херингбон-структуры, С – шеврон-структуры, D – бислойные структуры [137; 195]

протоядром первичных клеток или протобионтов. Данные сферические РНК-полимеры осуществляли синтез белков и других полимеров и в отличие от настоящего ядра, ограниченного клеточным скелетом, могли передвигаться по органической среде обитания. Магний, способствующий сворачиванию клубка из РНК-полимера и избыточный в водной среде, был минимизирован впоследствии внутри клетки. Предположение о способности РНК образовывать полимеры с мицеллярным типом самоорганизации было разработано нами теоретически [60] и независимо получено экспериментальным путём [137; 195] в ходе работы с мономерами пуринов (рис. 14). Было установлено, что ГМФ и АМФ образуют вертикальные трубочки на поверхности воды, а также обладают некоторой потенцией к мицеллярному типу организации.

1.17. Протомембраны

РНК-протобионты в изменениях межфазных балансов среды, в механохимических и фотохимических условиях продолжали путь самоорганизации до появления двух главных аспектов дискретности — биохимического гиперцикла и протоклетки. Эти преобразования обусловили необратимость развития новой формы материи. Под биохимическим гиперциклом подразумеваются первичные пути обмена: пентозофосфатный цикл, цикл Кальвина, цикл Вуда — Льюнгаля, цикл Вуда — Веркмана и т. д. Но данные биоорганические реакции должны быть изолированы в среде. В этих биохимических реакциях в присутствии РНК-молекул происходила фиксация углерода и других элементов, необходимых для обмена, а отдельные нуклеотиды, служащие строительным материалом, впоследствии стали выполнять энергетическую функцию (АДФ, АТФ). Фотохимические и термические реакции привели к захватам в порфириновые гемы, входившие в РНК-молекулы ионы магния и железа, в избытке находящиеся в среде и обеспечившие в дальнейшем регулировку фотохимических реакций. Первой протоклеточной оболочкой при этом и могла служить сама полимерная молекула РНК, затем функции клеточной оболочки выполняли олиго- и полисахариды, и наконец липидная мембрана явилась третьим эволюционным аро-

морфозом. Данная закономерность наблюдается у мембран более древних прокариотов, имеющих в своём составе полисахаридные каркасы. При появлении полисахаридной оболочки моносахариды оказывались внутри протоклеток, в которых также закрепился первый гиперцикл обмена и появился первый и второй компонент дискретности жизни. Липиды же могли быть построены постепенно путём подбора из отдельных компонентов по подобию структуры и функциональной полярности самих молекул РНК. Жирные кислоты, аминокислоты, нуклеотиды также оказывались внутри углеводной оболочки, а ионы металлов могли направляться внутрь протоклетки путём окисления кристаллических решёток посредством тех же полисахаридов. Таким образом, биохимические циклы обмена, необходимые для аккумуляции углерода, возникли, когда РНК смогли выстраивать вокруг себя структурированный полисахаридный, а позже пептидогликановый каркас. Но до появления липидных и сахарных оболочек клетки РНК-полимеры эволюционировали в сторону глобулярных структур по типу «клубок-катушка», наращивая вокруг себя более структурно и метаболически организованную массу собственных полимеров. Экспериментальным примером могут служить колонии А. Б. Четверина, в которых РНК-полимеры могут из себя выстраивать очень большие сферические агрегаты. После чего внутри крупных полимерных глобул мицеллярного типа началось разделение на более дискретные фрагменты РНК-полимеров вплоть до отдельных нуклеотидов, которые служили источником для первичных биохимических реакций. Но для этого были необходимы вспомогательные полимеры в виде ферментов и рибозимов, состоящих из тех же рибонуклеиновых кислот. Когда вспомогательные полимеры были построены и весь метаболический цикл построения и распада был выверен и сбалансирован, стал выстраиваться путь полисахаридной и липидной мембраны.

Таким образом, глобальным фактором постоянства условий в виде циркуляции дискретной золь-геосферы служила Луна, а метеоритная бомбардировка обеспечивала увеличение дискретности и неоднородности среды для формирования жизни: включение в состав дискретных водных и органоминеральных комплексов различных соотношений жирных кислот, углеводов, аминокислот и других органических и биоорганических молекул. Эти различные по содержанию органические смеси в результате ударно-волновых механизмов могли также извлекаться

из геотермальных источников и смешиваться друг с другом. При этом формирование из неравновесного мономера — нуклеотида полимерных нуклеиновых кислот также могло обеспечиваться гидромеханическими неоднородностями, вызываемыми метеоритами и постоянным перемешиванием органоминеральной геосферы. Возникали специфические условия для формирования азотистых оснований на базе формамидов, формальдегидов, цианистого водорода, сахаров, что уже подтверждено рядом экспериментальных проверок [166; 177; 181]. На сегодняшний день необходимо проверить возможность существования и функционирования иных по структуре нуклеотидов, условия их возникновения и предрасположенность к дальнейшей самоорганизации. В проблеме возникновения жизни осталось установить особенности условий для сборки нуклеиновых кислот из отдельных нуклеотидов, пределы разнообразия и функционирования азотистых оснований и самих нуклеотидов при возникновении в среде и первичный синтез молекул ДНК из РНК. В последнем случае некоторые механизмы у современных организмов уже установлены. Далее останется экспериментальное изучение микроэволюции молекул РНК, некоторые методы для которого уже разработаны.

ГЛАВА 2

Методы искусственного получения биологических молекул и протобионтов

2.1. Получение липидов и липидных сред

2.1.1. Получение липидов

Несмотря на то, что липидный мир рассматривался некоторыми исследователями как исходная среда для возникновения жизни [174], липиды являются скорее вторичной структурой или продуктом, играющим больше средовую роль, а не функциональную. Этому положению способствует ряд причин. Во-первых, липиды не относятся к биологическим полимерам в отличие от сахаров, белков и собственно нуклеиновых кислот. Во-вторых, в вирусах и в самых архаичных прокариотах (грамположительных бактериях) количество липидов в клеточной стенке минимально. С другой стороны, липидные мембраны — это буферная основа всех клеток и большинства клеточных органелл. Также липиды участвуют во многих процессах обмена биологических систем. На практике разработаны такие способы получения липидов, как гидрогенизация, переэтерификация и ферментативный синтез. Исходным небιологическим сырьём могут являться углеводороды, которые путём окисления и гидрокарбокислирования при

понижении температур от 150 до 105 °С и повышенном давлении синтезируются в липиды. В некоторых случаях в качестве катализаторов используют такие металлы, как марганец, кобальт и др. Переэтрификация протекает при более низких температурах — 30–60 °С. Данные технологические процессы касаются получения различных форм и смесей жиров и их продуктов. В аспекте рассматриваемой нами проблемы более важным является не получение липидов как таковых, а создание липидных сред, в которых можно экспериментально апробировать различные условия абиогенеза. Разработка метода культивирования молекул в двумерных плёнках с использованием различных концентраций и составов поверхностно-активных веществ очень актуальна. Данный метод позволит изучить возможности формирования и развития аксиальных молекулярных комплексов и ансамблей, а также проверить возможности возникновения генетических кодов из четырёх и более букв. Кроме того, это позволит заложить техническую основу создания новых форм материи и изучения процессов самоорганизации в двумерных условиях.

2.1.2. Метод плёнок

В микробиологии используется метод культивирования организмов в плёнках воды и капиллярах. Метод культивирования в плёнках модернизировался в биотехнологический приём флотации, используемый при культивировании дрожжей [96]. В свою очередь, капиллярный метод, применяемый Д. Г. Звягинцевым [48], Б. В. Перфильевым [81], по большей части так и используется в научно-исследовательских целях. Мы попытались адаптировать метод культивирования в плёнках и капиллярах для биологических молекул. Метод плёнок и капилляров в 1960–1970-е гг. начал периодически применяться в микробиологии для изучения особенностей развития и фиксации микроорганизмов [5; 6; 48; 80; 81]. Однако данные методы, особенно выращивание в плёнках воды, не были достаточно развиты и проработаны в микробиологии, за исключением частных случаев, связанных с фиксацией и подсчётом бактерий. Наиболее разработанным считается метод заселения стеклянных капилляров микроорганизмами в природной среде водоёмов донных отложений, которому посвящены две монографии Б. В. Перфильева [80; 81]. Нами было предложе-

но использование метода плёнок воды для изучения структуры и функционирования биологических молекул, а также для изучения изоляции и стерильности плёнок в отношении миграции микроорганизмов. Были разработаны специальные подложки для жидких плёнок. Плёнки выстроены в виде секторов, где можно брать пробу из каждой ячейки. Также эти сетки со секторами из плёнок воды должны иметь несколько ярусов, несколько оболочек в виде «матрёшки», чтобы изолировать от окружающей воздушной среды, засорённой спорами и молекулами, внутри расположенные слои с плёнками воды (рис. 15). Принцип сбора проб для дальнейшего исследования заключается в том, что специальным дозатором отбирается участок плёнки воды с соответствующими органическими веществами и накладывается на гелевую дорожку для дальнейших исследований. Эти отборные дозаторы, в свою очередь, позволяют открывать пространства, ограниченные плёнкой, в необходимом месте и снимать пробы с последующих нижележащих слоёв. Вариант 2 на рис. 15 представляет собой горизонтальные слои сеток в виде прямоугольников с вертикальными бортами, создающими барьеры. С помощью

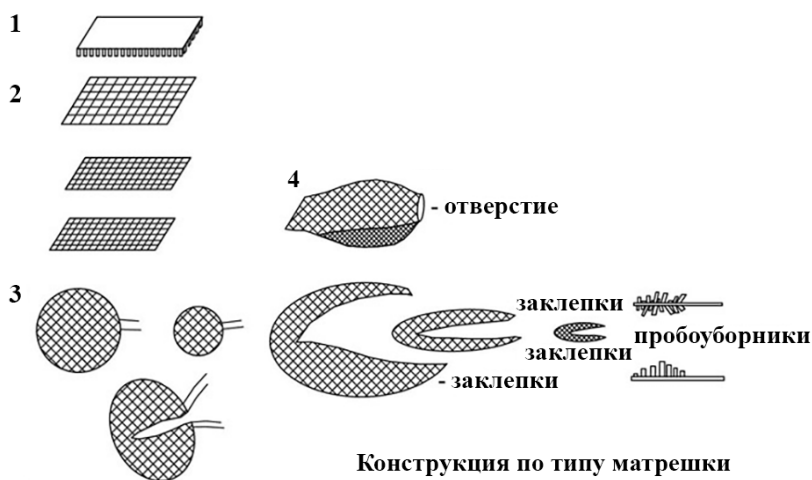


Рис. 15. Сетчатые подложки для нанесения плёнок воды с органическими веществами, биологическими молекулами и микроорганизмами: 1 – палочки-пробоотборники на верхней подложке позволяют снимать плёнку в необходимом месте, в том числе в нижних слоях; 2 – слои с различными ячейками для плёнок; 3 – сферические слои разного размера, сформированные по типу «матрёшки» и позволяющие наносить плёнку с необходимыми веществами на внутренние и внешние части сферы; 4 – изолированная сфера в виде «кошелька» с закрывающимся отверстием

пробоотборников с соответствующим адсорбентом можно отбирать сначала верхние, потом более нижележащие слои плёнок и исследовать количественные и качественные характеристики молекулярного состава плёнок. Этот многослойный вариант позволяет экранировать не только механическое напыление молекулярными веществами, но и экранировать от других физических воздействий, например ультрафиолетового излучения, что актуально для РНК-мира. Вариант 3 на рис. 15 представляет собой сферу, внутри которой размещена ещё одна сфера, а за ней ещё одна. Сферы соединяются между собой заклёпками, создавая таким образом препятствие для окружающей среды. Вариант 4 рис. 15 представляет собой ограниченную среду в виде «кошелька» с входной частью, которую можно будет открывать с одной стороны и таким образом снимать пробы плёнок с внутренней стороны, не разрывая поверхностные слои плёнок. Преимущество сферической и кошельковой формы для изучения РНК-мира и мира нуклеотидов (мир nt) заключается в том, что в данных сферических формах можно смотреть не только горизонтально функционирующие плёнки, но и на вертикальные, не нарушая внутреннюю стерильность. Наши исследования показали, что плёнки воды на данных субстратах могут сохраняться от нескольких минут до 2–3 ч (табл. 1). При этом время «жизни» отдельных пузырьков в различных водоёмах также варьирует. Время сохранения плёнки воды в круглых ячейках диаметром 1 мм из данных водоёмах варьировало от 2 с до 22 мин. Плёнка воды из аквариума, взятая в несколько большем объёме, сохранялась до разрыва вследствие высыхания по истечении 2–3 ч. В зависимости от состава органических веществ, входящих в плёнку воды, можно менять время экспозиции. Сферические ёмкости, представляющие собой барьеры для биоты и органики из окружающей среды, должны быть сделаны из металла, чтобы их прокалывать по типу микробиальной петли с использованием пламенной горелки. Металл или сплав, используемый из сферических сеток перед накладыванием на него плёнок с органикой, должен быть исследован после сжигания этих плёнок на предмет взаимодействия данного металла с соответствующим составом в части вступления данных металлов в органические соединения. После определения всех типов органических веществ, полученных после прокалывания и сжигания органики горелкой на металлическом каркасе, можно ставить специальные эксперименты с этой органикой

Таблица 1

Количество и время «жизни» пузырьков из различных водоёмов

Озеро	Размеры пузырьков и количество			Общее количество пузырьков	Среднее время лопанья пузырьков
	1 мм, шт.	2 мм, шт.	3 мм, шт.		
Большое Солёное Лафетное	1	–	–	1	1 мин 38 с
Окунево 5	–	1	1	2	7 мин 16 с
Спорное 7	3	–	–	3	10 мин 10 с
Спорное 9	3	–	–	3	9 мин 39 с
Малые Култайки	5	–	–	5	2 мин 36 с
Песчаное 1	–	4	1	5	2 мин 49 с
Кичкибиз 4	–	–	5	5	9 мин
Чесноки	4	2	–	6	2 мин 43 с
Фреликово	–	8	–	8	10 мин 14 с
Куликово	4	4	2	10	1 мин 40 с
Кайсан	8	–	2	10	3 мин 4 с
Окунево	6	3	1	10	3 мин 50 с
Солёное Новомосковское	8	–	2	10	9 мин 41 с
Хомутинино 4	10	2	1	13	2 мин 40 с
Солёное Песчаное 3	8	4	1	13	6 мин 28 с
Солёное Большое Карабай	8	4	1	13	6 мин 49 с
Спорное 3	9	3	1	13	9 мин 23 с
Хуторка 3	9	5	–	14	10 мин
Хомутинино 3	11	3	–	14	3 мин 16 с
Лаврушино	15	–	–	15	1 мин 44 с
Солёное Песчаное 1	8	7	–	15	2 мин 23
Линейское	15	3	–	18	6 мин 22 с
Новомосковское маленькое	15	–	5	20	3 мин 35 с
Камышное	30	–	–	30	1 мин 40 с

на предмет различных взаимодействий и реакций. Протоколы зафиксированных соединений, полученных при сжигании, необходимо иметь на начало эксперимента. Использование каркасных сеток из пластика и других материалов для наложения на них органических и биоорганических плёнок не приемлемо по причине невозможности их полной стерилизации от биологических и биоорганических объектов. В случаях, где стерилизация не тре-

буется, сетчатые каркасы из пластика могут быть использованы и имеют ряд преимуществ, например большая гибкость и пластичность по сравнению с металлами и сродство с определёнными видами органических веществ. Также на пластиковые каркасы можно накладывать специальные адсорбенты, иммобилизаторы и гели, используемые для метода культивирования молекулярных колоний. Стекло в качестве сетчатого каркаса для плёнок воды также может быть применимо в связи с возможной стерилизацией стекла. При этом необходимо создание специальных каркасов из стекла, поддерживающих плёнку. Важным аспектом данного экспериментального направления исследований является необходимость разделения сторов с плёнками с различным органическим составом. Для этого необходимо создание ячеек, блокирующих переход жидкости с одной плёнки на другую. Это может быть решено путём создания поперечных гидрофобных барьеров, вертикальных по отношению к горизонтально экспериментируемой плёнке воды. В этом случае недостатком метода является быстрая испаряемость воды с плёнки в силу её малого объёма. Преимуществом, в свою очередь, является возможность выдерживать чётко заданную временную экспозицию, так как в случае культивирования молекул и микроорганизмов на больших сферических площадях жидкость стекает с вертикальных поверхностей на горизонтальные.

2.1.3. Метод пены

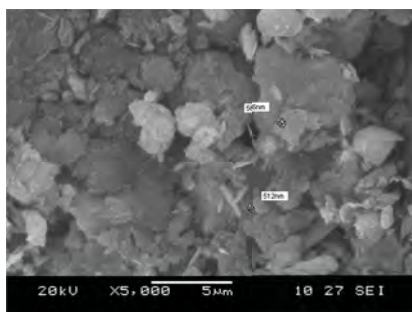
Если методы культивирования и изучения реакций в плёнках воды с различным гидрохимическим составом являются аналогом классических лабораторных методов в рамках редукционизма, то метод культивирования в пене является более многофакторным и приближённым к природным условиям. При этом данное направление является также очень широким — можно создавать методы динамической пены, стационарной пены, взаимодействия пен с разным гидрохимическим составом и т. д. Главное преимущество метода пены состоит в том, что в нём можно изучать динамику функционирования протобиотических молекул и нуклеиновых кислот в более сложных условиях, вероятно, приближённых к среде абиогенеза. В сферических и горизонтальных многослойных конструкциях условия более

стабильны, стационарны, при этом в них проще контролировать ограничение пространства, создавать буферные и изолированные среды. В среде пены происходит постоянная миграция воды и органических веществ в трёхмерном пространстве. Вода в процессе функционирования пены стекает вниз, верхние слои высыхают, при этом состав компонентов биотической среды в пене разных горизонтов различный. Так, нами установлено, что в верхних слоях пены накапливаются хитиновые панцири водных беспозвоночных, а состав бактерий в верхних и нижних слоях отличается. В верхних слоях пены озера Большой Кисегач обнаружены *Exiguobacterium acetylicum*, *Pseudomonas alcaligenes* и *Pseudomonas anguilliseptica*, а в нижних — *Bacillus licheniformis*, *Pantoea agglomerans* и *Exiguobacterium acetylicum*. Аналогичная картина наблюдалась и в горизонтах пены озера Глубокое. Создание пенных сред может быть реализовано в форме: 1) пенных столбов в цилиндре, 2) пенных агрегатов на экспериментальных подложках; 3) пенных слоёв в специальных резервуарах. Пену можно дифференцировать по слоям и снимать тонкой трубкой отдельные слои внутри, меняя гидрофильность и гидрофобность самого пробоотборного субстрата. То есть можно погружать внутрь пены гидрофобный инструмент на определённый уровень пены, далее из инструмента должен вылезать гидрофильный элемент адсорбировать воду и ПАВ, собирать её, опять погружаться внутрь и таким образом извлекать образец. При этом металлический пробоотборник можно обжигать, удаляя органику. Этот пробоотборник может содержать: 1) специфичный адсорбент; 2) протыкаться через резиновый изолятор; 3) работать по типу шариковой ручки; 4) работать по типу насоса или микродозатора. Последний вариант наиболее оптимален, так как может позволить отбирать достаточную по объёму пробу. Методы отбора проб должны лимитироваться минимальным объёмом пробы, необходимой для хроматографической колонки или других методов анализа.

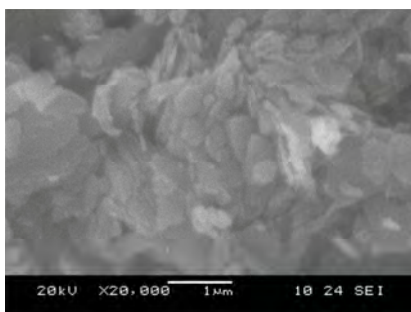
2.1.4. Минералы на плёнке воды

На плёнке воды также могут быть закреплены глинистые минералы и другие минеральные частицы. Частицы глинистых минералов в нанометровом и микрометровом диапазоне могут удерживаться поверхностной плёнкой воды. Таким образом, мож-

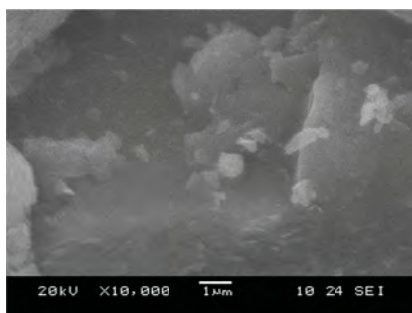
но соединить минеральную поверхность в качестве катализатора биохимических реакций и раздел фаз в виде поверхностной плёнки воды. Для этого также необходимо подбирать минеральные частицы по размеру и форме (рис. 16). Эти частицы могут иметь форму пластинок подобно глинистым минералам, могут иметь вытянутую форму подобно природным нитчатым минералам или искусственно синтезированным нанотрубкам. Варьирование размеров минеральных частиц, насаживаемых на плёнку воды, может позволить создавать различные по частоте и плотности сгустки и агрегации, причём в двумерном пространстве. Использование фибриллярных минеральных частиц позволит ещё более качественно управлять процессом распределения органических и минеральных комплексов на двумерной поверхности. За счёт большей удельной поверхности нитчатых и фибриллярных минералов такой формы частицы могут дольше удерживаться как



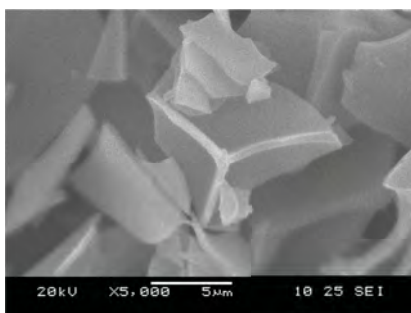
Частицы каолинита нанометрового размера в смеси



Глауконит нанометрового размера

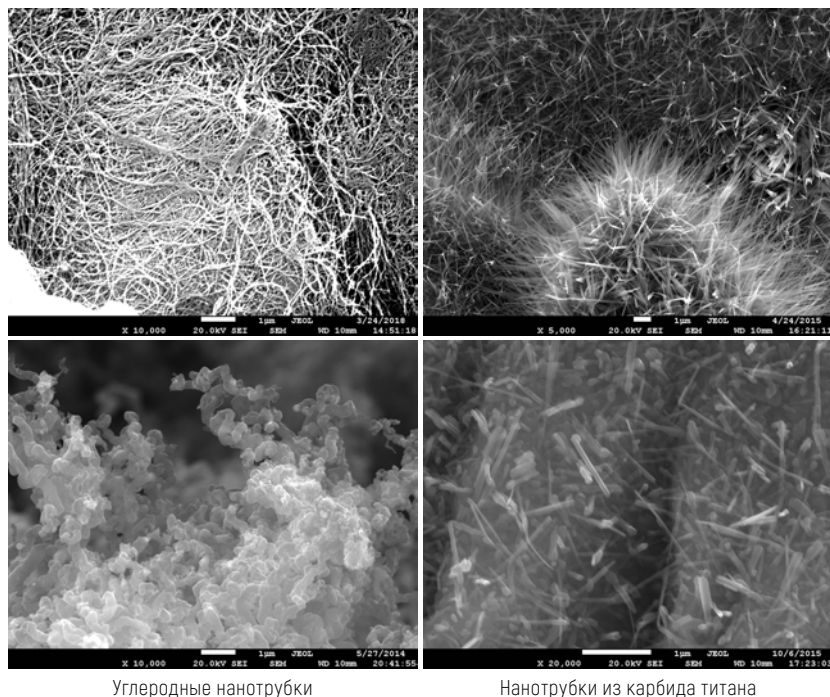


Бентонит (монтмориллонит) нанометрового размера



Пластинки перлита

Рис. 16 (начало). Глинистые минералы и горные породы нанометрового и микрометрового размера и искусственно полученные нанотрубки



Углеродные нанотрубки

Нанотрубки из карбида титана

Рис. 16 (окончание)

в воздухе, так и на поверхностной плёнке воды. На рис. 16 видно, что природные глинистые минералы формируют пластины толщиной в сотни нанометров. Это важный метод в модификации среды, который должен быть использован в моделировании и экспериментах по построению предбиотических и биотических молекул. Толщина плёнок воды, составляющая нанометры и десятки нанометров, может быть увеличена на несколько десятков нанометров при внесении в плёнку углеводов. При подборе природных глинистых минералов необходимо учитывать степень их гидрофильности и гидрофобности. Это касается и искусственных нанотрубок, применение которых на разделе фаз является очень перспективным (рис. 16). С помощью искусственно созданных конструкций из нанотрубок можно создавать на поверхности плёнки различные сектора. Преимуществом искусственных нанотрубок является то, что можно изменять их толщину как путём синтеза, так и путём создания искусственных агрегатов посредством слипания.

2.1.5. Липиды в молекулярной биологии

Современные методы, такие как липофекция и сонопорация с созданием искусственных везикул и липосом, достаточно разработаны для доставки внутрь клеток различных нуклеиновых кислот и других биомолекул (рис. 17). Но если биотехнологии с липосомами являются мейнстримом, то с плёнками липидов исследования очень разрознены и неспециализированы в части получения протобионтов [1]. Поэтому является актуальным создание твёрдых липидных сред для отработки «теории майонеза», смешанных с другими молекулами, придающими липидной или жировой среде стабильность. Это необходимо, чтобы использовать эту среду как аналог сред из углеводов, на которых выращивают РНК-колонии, и пептидоподобных сред, содержащих аминокислоты, на которых выращивают ДНК-колонии [110]. На практике апробированы эксперименты с изучением взаимодействия липидных слоёв с моонуклеотидами, в частности, аденозинмонофосфатом АМФ (рис. 18) [195]. В ходе этого исследования установлено, что моонуклеотиды обладают способностью формировать различные типы укладки (рис. 14). В схожем исследовании выявлена способность моонуклеотидов гуанозинмонофосфата (ГМФ) формировать спирали в виде G-тетрада и образовывать гелевые структуры, по сути являющиеся нуклеотидной средой [137]. В свою очередь, способность липидоподобных молекул формировать супрамолекулярные структуры позволяет создавать соответствующие среды в плёнках и экспериментировать со взаимодействием нуклеиновых кислот не только с мицеллами, везикулами и липосомами, но и другими поверхностными структурами (рис. 19) [9; 120]. Данные супрамолекулярные поверхностно-активные и липидоподобные агрегаты наравне с липоплексами и полиплексами являются перспективными агентами для изучения взаимодействия нуклеиновых кислот с жирными кислотами в среде плёнок для изучения начальных этапов жизни.

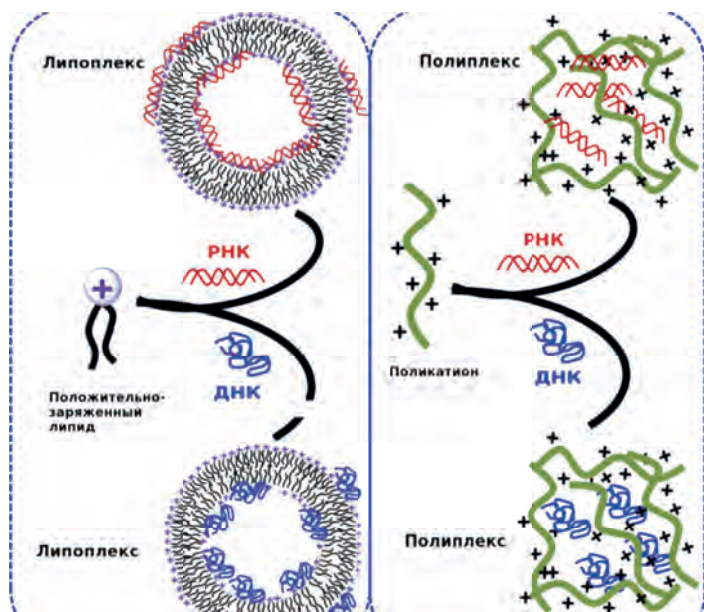


Рис. 17. Липоплексы и полиплексы с нуклеиновыми кислотами [1]

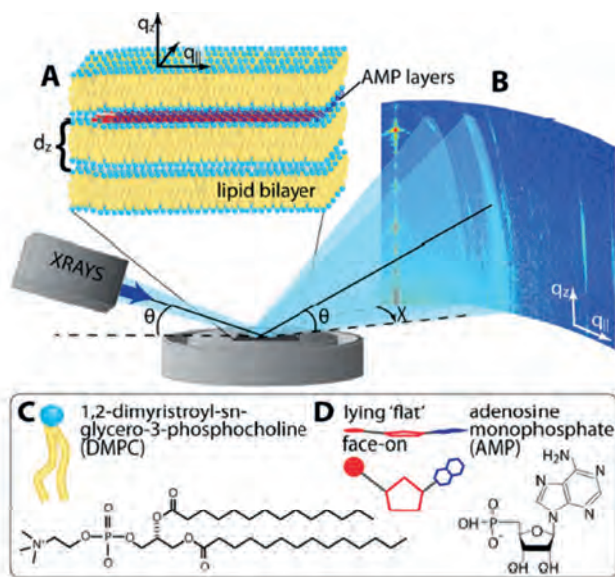
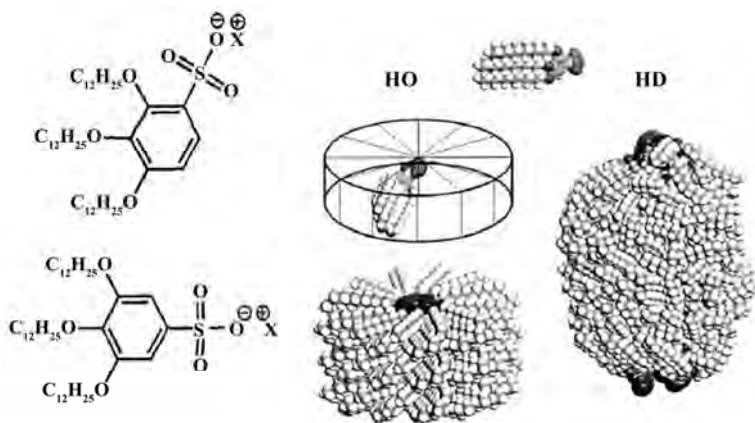
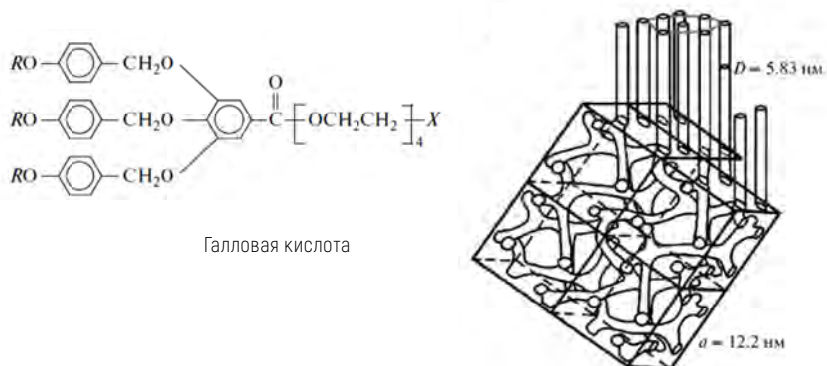


Рис. 18. Слои аденозинмонофосфата (АМФ) между билипидными слоями [по: 195]



Бензолсульфоновая кислота



Галловая кислота

Рис. 19. Модель упорядоченной (НО) и неупорядоченной (НД) спирали из бензолсульфоновой кислоты и пористая структура из спиралей галловой кислоты (по 9; 120)

2.2. Получение углеводов и углеводных сред

2.2.1. Получение углеводов

Более чем столетие после открытия формозной реакции А. М. Бутлерова научное сообщество стало развивать синтез более сложных углеводных соединений. Помимо реакции Бутлерова, основанной на получении сахаров из формальдегида, известны

реакции получения сахаров из углекислого газа и водорода и углекислого газа и метанола (рис. 20). Массовое производство сахаров основано на переработке растительного сырья, большую часть которых получают с использованием ферментов. В большей степени переработке подлежат следующие растительные полисахариды: крахмал, целлюлоза, гуммиарабик, гуаровая смола, пектин, альгинаты, агар [118]. В микробиологической промышленности получают ксантан и декстран, а также склероглюкан, геллан, пуллулан (рис. 21). Данные полисахаридные полимеры, наряду с альгинатой, используются для иммобилизации различных клеток микроорганизмов и биокаталитических реакций. Структура пуллулана используется в качестве фильтра, не пропускающего кислород. Как правило, для получения мономерных звеньев из полисахаридов используют ферменты — целлюлазу, гемицеллюлазу, пектиназы, α -амилазу, β -амилазу, глюкоамилазу, пуллулазу, изоамилазу. Для превращений сахарозы в глюкозу и фруктозу используют такие катализаторы, как инвертаза, глюкоизомеразы. Дозировка в различных фазах технологических циклов позволяет получать полисахариды различной структуры, различной степени вязкости, различной степени кристаллизации и т. д. Важной и перспективной молекулой является циклодекстрин, получаемый под действием циклодекстрин-трансферазы [52]. Эти растворимые в воде молекулы создают кольцо диаметром 0,5–0,75 нм, что позволяет помещать в его полости витамины, ароматические соединения и в целом более широкий перечень молекул (рис. 21). То есть они позволяют стабилизировать ряд веществ и интересны в изучении различных супрамолекулярных взаимодействий. Важной и перспективной проблемой является создание различных ячеек в гелях из полисахаридов, а также полисахаридных каркасов, содержащих ионы металлов, пептидогликаны и другие молекулы, увеличивающие и снижающие скорость биокаталитических реакций. Это позволит оптимизировать ряд молекулярных биотехнологических процессов в том числе в проблеме возникновения и развития жизни на молекулярном уровне.

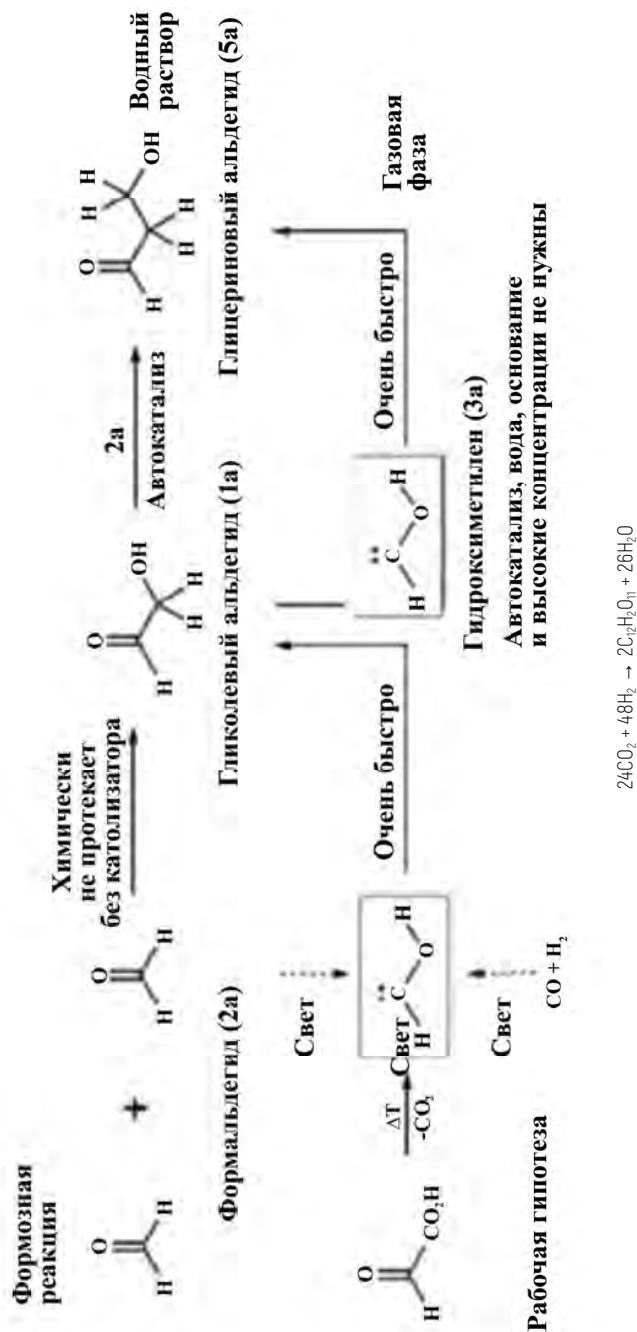


Рис. 20. Реакция получения углеводов из углекислого газа и водорода [реакция Бутлерова]

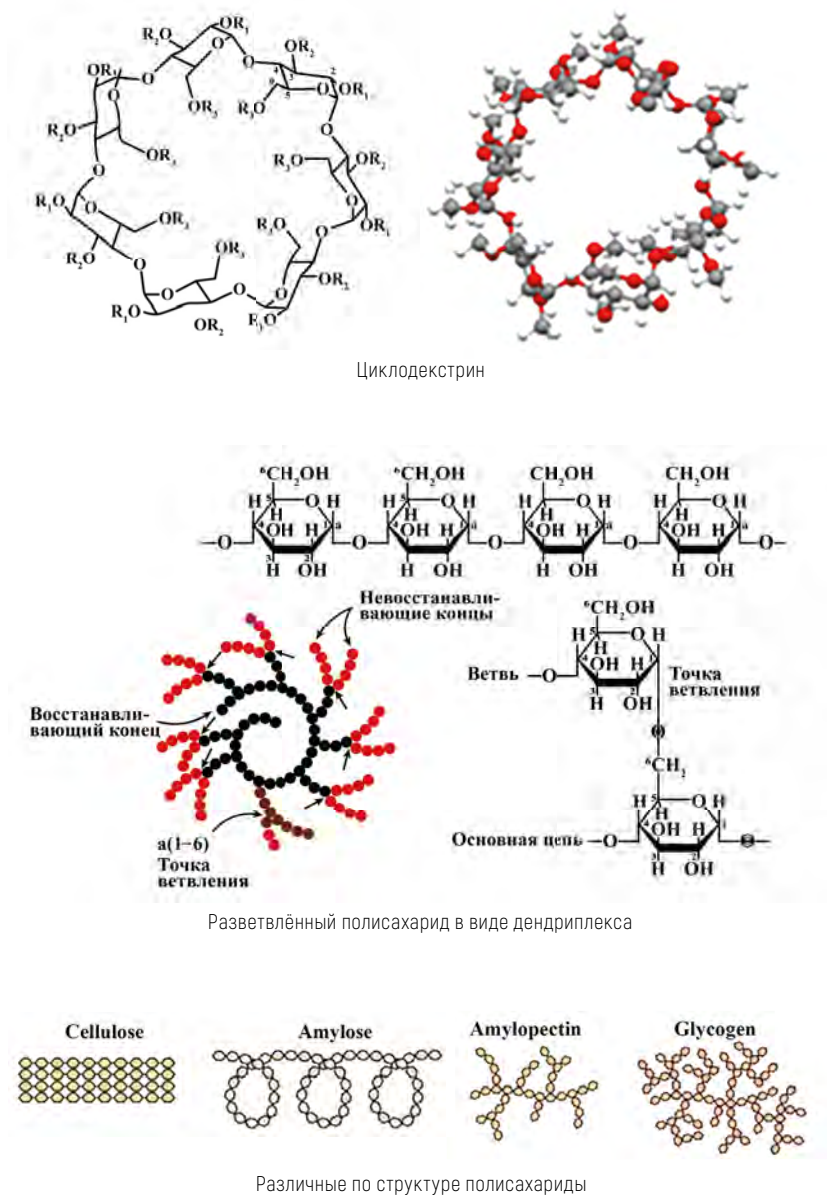


Рис. 21. Радиально-симметричные и различные по степени разветвления полисахариды: циклодекстрин, разветвлённый полисахарид в виде дендриплекса, целлюлоза, амилоза, амилопектин, гликоген

2.2.2. Получение специфичных сред из полисахаридов

Функциональные свойства полисахаридов также являются важной составляющей при подготовке сред из углеводов. Установлено, что различные виды модифицированной целлюлозы с увеличением напряжённости магнитного поля характеризуются разными типами жидкокристаллической организации (рис. 22), а именно переходом с холестерического к нематическому типу [8; 27; 35; 103; 214]. Обнаружена способность ЦЭЦ (цианэтилцеллюлоза) к конформационному переходу «клубок-спираль» в системе ЦЭЦ—ДМАА (диметилацетамид). Авторы исследования обнаружили данную закономерность методом, которым была выявлена способность

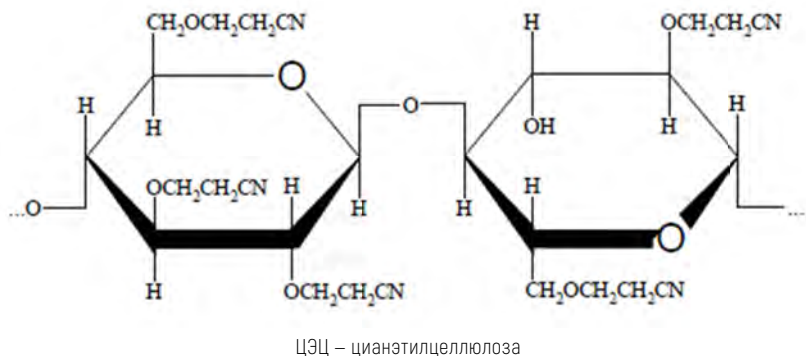
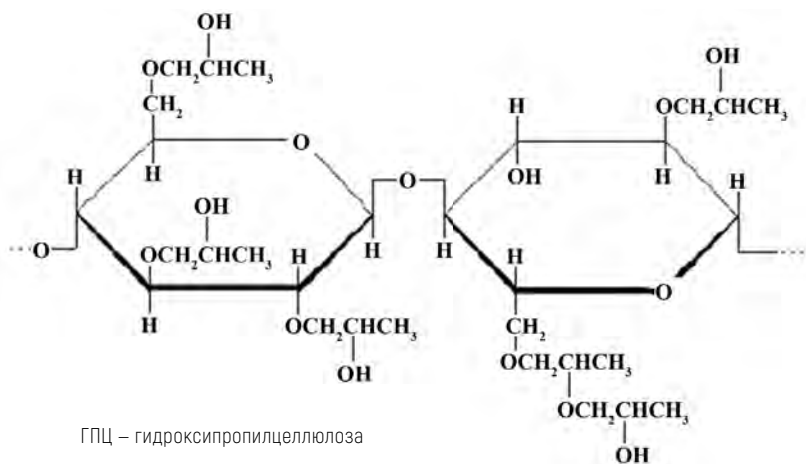
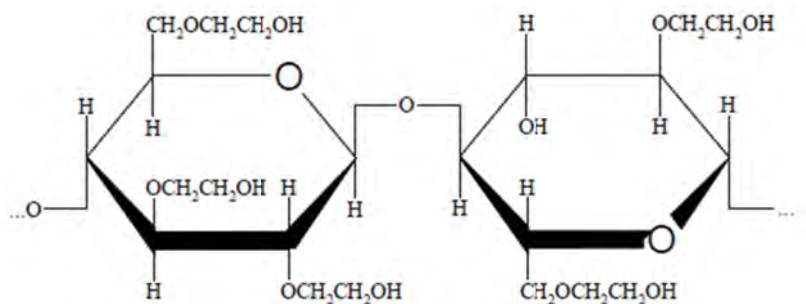
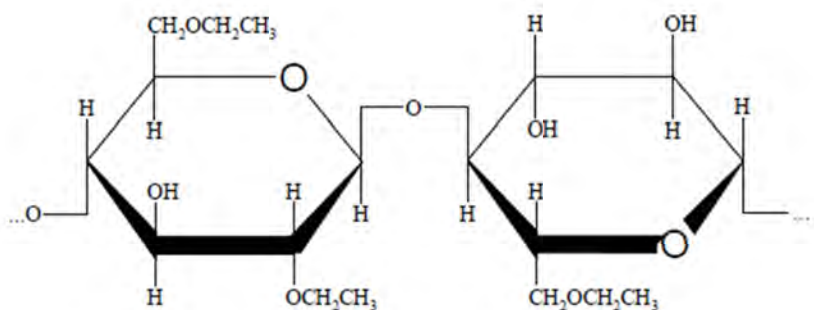


Рис. 22 (начало). Различные виды модифицированной целлюлозы



ГЭЦ – гидроксипропилцеллюлоза



ЭЦ – этилцеллюлоза

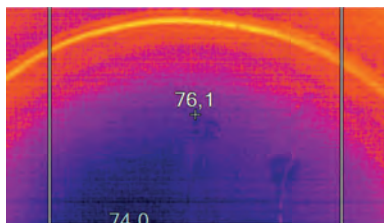
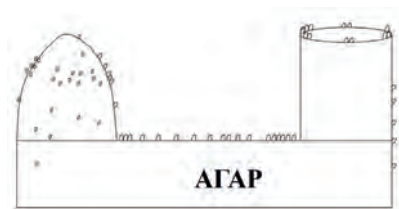
Рис. 22 (окончание)

поли-γ-бензил-L-глутамата образовывать из клубкообразных молекул α-спираль. Также установлено, что с увеличением молекулярной массы полимера способность макромолекул к ориентации в магнитном поле падает. Магнитное поле также способствует ассоциации макромолекул производных целлюлозы в растворах. Также воздействие магнитного поля приводит к уменьшению вязкости растворов системы ГЭЦ—ДМФА. Установлено, что магнитное поле повышает вязкость умеренно концентрированных растворов ГПЦ в воде, но при высоких концентрациях наблюдается незначительное снижение вязкости. Подобное поведение авторы связывают с конкурирующими процессами ассоциации и ориентации макромолекул ГПЦ в магнитном поле. Важный фактор колебания параметров магнитного поля отмечался нами выше в соответствующей главе. Увеличение и снижение вязкости растворов при воздействии магнитного поля в зависимости от концентрации полимеров углеводов также косвенно указы-

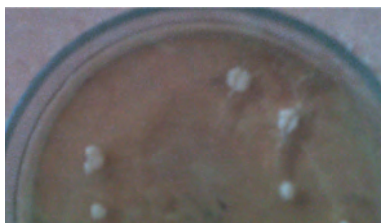
вают на факт колебаний параметров магнитного поля на этапах организации и структуризации биологических полимеров при возникновении жизни.

Помимо различных супрамолекулярных свойств, позволяющих создавать из полисахаридов сложные трёхмерные конструкции в воде, из углеводов можно создавать твёрдые гелевые трёхмерные конструкции. Так, для изучения развития различных обрастаний, в том числе роста бактерий на различных углах к поверхности Земли нами были подготовлены и апробированы различные по форме субстраты из агара, на которых культивировались колонии бактерий (рис. 23). Было установлено, наибольший пик по численности и разнообразию бактерий и грибов развития наблюдался на углах 20–90° по отношению к поверхности Земли. Это, очевидно, было обусловлено свободной миграцией спор при развитии колоний на свободные места агара путём миграции по воздушной среде. В дополнительном эксперименте агар перемешивался в процессе культивирования шейкером, магнитной мешалкой и вортексом. В ходе чего было установлено, что наибольшая численность колоний наблюдалось на средах, перемешанных шейкером: численность колоний была в 2 раза выше по сравнению с контролем. В целом ряд снижения численности колоний выглядел следующим образом: шейкер — магнитная мешалка — вортекс — контроль. Магнитная мешалка, вероятно, обеспечивала вывод на поверхность жидкого агара контаминантных бактерий, или создавала поры для притока на поверхность жидких элементов среды. Механические колебания вортекса были, по всей видимости, слишком незначительны для механической миграции спор и бактерий, с которой лучше справлялся шейкер. При этом наибольшее разнообразие биоты наблюдалось при перемешивании шейкером и вортексом. Также без перемешивания наблюдалась большая тенденция к образованию колоний по типу биоплёнки, а с перемешиванием — по типу сферических колоний. Таким образом, сложные трёхмерные субстраты, изменяющие условия гравитации, и динамика движения среды оказывают большое влияние на развитие биоты. Эти факторы необходимо учитывать при постановке экспериментов и с биологическими молекулами.

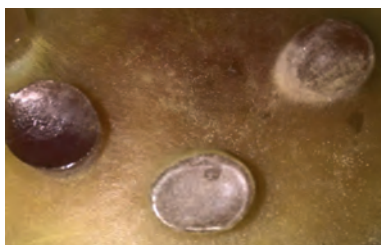
Вторым немаловажным приёмом можно считать возможность создания из гелевых углеводных сред специальных ячеек и борозд на поверхности полисахаридной среды, где различные РНК-



Изменение структуры колоний, растущих на царапинах, нанесённых на агар, в тепловизоре



Изменение структуры колоний, растущих на царапинах, нанесённых на агар



Различные конструкции из агара, создающие трёхмерный рельеф



Изменение плотности колоний бактерий и гифов грибов на стенках и краях агара
Рис. 23. Схема форм из агара и развитие колоний на неровных поверхностях

колонии и другие РНК-органеллы могут функционировать и развиваться в специфичных условиях среды с заданными параметрами.

Таким образом, известно множество путей искусственного получения углеводов, к которым можно добавлять разные изотопы углерода для изучения возможностей функционала и накладывать ограничения на соотношения сахаров разной хиральности, с которыми далее будут проводиться эксперименты. Например, исключительно левые полисахариды и исключительно правые полисахариды, а далее закладываются экспериментальные ряды с разными долями правых полимеров в среде с левыми полисахаридами и разными долями левых полимеров в среде с правыми полисахаридами. То есть необходима постановка экспериментов с разными долями и соотношениями правых и левых полисахаридов в различных реакциях. Это позволит качественно изучить специфику возникновения хиральности при взаимодействии и формировании первичных молекул-биополимеров у протобионтов.

Температурный градиент в синтезе и распаде углеводов и их производных лежит в диапазоне 1–200 °С. Так, реакция А. М. Бутлерова, протекающая в диапазоне 20–100 °С и которую можно назвать переходом от мира углеводов к мирам сахаров и РНК, реализуется почти в физиологических условиях. При этом превращение одних сахаров в другие также проходит в этом диапазоне — 55–60 °С. На второй сотне градусов протекают другие ключевые моменты органического синтеза. Например, карамелизация протекает при 110–180 °С, разложение целлюлозы — при 170 °С, а реакция Майяра по взаимодействию аминокислот и сахаров при получении гликолиаминов и акриламидов протекает при 140–165 °С. Продукты этих реакций, такие как карамель и акриламиды, являются пористой средой, в порах которой могут развиваться и синтезироваться неостывшие полисахариды и нуклеиновые кислоты. То есть более твёрдые и гелеобразные продукты сахаров могут являться средой для нуклеиновых кислот и других биополимеров.

2.3. Получение аминокислот, пептидов и белковых сред

Взаимодействие полисахаридов с белками может приводить к образованию акриламидов и гликолиаминов. При этом способность углеводов к структурной организации по типу поли- γ -бензил-L-глутамата требует рассмотрения искусственного получения другой важной группы биологических полимеров — белков. В свою очередь, протеомика — одно из крупнейших фундаментальных и прикладных направлений молекулярной биологии наряду с геномикой. Существует большое количество методологий, руководств, научных школ и коммерческих организаций, специализирующихся на получении различных пептидов, белков и их производных. Среди этих продуктов есть и искусственные белки, поэтому коротко рассмотрим самые основные методы получения аминокислот и белков.

2.3.1. Получение аминокислот

Существует четыре промышленных метода получения аминокислот:

- 1) экстракция из гидролизата белка;
- 2) химический синтез;
- 3) биотрансформация соединений-предшественников в ферментёре или клеточном реакторе;
- 4) микробная ферментация [118].

Экстракцией из белкового гидролизата в промышленности получают прежде всего L-цистеин, L-цистин, L-лейцин, L-аспарагин, L-аргинин и L-тирозин. В качестве сырья используют растительные белки или отходы мясной промышленности, которые подвергают кислотному гидролизу, после чего путём кристаллизации при экстракции спиртом отделяют гидрофобные аминокислоты L-фенилаланин, L-лейцин и L-изолейцин. Затем проводят ионообменную хроматографию, разделяя растворимые аминокислоты на основную, кислую и нейтральную фракции, которые далее перекристаллизовывают и подвергают хроматографической очистке. Химический синтез аминокислот всегда приводит к рацемату (смеси L- и D-изомеров аминокислот), который также применяется в биохимической промышленности. Проблемой рацемата в искусственном получении аминокислот долгое время

занимались пионеры хиральной специфики возникновения жизни В. И. Гольдманский, В. А. Аветисов, а позже А. В. Марков (2010), В. А. Твердислов (2012) и другие. Для разделения рацемата аминокислот на L- и D-изомеры в молекулу аминокислоты вводят ещё один хиральный центр при α -атоме. Такие реакции биотрансформации осуществляют в ферментёре или клеточном реакторе. Биокатализатором могут служить очищенные ферменты или целые клетки, содержащие необходимый фермент. Эффективнее использовать иммобилизованные катализаторы, которые позволяют проводить реакцию непрерывно в течение длительного срока. Успех промышленного получения аминокислот объясняется тем, что химический синтез соединений-предшественников относительно дешёв. Кроме того, для производства почти всех протеиногенных аминокислот разработаны методы ферментации и имеются штаммы, позволяющие получать большие количества продукта. На сегодняшний день клонированы целые опероны, ответственные за биосинтез аминокислот.

2.3.2. Внеклеточный синтез белка

Аптамеры — искусственно полученные фрагменты ДНК и РНК, обладающие большим сродством к гидрофильным молекулам, используются для получения искусственных белков [118]. Методом SELEX (от англ. Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment — систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении) проводят оценку способности к связыванию целевых молекул среди обширной библиотеки синтетических молекул ДНК и РНК. Наилучшие кандидаты используются в амплификации методом ПЦР в реальном времени и транскрипции *in vitro* для получения дочерней библиотеки с улучшенными свойствами. Аптамеры позволяют добиться стабильного связывания даже в наномолярном диапазоне концентраций. Разработка аптамер-зондирования используется для протеомного анализа. Данная технология позволяет производить внеклеточный синтез белка. На матрице ДНК синтез белков возможен и внеклеточных условий. Для этого требуется лизат *Escherichia colie*, в котором содержатся РНК-полимераза, различные транспортные РНК, рибосомы и аминокислоты. Этот метод используют для получения вредных белков-антагонистов — токсинов, протеаз. Таким об-

разом, на отобранных аптамерах удаётся получать различные белки.

Для более подробного изучения и освоения техник искусственного получения пептидов и белков необходимо изучение соответствующих разделов молекулярной биотехнологии и протеомики [46; 118]. Протеомика на сегодняшний день — обширная область, где также широко представлены практические решения в части получения различных белков и пептидов. Ряд технологических и производственных решений представлены на рынке биотехнологических услуг. В этом направлении также можно выделить два пути. Первый — это искусственное получение пептидов и белков, например на пептидных синтезаторах. Второй путь — это синтез белков на природной основе с использованием промоторов, аптамеров и других биотехнологических путей для синтеза и получения различных модификаций белков. Этот путь, как правило, тоже реализуется внутри клеток (*in vivo*), но есть и исключения (*in vitro*).

Несмотря на интенсивное развитие протеомики, её синтез с геномикой до сих пор полноценно не реализован, особенно в части изучения и получения элементов жизни и протобионтов. А именно взаимодействие и совместное конвергентное развитие полимеров нуклеиновых кислот и пептидов с простейшими белками. Есть некоторые успехи одновременного синтеза нуклеотидов и аминокислот в специальной среде [181]. Но дальнейшее сосуществование и взаимодействие данных полимеров в специальных средах с усложнением уровня их организации и построением сложных трёхмерных структур при обоюдном синтезе друг друга находится только в начале экспериментального и практического пути. Тем не менее существует ряд биотехнологических разработок, применяемых в медицине, которые могут быть использованы на практике изучения белковых субстратов в качестве сред для нуклеиновых кислот. Например, альбуминовые оболочки препарата «Абраксан» (рис. 24). Построение по их принципу сферических оболочек по типу везикул для нуклеиновых кислот, а также двумерных субстратов и свободно организующихся компартментов в дискретной среде открывает все практические возможности для изучения процессов взаимодействия нуклеиновых кислот с белками и пептидоподобными веществами. Полезным продуктом могут оказаться белковоподобные искусственные биополимеры, такие как поли- γ -бензил-L-глутамата и отмеченные выше по-

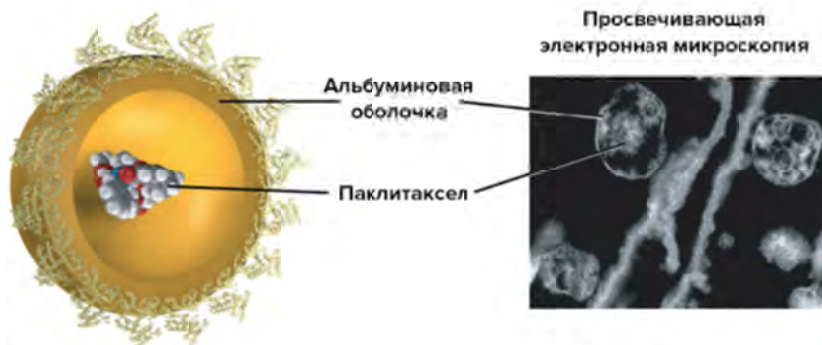


Рис. 24. Строение частиц «Абраксана» [1]

лимеры, содержащие аминокгруппы [65]. В контексте рассмотрения получения белковых компонентов в качестве сред нами не затрагивается их ферментативная функция, так как на раннем этапе данные каталитические функции осуществлялись рибозимами. Однако перед рассмотрением естественных и искусственных рибозимов следует ознакомиться с путями получения отдельных нуклеотидов, из которых сложены нуклеиновые кислоты.

2.4. Получение азотистых оснований и нуклеотидов

Во второй половине XX — начале XXI столетия стало понятно, что элементарной ячейкой жизни является нуклеотид. Понимание этого пришло не только с открытием вирусов и вириодов, но также с открытием и получением искусственных рибозимов, методов молекулярных РНК-колоний и полным осознанием теории мира РНК. Со времён получения первых нуклеотидов и пуринов Дж. Оро [177; 178] и С. Панамперумой [166] и получения первых пиримидиновых оснований был произведён искусственный синтез всех четырёх нуклеотидов в различных физико-химических условиях. На практике более широко распространён способ получения нуклеотидов из естественных РНК- и ДНК-молекул. Искусственный синтез базируется на основе молекул цианистого водорода, формальдегида и глицеральдегида. Также известен синтез на базе формамида. В частности, синтез аденозинового основания реализуется на базе конденсации молекул синильной кислоты

с образованием диаминомалеонитрила с дальнейшим образованием аденина (рис. 25). Из формальдегида через гликоальдегид образуются тетразы с дальнейшим образованием рибозы. Синтез пиримидинового нуклеотида реализуется из рибозо-3-фосфата, цианамиды и цианоацетилена (рис. 26). С добавлением синильной кислоты в данную среду образуются пуриновые нуклеотиды.

Отбор определённого типа хиральности можно обеспечить ультрафиолетовым облучением и синтезом на твёрдых минеральных матрицах, также способствующих определённому типу хиральности [73; 188]. Так, исследовательская группа под руководством Р. Саладино (2015) использовала различные минералы для

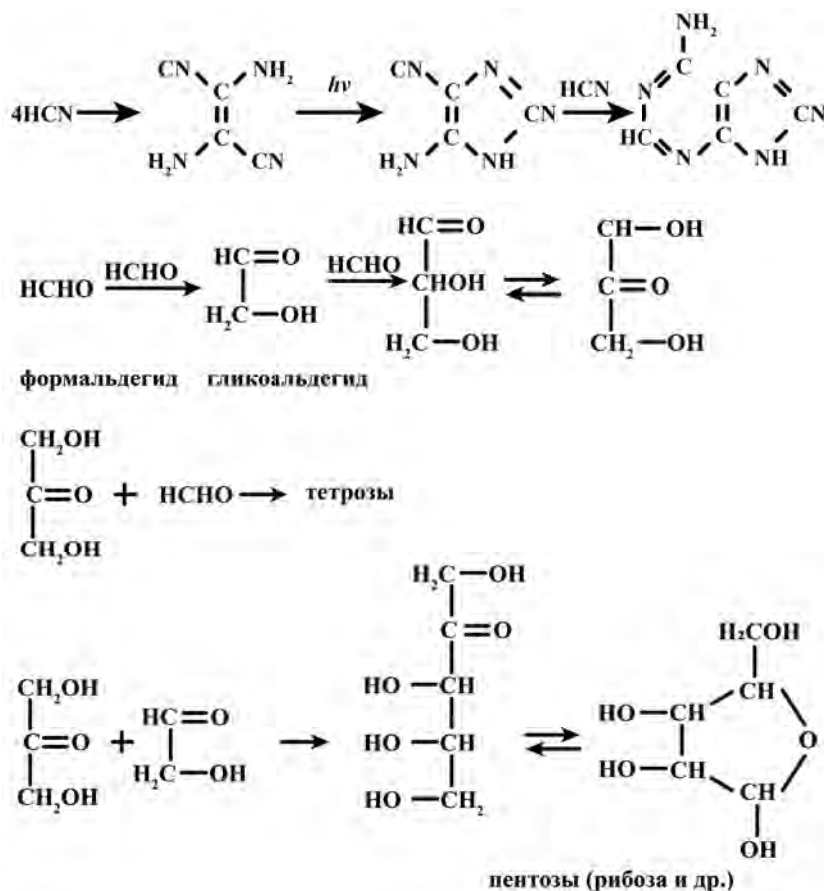


Рис. 25. Получение аденинового основания и сахарного остатка

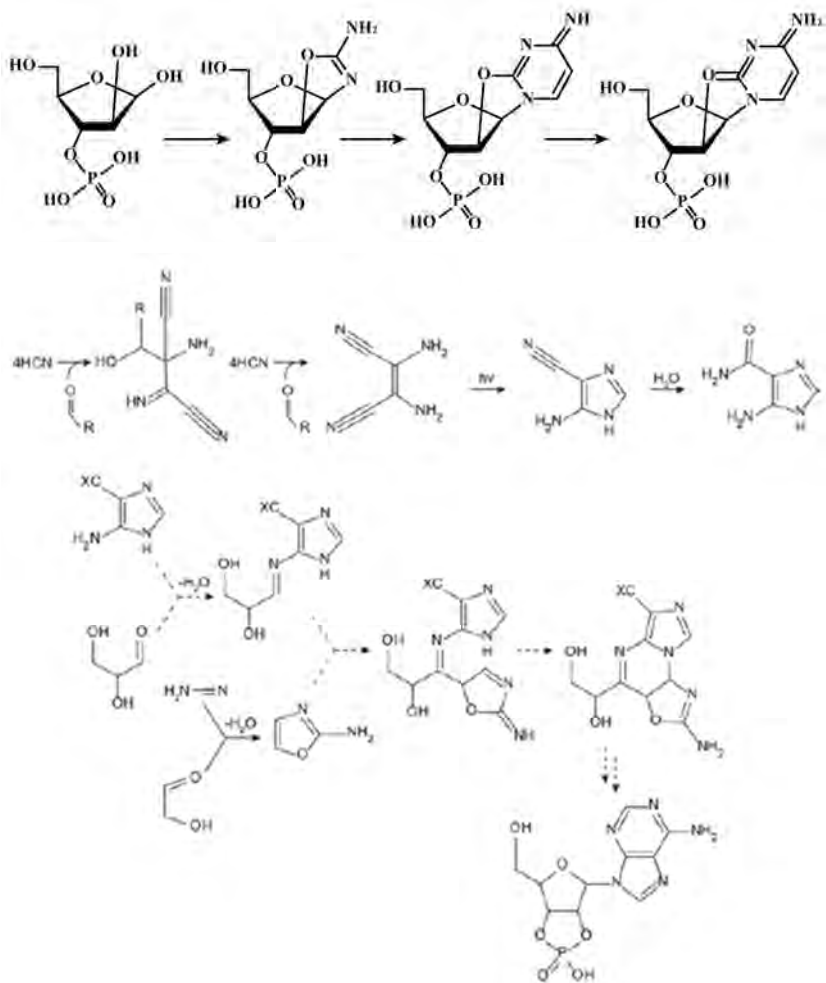


Рис. 26. Получение пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов

получения нуклеотидов и их производных (рис. 27). Протоновая бомбардировка также способствовала селективности на хиральность [189]. Аналогичные результаты при выпаривании в среде формамида (рис. 28) были получены группой S. Becker [128]. В реакции цианосульфидного протометаболизма, осуществлённой группой Дж. Сазерленда (2015), где были получены наиболее полные молекулярные предшественники жизни, также проводилось облучение ультрафиолетом (рис. 29). Для этого

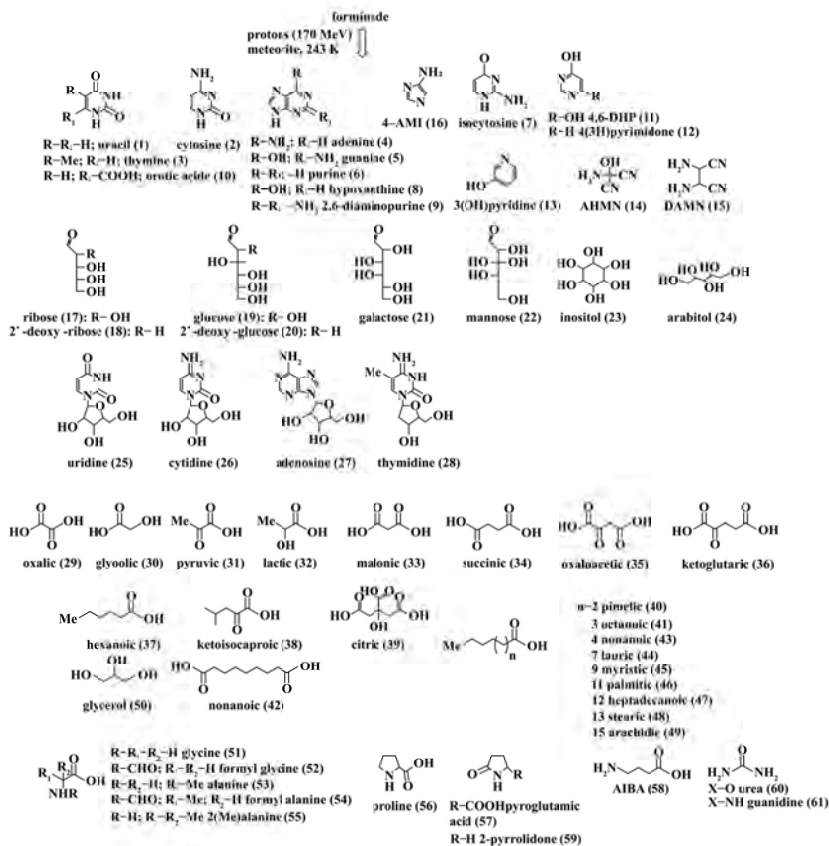


Рис. 27. Получение нуклеотидов, сахаров и аминокислот по Saladino et al. [189]

требовалось подогреть азотистые основания (цианамид) вместе с сахаром (гликольальдегидом) и цианоацетиленом в присутствии фосфорной кислоты и под ультрафиолетовым облучением. В результате помимо пуриновых получились пиримидиновые рибонуклеотиды — цитидин и уридин. Исследователи синтезировали гликольальдегид и глицеральдегид из цианистого водорода на свету в присутствии сероводорода и двухвалентной меди. В качестве побочных продуктов этой реакции был синтезирован α -аминонитрил — предшественник аминокислот глицина, серина, аланина и треонина.

Получение азотистых оснований можно ускорить облучением ультрафиолетом и потоком протонов. Следует отметить, что

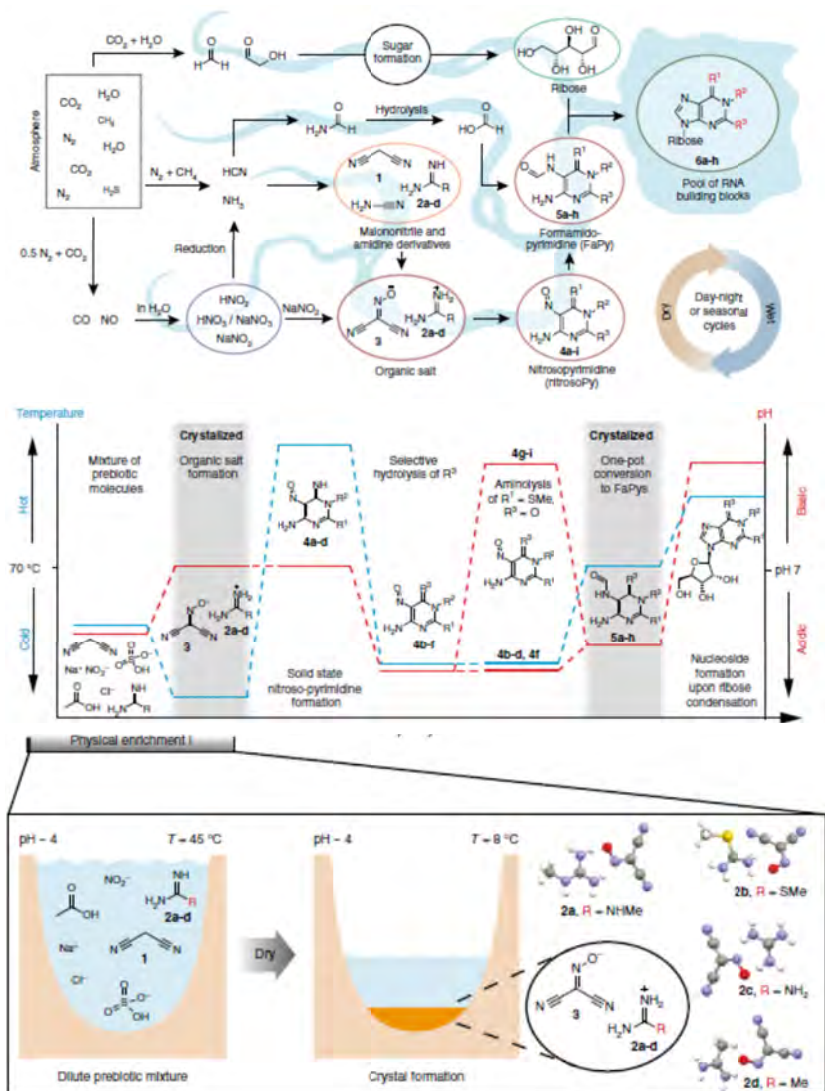


Рис. 28. Получение пуриновых нуклеотидов в различных средах по Becker et al. [128]

дозировка облучений не до конца отработана для всех типов азотистых оснований, а также не обеспечивает точного получения заданных долей азотистых оснований в среде. Это ставит задачу разработки методических подходов к синтезу различных типов азотистых оснований и сахарных групп, в том числе синтетиче-

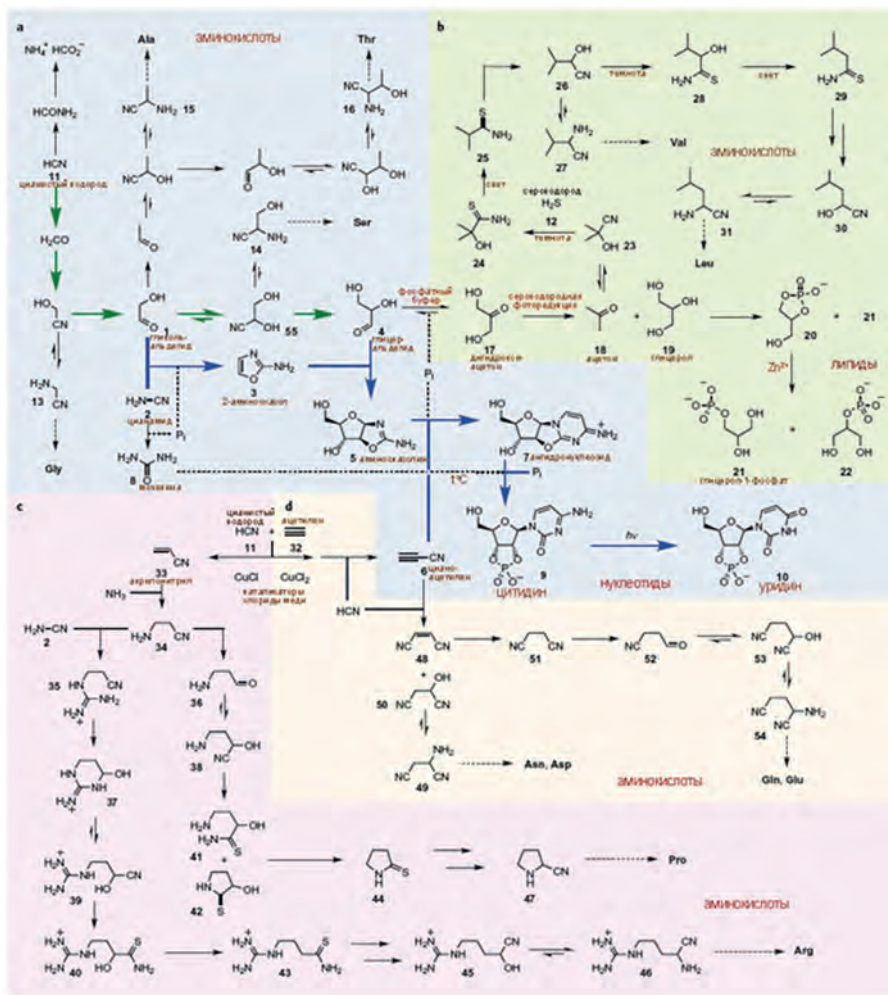


Рис. 29. Схема реакций, в которой взаимосвязан синтез пиримидинов, аминокислот и липидов. Синтез цитидинов и уридинов показан синими стрелками в голубом блоке (a), зелёными стрелками в голубом блоке показан синтез сахаров (гликольальдегида) из цианистого водорода; розовым и бежевым блоками (c и d) показана часть реакций, в которых при участии Cu (I) или сероводорода и Cu (II) идёт синтез аминокислот; зелёный блок (b) показывает часть реакций, в ходе которых синтезируются предшественники липидов и аминокислоты [181]

ских нуклеиновых кислот — таких как ксенонуклеиновые (XNA), треозо-нуклеиновые (TNA) и гликоль-нуклеиновые (GNA) кислоты [168; 207; 210] и соответственно искусственных нуклеотидов. Искусственные нуклеотиды были получены рядом исследователей и были встроены в стандартные типы РНК и ДНК, после чего данные нуклеиновые кислоты функционировали. Кроме того, в ходе данных исследований были получены участки геномов из шести- и восьмибуквенных нуклеотидных кодов (рис. 30) [164; 167; 209]. Таким образом, на сегодняшний день существует много путей получения нуклеотидов искусственным путём из абиотической среды с углеводородами, цианамидами, формамидом, формальдегидом, синильной кислотой и различными органическими

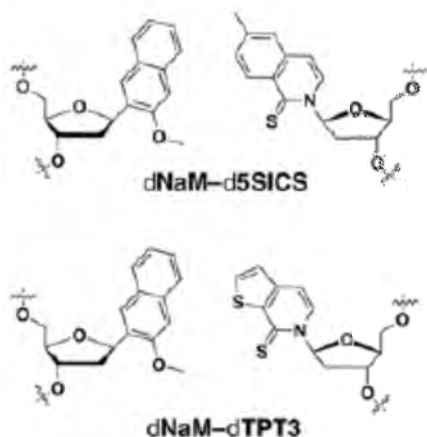
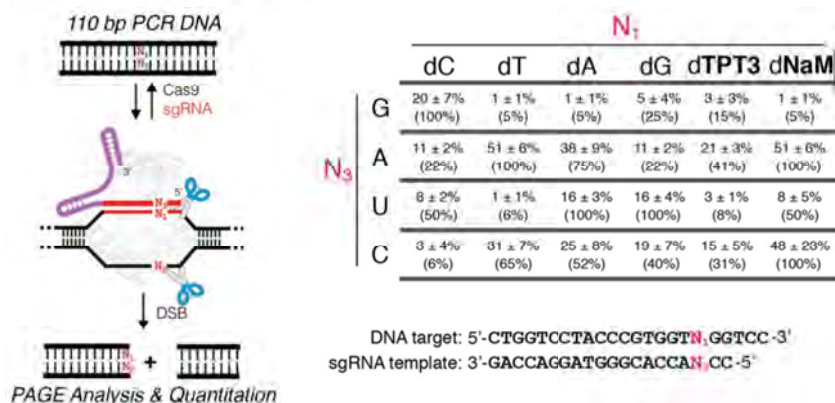


Рис. 30. Новые нуклеотиды, встроенные в РНК и ДНК [210]



газами. Среди них облучение ультрафиолетом и протонами, синтез в присутствии металлов-катализаторов и на твёрдых матрицах минералов и различные формы выпаривания и конденсации.

2.4.1. Полимеризация нуклеотидов – получение биологических полимеров нуклеиновых кислот

Следует рассмотреть два пути получения полимеров нуклеиновых кислот. Первый — это получение полимеров из одного нуклеотида. Второй — получение полимеров из смеси нуклеотидов комплементарного типа. Из различных форм азотистых оснований и нуклеотидов большее количество исследований проведено и больший биологический смысл имеют пурины. Более богатое аминогруппами азотистое основание даёт возможность более широкого синтеза и циклических метаболических реакций, особенно в части образования аминокислот и пептидов. В связи с этим аденин и гуанин наиболее часто использовались в различных моделях в качестве первоисточника жизни. Причём в качестве элементарной ячейки жизни предлагались как моно-, так и ди- и трифосфаты нуклеотидов. В экспериментальной части было установлено, что АТФ и ГТФ при самополимеризации в щелочной среде в присутствии алифатических диаминов образуют не длинные олигонуклеотиды с длиной цепи 6 и более нуклеотидов [23]. Позже было установлено, что гуанозинмонофосфат образует более длинные цепочки и более сложно организованы трёхмерные структуры в виде цилиндрических агрегатов [143]. В свою очередь, аденозинмонофосфат в липидной среде также формирует сложные структуры в виде кластеров (шеvron- структуры, херингбон- структуры, бислойные структуры) и полимеры [195] (рис. 14). Аденозинсодержащие полимеры в ходе метатезисной полимеризации формируют цилиндрическую морфологию, то есть способность к самокомплементарности адениновых звеньев в мицеллярном ядре [127]. Такая же способность к образованию спиралеобразных структур холестерической фазы G4 обнаружена у гуанозинмонофосфата [137]. Кроме того, выявлена способность гуанозинмонофосфата формировать холестерические гели G4 в присутствии других нуклеотидов, которые могут ассоциировать с самоорганизующимися структурами ГМФ и влиять на их организацию и стабильность. Среди таких структур — непрерывная спираль, димеры и мономеры,

уложенные в стопку оснований. Этот процесс гелеобразования зависит от pH и катионов. Растворимость гелей G4 также отличается от других структур. Важно добавить, что гуанозинмонофосфат и аденозинмонофосфат хорошо кристаллизуются, что даёт им возможность находиться в разных агрегатных состояниях в условиях меняющейся среды [192]. Наши исследования также показали, что кристаллический аденозинмонофосфат под ультрафиолетовым излучением и перемешиванием вихрем сильнее дробиться до маленьких фракций размером 1 нм в сравнении с контролем и просто перемешиванием вихрем.

Вторым важным аспектом исследований с нуклеотидами является то, что с от АТФ к АМФ эффективность полимеризации увеличивается, полимеры становятся длиннее. Также мономеры в отличие от ди- и тримеров способны образовывать более разнообразные структуры и супрамолекулярные комплексы. Это касается и гуанозинмонофосфата и аденозинмонофосфата. Все технические пути используют конденсацию при повышении температуры 25–85 °C, щелочную среду, богатую калием, магнием, алифатическими диаминами и циклическими углеводородами. Для фиксации различных по структуре монослоев нуклеотидов используют, как отмечалось выше, билипидные слои [195] и слоистые двойные гидроксиды [152] (рис. 31). Мало исследований проведено по способности различных структур полимеров, состоящих из одного нуклеотида (А, Г, У, Ц), образовывать трёхмерные структуры. Это исследование находится на переднем крае науки, так как может пролить свет на пределы ограничений в самоорганизации и функционале нуклеиновых кислот и подобных полимеров на ранних стадиях развития и открыть возможные другие пути и векторы организации живой материи.

2.4.2. Твёрдые среды. Получение полимеров нуклеиновых кислот на минеральных матрицах

Твёрдые среды для работы с биологическими полимерами могут представлять собой силикатные породы и материалы, к которым всё чаще начинают прибегать в подобных экспериментах. Оптимальными ячейками в твёрдой матрице являются нитчатые или центрические ячейки с периодичным включением

микроэлементов, тяжёлых металлов, служащих катализаторами необходимых реакций или режимов сворачивания биологических полимеров. Центрические ячейки могут являться аналогом ячеек Бенара. Периодичность, плотность расположения и размер этих ячеек может варьировать в зависимости от типа молекул и размера агрегатов, формируемых из этих молекул. В центре ячеек могут быть помещены катализаторы. Объём и форма ячеек также должна зависеть от типа культивируемых молекул, особенностей их трёхмерной укладки. Тип и форма ячейки в этом случае будет также влиять на степень адсорбции биологической молекулы. Ячейка на минеральной твёрдой поверхности это не только кристаллическая структура минерала, но и внутренняя полость — пора определённого размера.

Для таких экспериментов необходимо создание различных пор и борозд в нанометровом диапазоне. В качестве твёрдых ячеек для чистоты эксперимента и соответствующего анализа также необходимо использовать аллотропные модификации твёрдых кристаллических материалов. Аллотропные модификации на основе углерода, бора, кремния могут быть удобны для точного определения влияния различных эффектов и реакций, так как другие химические элементы будут отсутствовать. На сегодняшний день из аллотропных модификаций углерода наиболее часто в биотехнологиях используется графен (рис. 32). Причём для иммобилизации частиц графена используются мономеры нуклеиновых кислот — АТФ [173; 183; 213]. Мы провели эксперименты по адсорбции белка коллагена на поверхности трёх аллотропных модификаций углерода — фуллерена, алмаза и графита (рис. 33). Было установлено, что толщина слоёв и особенности структуры коллагена, покрывающего поверхность аллотропов, зависит от концентрации белка. При уменьшении концентрации коллаген формирует нити, стягивающие частицы аллотропных модификаций углерода. Размер нитей коллагена колебался от 50 до 300 нм, то есть от нескольких десятков до нескольких сотен нанометров. В некоторых случаях коллаген формировал тонкие монослои. Также оказалось, что тип кристаллической решётки аллотропа влияет на организацию структуры коллагена, покрывающего его поверхность. Так, на поверхности алмаза и фуллерена коллаген образовывал трёхмерные сгустки различной формы. Некоторые сгустки соединялись фибриллами. Интересным эф-

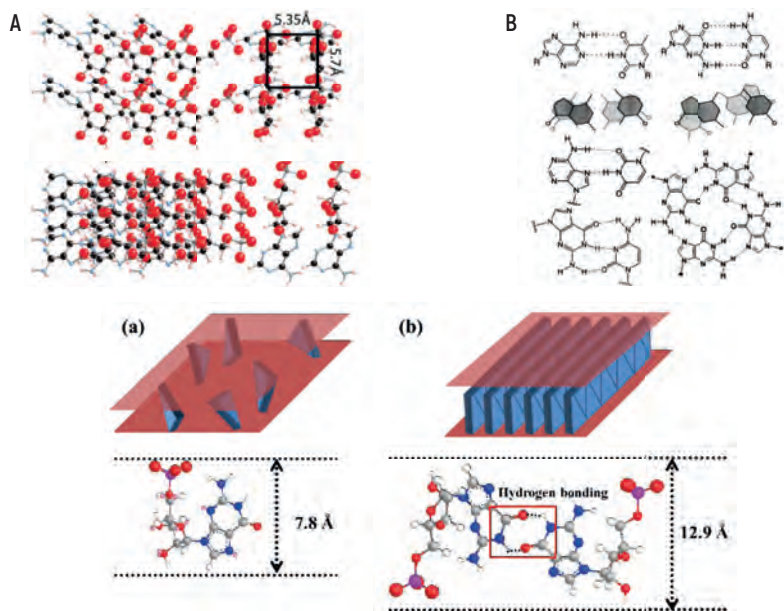


Рис. 31. Различные по типам укладки слои из мононуклеотидов: А – аденозинмонофосфат [195]; В – гуанозинмонофосфат [137]; и нуклеотиды, зафиксированные в слоях гидроксидов [152]: (а) – одиночные молекулы; (б) – двойные ленты

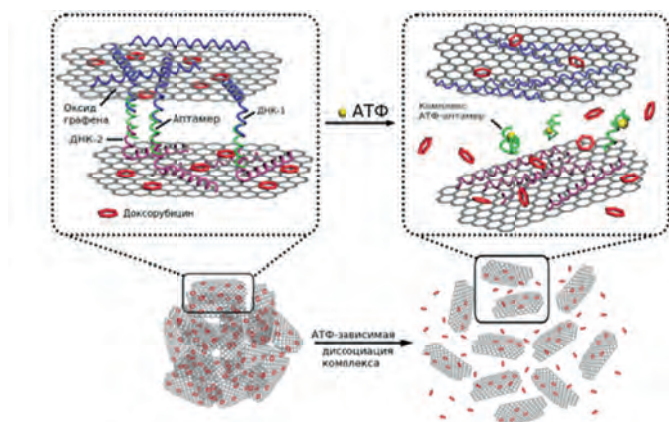
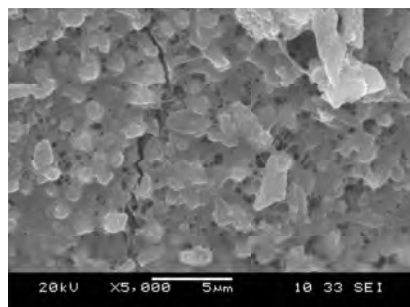
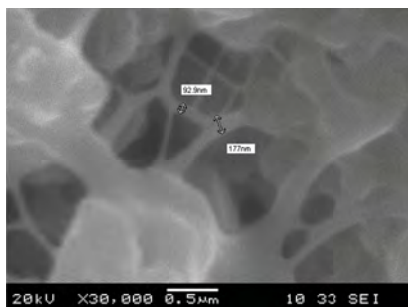


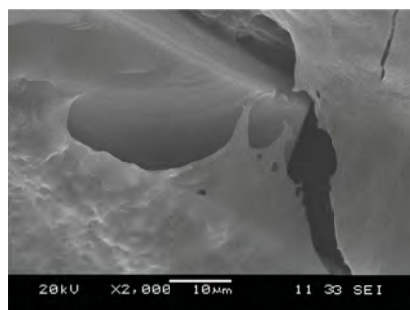
Рис. 32. Аллотропные наночастицы оксида графена с АТФ-зависимым высвобождением доксорубина. Свободные концы ДНК-1 и ДНК-2 комплементарно взаимодействуют с АТФ-аптамером. Таким образом, образуется двухслойная структура из оксида графена. На слои оксида графена адсорбированы молекулы доксорубина [1]



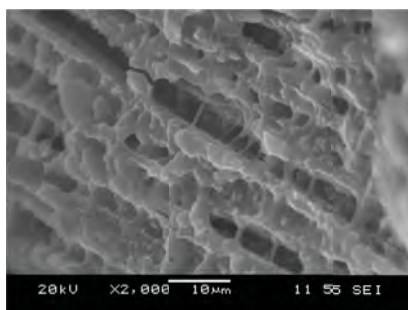
Слои коллагена с фибриллярными нитями на графите



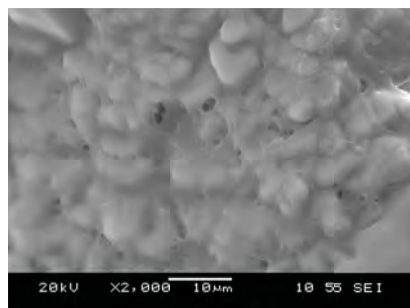
Диаметр коллагеновых фибрилл на графите



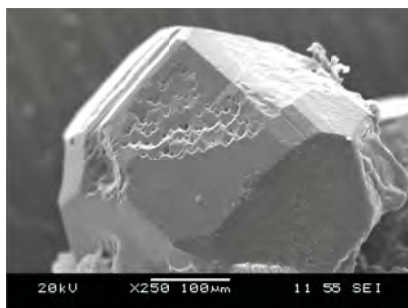
Коллагеновая плёнка на фуллере



Коллагеновые слои на фуллере



Слои коллагена на алмазе



Монослой коллагена на алмазе с трёхмерными агрегатами на поверхности

Рис. 33. Коллаген, адсорбированный на аллотропных модификациях углерода: графите, алмазе, фуллере

фектом проявлялись вытянутые тяжи в виде борозд коллагена на поверхности фуллерена, которые соединялись между собой фибриллами (рис. 33). Данные тяжи в виде борозд были ровные и параллельно вытянутые в одном направлении. К сожалению,

локальные условия среды, способствующие их возникновению, выяснить не удалось.

Мономеры гуанозинмонофосфата также адсорбируются моно-слоями на поверхности частиц $\text{MgAl}(\text{NO}_3)$, которые используются в качестве иммобилизатора (рис. 34).

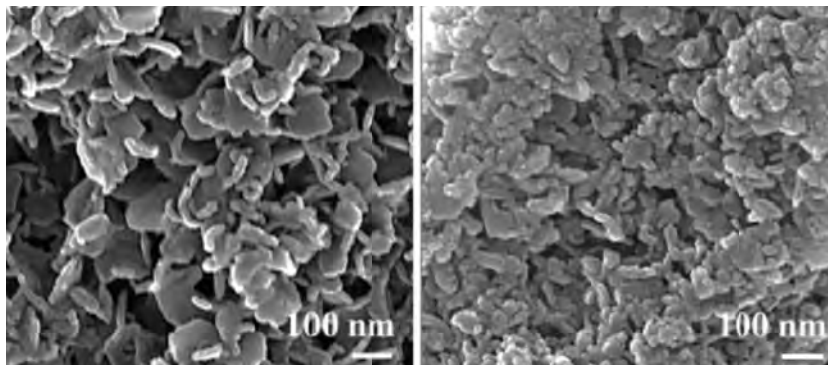


Рис. 34. Гуанозинмонофосфат, иммобилизованный на поверхности частиц $\text{MgAl}(\text{NO}_3)$ [152]

Обратным путём в аллотропные модификации могут быть помещены отдельные элементы и соединения с определённой периодичностью. Это поможет эффективно оценивать функционал культивируемых на твёрдой поверхности биомолекул. Вторым путём является нанесение на твёрдую поверхность вытянутых борозд и ячеек различной формы, длины и размера, в которых будут реализовываться механохимические реакции (рис. 35). Причём эти борозды также могут иметь различную форму и направление в зависимости от типа реакции. Различные формы дискретного рельефа, создаваемые на твёрдой поверхности, проиллюстрированные на рис. 35; протестированные на биоте обрастаний в воде и на сухопутных условиях, они могут пригодиться в методах создания биохимических реакций на уровне протобионтов.

Наши эксперименты по созданию борозд на твёрдых поверхностях — стеклах и минералах, выступающих катализаторами и градиентами, показали, что таким путём можно создавать различные агрегации бактерий в виде экотонных и других форм (рис. 36). Причём специфика агрегаций была выявлена и на других организмах: водорослях, грибах, различных водных полипах [61]. В отношении биополимеров интересным в эксперименталь-

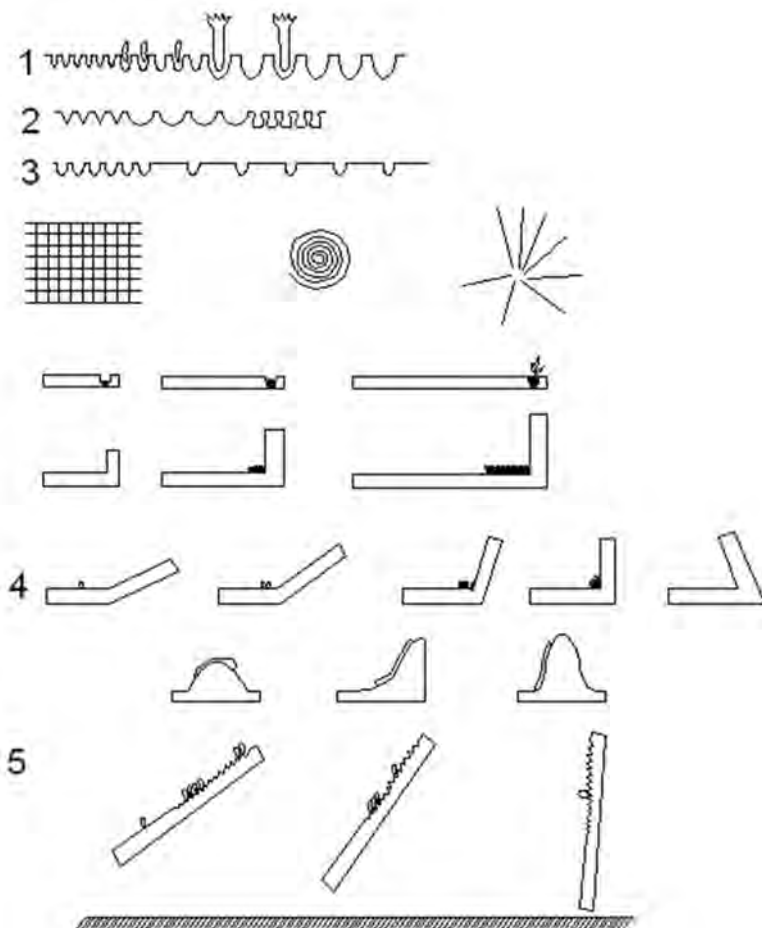
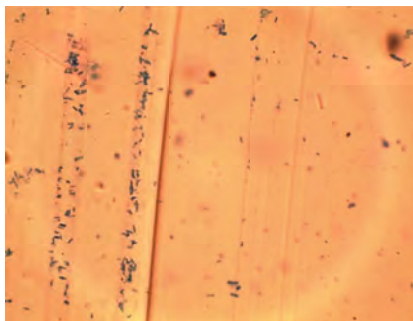
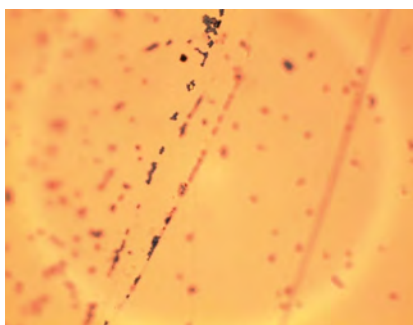


Рис. 35. 1 – набор различных по размеру углублений на стекле; 2 – различные формы углублений на стекле; 3 – различная частота и взаимное расположение углублений; 4 – набор различных углов на поверхности в пределах одного субстрата; 5 – набор различных углов на поверхности субстрата в различных угловых ориентациях относительно поверхности Земли

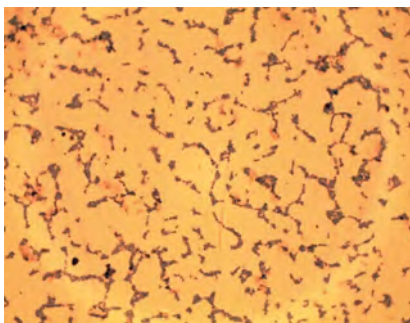
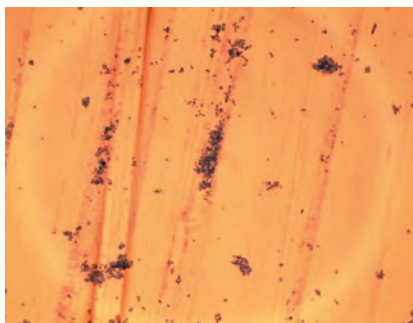
ном плане и логичным вариантом является расположение борозд с расположенными на их конце катализаторами или ячейками. Это может обеспечить ход циклических реакций с использованием среды. То есть характер и условия среды будут обеспечивать вектор реакций, таким образом создавая циклические реакции



Pseudomonas aeruginosa



Staphylococcus aureus, 4 ч



Staphylococcus aureus, 8 ч

Царапины

Контроль

Рис. 36. Заселение стекла с царапинами и формирование экотонных агрегаций в культурах бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*

и возможный гиперцикл. Ещё одним техническим решением является расположение борозд разной длины и разной частоты,

с дискретно разбивающими эти борозды нанесёнными на их поверхность катализаторами. Причём на каждую борозду может быть нанесено несколько точечных катализаторов, разделяющих эту борозду на несколько участков.

Отдельной экспериментальной линией является наложение предварительных слоёв биоорганических молекул, эффективно адсорбирующихся на твёрдой поверхности, например полисахаридов. Полисахариды также могут представлять собой различные матриксы, например ячейки циклодекстринов, а также обладать капиллярными порами. В случае комплексного использования минералов с тонкими плёнками с водой на поверхности этих плёнок могут быть расположены ароматические углеводороды, в том числе азотистые основания, порфирины и др. Данный механизм мог существовать в мире фибриллярных и глинистых минералов, когда углеводороды, жирные кислоты и ПАВы оказывались в верхней части плёнки воды, а углеводы адсорбировались на твёрдой минеральной поверхности. В случае испарения плёнок воды корки углеводородов конденсируются на поверхности минералов, где в глубине этих корок и в порах минералов функционируют эффективные в гиперцикле и первичном метаболизме биополимеры. Данные биополимеры при очередном разбавлении углеводородной среды водой используют данные ароматические углеводороды в своих реакциях. В ходе жёстких облучений в слоях углеводородов образуются сахара и в отдельных случаях аминокислоты, которые в дальнейшем используются протонуклеиновыми кислотами.

В техническом плане при построении рельефа твёрдой поверхности помимо кристаллической структуры также существует два пути. Трёхмерные ячейки в твёрдой поверхности могут быть как вертикальные, так и горизонтально вытянутые. Эти разные по форме ячейки обеспечат разные режимы функционирования в протобиологических реакциях. Вертикальные ячейки обеспечат фильтрационный режим в условиях гравитации и термоградиенте. Горизонтальные ячейки обеспечат вектор реакций и продукцию реакций. В связи с этим возникает вопрос об условиях изменения биохимических реакций в связи со сменой режима гравитации. Таким образом, необходимо поставить линейку экспериментов в условиях различных углов твёрдой поверхности минерального субстрата по отношению к поверхности Земли (рис. 35). Это обеспечит набор одной реакции в градиенте условий

от вертикальной до горизонтальной поверхности в отношении биокатализаторов и биологических органелл.

Вторым этапом экспериментов в условиях режима гравитации является перемешивание минеральных субстратов, изменяющих гидродинамический режим. В известных технологиях перемешивание осуществляют на шейкерах, вихреках и центрифугах в виде жидкой среды с реакциями, субстратами и продуктами реакции. Но не перемешивают вместе с твёрдым субстратом служащим иммобилизатором. То есть необходимо создать перемешивание иммобилизатора с иммобилизованными организмами, протобионтами, молекулярными органеллами и биохимическими реакциями. Это обеспечит изменение гидродинамического режима в плёнках и капиллярах жидкой среды, адсорбированной на поверхности минеральных частиц. Таким образом, можно будет создать искусственный аналог золь-геосферы с минеральными частицами, окружёнными плёнкой воды и перемещающимися в различных слоях воздушного пространства.

2.4.3. Минералы, используемые в качестве катализаторов

На сегодняшний день в качестве катализаторов для синтеза нуклеиновых кислот используются многие минералы, и силикаты являются одной из ведущих групп минералов. Так, исследователями [156] были получены полирибонуклеиновые кислоты РНК длиной 100–300 нуклеотидов. Длина таких цепочек уже соответствует малым РНК, то есть обладает всеми свойствами структурных РНК. Для реакции использовались АТФ, ГТФ, УТФ и ЦТФ. Полимеризация осуществлялась при температуре 25 °С и pH 7,5. В качестве минералов катализаторов также использовались габбро, базальт, нефелин и другие. Но силикатные стёкла оказались одними из самых эффективных. В экспериментах при облучении ультрафиолетом среды на минералах с формамидом и синильной кислотой самыми эффективными оказались магнетит и троиллин, в меньшей степени — монтмориллонит, халькопирит, ковеллин [188]. На данных минералах были получены нуклеотидные основания и их аналоги, в частности цитидин, аденин, гуанин.

В полимеризации из одного нуклеотида, в частности ГМФ, исследователям [192] удалось выяснить следующие особенности.

Гуанозинмонофосфат кристаллизуется на поверхности минералов, исходя из чего авторы заключают, что Н-форма 3',5' циклического гуанозинмонофосфата могла накапливаться из миллимолярных растворов в кристаллической форме при высыхании капель на различных минеральных поверхностях ранней Земли (рис. 37). Эти органические кристаллы могли бы обеспечить благоприятные стерические условия для последующей стадии полимеризации с получением коротких олигонуклеотидных последовательностей [192].

Исследователям также удалось выяснить, что разновидности кварца особенно подходят для этой цели, подобно андалузиту, амфиболу или слюдам. Напротив, оливин, кальцит и минералы группы серпентина мешают изучаемой химии полимеризации. Кристаллизация на минеральных поверхностях, которая в основном является контролируемым диффузией процессом, определяет способность 3',5' цГМФ к полимеризации. Наблюдение за тем, что многочисленные аморфные и кристаллические формы SiO_2 совместимы с химией олигомеризации, позволяет предположить, что этот процесс может обычно происходить в широком диапазоне первичных сред, допускающих кристаллизацию циклических мономеров из капельного раствора.

Из этого важного исследования следует, что матрицей для различных протонуклеиновых кислот могли быть среды из отдель-

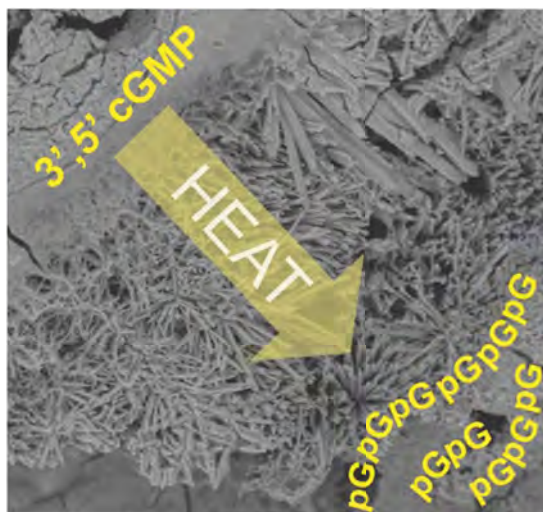


Рис. 37. Кристаллизация гуанозинмонофосфата на поверхности минералов [192]

ных нуклеотидов, отличающиеся как по структуре, так и по агрегатному состоянию.

Ещё одно исследование данного коллектива авторов также подтверждает это положение [143]. В частности авторы смоделировали, как олигонуклеотиды могут быть защищены в пребиотическом пуле (рис. 38), где одним из механизмов является адсорбция олигонуклеотидов на поверхности апатита со средой с Ca^{2+} . Авторам также удалось выяснить, что взаимодействие между

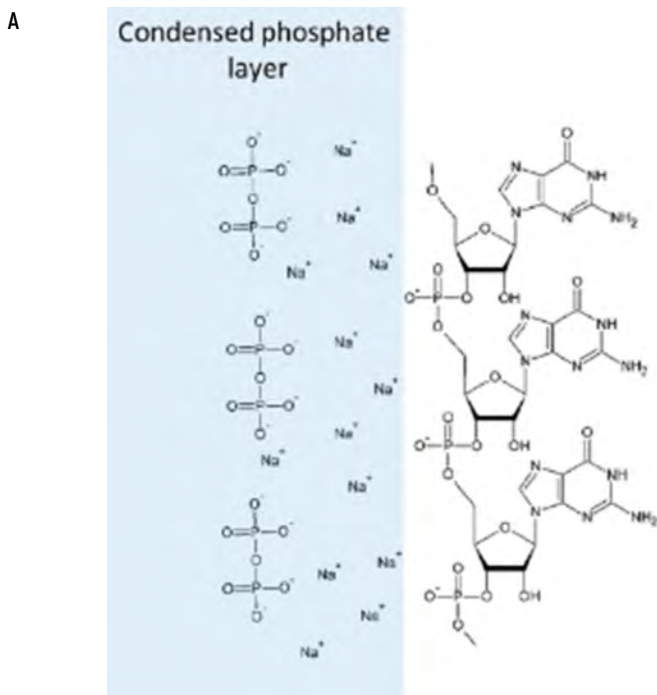
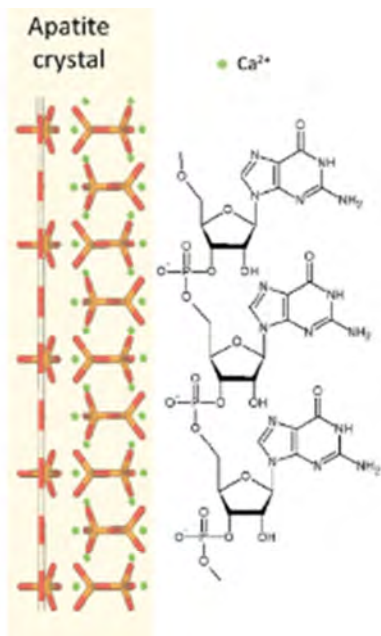


Рис. 38 (начало). Три возможных способа защиты олигонуклеотидов в пребиотическом пуле. Модель А показывает, что конденсированные фосфаты могут связывать

Na⁺-мостики с фосфодизфирными связями олигонуклеотидов и, таким образом, препятствовать атаке окружающих молекул воды-растворителя. На панели Б изображена аналогичная стратегия защиты с использованием нерастворимого фосфатного минерала (гидроксил)апатита (Ca₁₀(PO₄)₆(OH))₂: в этом случае взаимодействие между поверхностью минерала и олигонуклеотидной цепью может быть опосредовано катионами Ca²⁺, расположенными на поверхности кристалла. На панели В представлена ситуация, когда олигонуклеотиды связываются с агрегатными фазами, образованными кластерами цГМФ, например за счёт взаимодействия Н-связей (или стекинга), которые, в свою очередь, делают фосфодизфирные связи олигонуклеотидов менее доступными для гидролитического расщепления [143].

Б



В

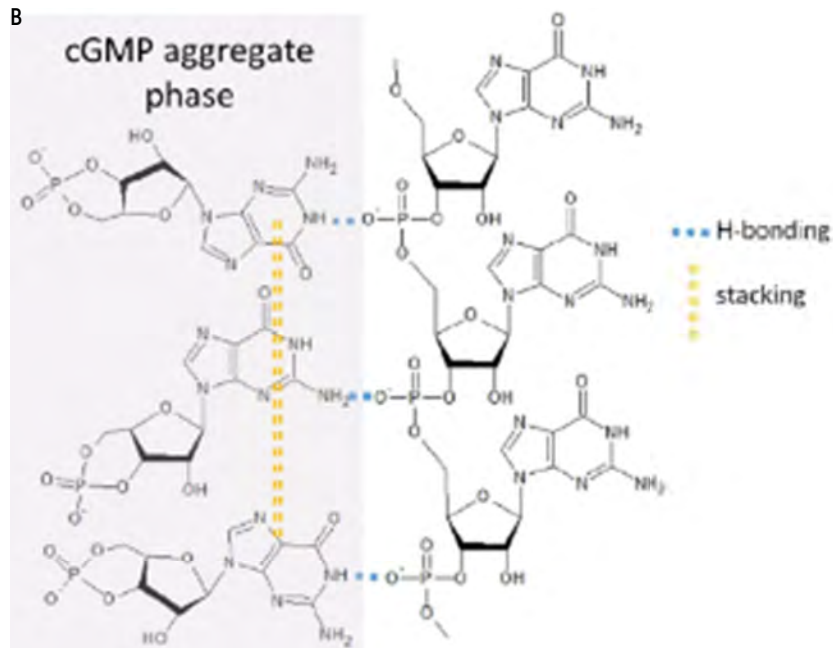


Рис. 38 (окончание)

высокоупорядоченными кристаллическими и неупорядоченными гидратированными доменами лиофилизированных образцов гуанозинмонофосфатов Н-формы 3',5' приводит к возникновению очень сложной химической системы. В одних случаях образуются агрегаты, в других полимеры (рис. 39).

Авторы также установили, что в более длительных временных масштабах выход олигомеров колеблется. Это позволяет предположить, что перенос материала может в значительной степени контролировать эту вероятную пребиотическую реакцию [143]. Под переносом материала подразумевается создание среды из нуклеотидов и обеспечение этой средой в дальнейшем строящихся олигонуклеотидных полимеров. Но это также свидетельствует о самоорганизации субстратов состоящих из одного нуклеотида. То есть наблюдаемые колебания в выходе нуклеотидов также косвенно свидетельствуют о возможности организации гиперцикла в среде из одного нуклеотида. Это ещё раз подтверждает, что элементарной ячейкой жизни, по крайней мере на молекулярном уровне, является нуклеотид.

Ещё одним важным исследованием по адсорбции нуклеиновых кислот и их комплексов является использование дендримеров по адсорбции нуклеиновых кислот на поверхности стёкол [135]. Исследователи сначала создали дендримеры из полиамидоамина (PAMAM), дисукцинимидилглутарата (DSG) и 3-аминопропилтриэтоксисилана (PDITC), после чего адсорбировали их на поверхности стёкол (рис. 40, А). Далее на их поверхность привили аминомодифицированные олигонуклеотиды (рис. 40, Б). Затем путём супрамолекулярного взаимодействия олигонуклеотиды прикрепили к дендримерам (рис. 40, В). И следующим шагом было прикрепление флуоресцентных липосом на поверхность адсорбированных дендримеров для отслеживания реакций (рис. 40, Г).

Это исследование продемонстрировало возможность адсорбции на силикаты дендримеров и липосом, состоящих из схожих по составу с нуклеотидами полимером и функционально связанных с ними молекул. Таким образом, минералы, используемые для полимеризации нуклеиновых кислот, это силикаты, сульфиды и реже оксиды. В сульфиды ионы железа и меди являются, как правило, катализаторами, тогда как в силикатах другие элементы. По сингонии эти минералы, как правило, характеризуются гексагональной и моноклинной сингонией, реже тетрагональной, три-

The diagram illustrates the self-assembly of vCASP into a protein cage. The process begins with a **vCASP solution** (bottom left). **drying** leads to a monolayer of vCASP proteins. **heating** of the monolayer results in a bilayer structure. **heating** of the bilayer leads to a vesicle structure. **wetting** of the vesicle results in a protein cage structure. **aggregation** of the protein cage leads to the final protein cage structure (bottom right). The central part of the diagram shows the molecular structure of vCASP, which is a dimeric protein with a central cavity. The vCASP molecules are shown in a monolayer, bilayer, and vesicle structure, and finally aggregated into a protein cage.

111

гональной, ромбической и кубической. Из горных пород используются тёмные магматические породы, содержащие силикаты.

2.5. Метод молекулярных колоний

Группа исследователей под руководством А. Б. Четверина (1991; 1993; 1997; 2007; 2008; 2010; 2011; 2019; 2021) разработала метод выращивания молекулярных колоний нуклеиновых кислот — РНК и ДНК — на основе метода культивирования бактериальных колоний на твёрдой питательной среде. Этот метод исследователями был широко развит и вошёл в историю как один из экспериментальных этапов подтверждения теории мира РНК. В основе метода лежала способность Q β -репликазы размножать в агарозном геле небольшие участки РНК в присутствии рибонуклеозидтрифосфатов. Данная линейка методов требует детального рассмотрения.

Для получения нанокolonий отдельные молекулы ДНК или РНК размножают в твёрдой гидратированной среде — геле. В отличие от клеток нуклеиновые кислоты размножаются не на поверхности, а внутри (в жидкой фазе) геля, содержащего подходящую полимеразу, нуклеозидтрифосфаты и — если необходимо — праймеры (рис. 41). Поэтому для размещения нанокolonий в одной плоскости размножение осуществляют в тонком слое геля.

Для выращивания нанокolonий можно использовать любую систему размножения нуклеиновых кислот. Чтобы нанокolonию можно было увидеть невооружённым глазом, она должна содержать до миллиарда копий исходной молекулы. Такое количество копий можно получить за разумное время только при использовании экспоненциальной системы размножения, позволяющей удваивать число матричных наномолекул в каждом цикле. Примерами экспоненциальных систем являются ПЦР (полимеразная цепная реакция) [185], 3SR (или SSSR, от Self-Sustained Sequence Replication, самоподдерживаемая репликация нуклеотидных последовательностей) [151], NASBA (от Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) [142], SDA (от Strand Displacement Amplification, амплификация с вытеснением цепи) [199], LCR (от Ligase Chain Reaction, лигазная цепная реакция) [126; 206], RCA (от Rolling Circle Amplification, размножение по принципу катящегося кольца) [149;

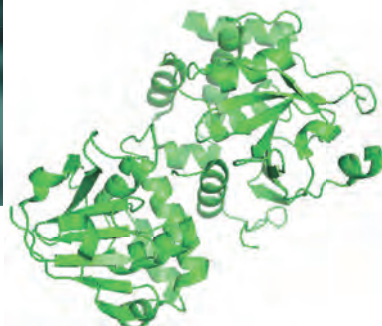
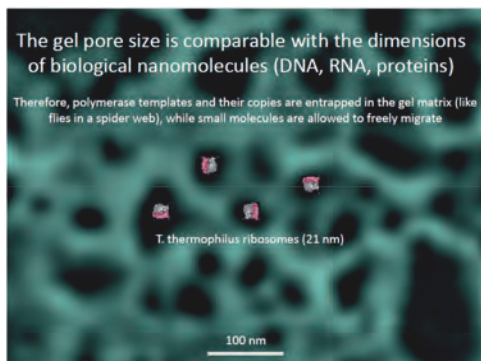


Рис. 41. Модель рибосомы в ячейках агарозного геля в виде полимеразы и репликаза фара Q β – РНК-зависимая РНК-полимераза

182]. Первые нанокolonии (colonии реплицирующихся РНК) были получены группой А. Б. Четверина в январе 1989 г. с использованием Q β -репликазы фермента, способного с рекордной скоростью размножать РНК *in vitro*, производя до 10^{10} копий матричной РНК за 10 мин инкубации. Colonии РНК получали в слое агарозы, содержащем Q β -репликазу, рибонуклеозидтрифосфаты (rNTP) и соответствующий буфер. После инкубации в течение 1 ч при 37 °C агарозу окрашивали бромистым этидием. Так как РНК образует с бромистым этидием интенсивно флуоресцирующий комплекс, на месте колоний РНК появлялись ярко светящиеся пятна, видимые при облучении ультрафиолетовым светом [109].

Не все РНК могут быть размножены Q β -репликазой, а только геномная РНК фага Q β и очень узкий класс относительно коротких (от нескольких десятков до нескольких сот нуклеотидов) матриц, называемых RQ РНК (от Replicable by Q β replicase) [109]. В природе RQ РНК являются сателлитами фага Q β [140]. Вероятность, что случайно выбранная РНК длиной 50–70 нт окажется RQ РНК, составляет $\approx 10^{-12}$. В 1975 г. М. Эйген и сотрудники опубликовали сенсационное сообщение о том, что RQ РНК могут возникать «спонтанно» (в отсутствие добавленной матрицы) в инкубационной смеси, содержащей высокоочищенную Q β -репликазу и все четыре rNTP [122]. Этот эксперимент послужил основанием для выдвижения концепции самозарождения RQ РНК, то есть их синтеза *de novo* путём беспорядочной конденсации нуклеотидов и последующей эволюции полирибонуклеотидов, способных к репликации, в эффективно размножающиеся молекулы.

Авторы концепции рассматривали спонтанный синтез RQ РНК Q β -репликазой как «основополагающую» экспериментальную модель для исследования возникновения генетической информации путём эволюции на молекулярном уровне [129; 130]. Эта концепция доминировала до тех пор, пока с помощью нанокolonий А. Б. Четверин с коллегами [112] не выяснили истинный источник реплицирующихся РНК. Исследователи обратили внимание на то, что набор продуктов спонтанного синтеза зависит от того, в каком помещении проводится эксперимент. Это навело на мысль, что синтез может вызываться молекулами RQ РНК, попадающими в реакционную смесь из воздуха. Чтобы проверить эту возможность, Q β -репликационную реакцию проводили, как и раньше, в агарозе, залитой в чашки Петри. Однако, чтобы следить за попаданием молекул РНК из воздуха, использовали два слоя агарозы. Нижний

слой содержал rNTP, а верхний, заливаемый после застывания нижнего, — Q β -репликазу (рис. 42, А). Благодаря разделению rNTP и полимеразы размножение РНК могло происходить только после заливки ферментного слоя, на границе между слоями. Перед этим чашки с субстратным слоем выдерживали на столе в течение 1 ч, причём одна чашка была закрыта, а другая — открыта. После заливки верхнего ферментного слоя чашки инкубировали на льду до застывания агарозы, а затем в течение 1 ч при 25 °С. Окрашивание агарозы бромистым этидием показало, что колоний РНК образуется больше в чашке, которая была открытой. Меньше всего колоний вырастало в случае, если все процедуры проводили в помещении, где до этого с RQ РНК не работали [112]. Эти эксперименты продемонстрировали, что молекулы RQ РНК присутствуют в лабораторном воздухе и могут заражать реакционную смесь, создавая впечатление спонтанного синтеза (рис. 43, А).

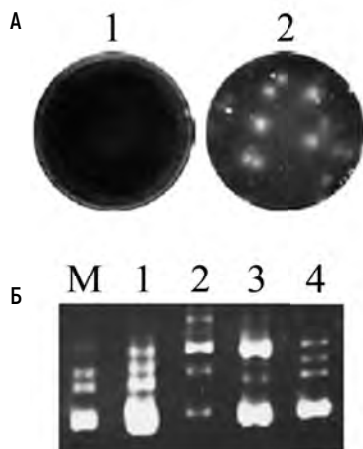


Рис. 42. Репликация RQ РНК в иммобилизованной среде [А] и в жидкости [Б] [112]:

А. Потомство каждой молекулы, размножаемой в иммобилизованной среде (агарозе), формирует отдельную колонию и потому не конкурирует с потомством других молекул. Агарозные гели, содержащие полный набор реакционных компонентов, окрашены бромистым этидием либо до [1], либо после [2] инкубации в течение 1 ч при 25 °С.

Б. Конкуренция RQ РНК, наблюдаемая при их размножении в жидкости, приводит к невоспроизводимости продуктов синтеза. 1, 2, 3, 4 — RQ РНК, синтезированные Q β -репликазой в четырёх разных пробирках при использовании одного и того же препарата RQ РНК (М) в качестве матрицы. Представлена электрофореграмма продуктов синтеза, гель окрашен бромистым этидием

2.5.1. Основные свойства нанокolonий

Колонии RQ РНК, вырастающие в агарозе, весьма диффузны. Эту проблему удалось преодолеть путём замены субстратного слоя агарозы на смоченный раствором rNTP нейлоновый мембранный фильтр, который накладывали на агарозу, содержащую

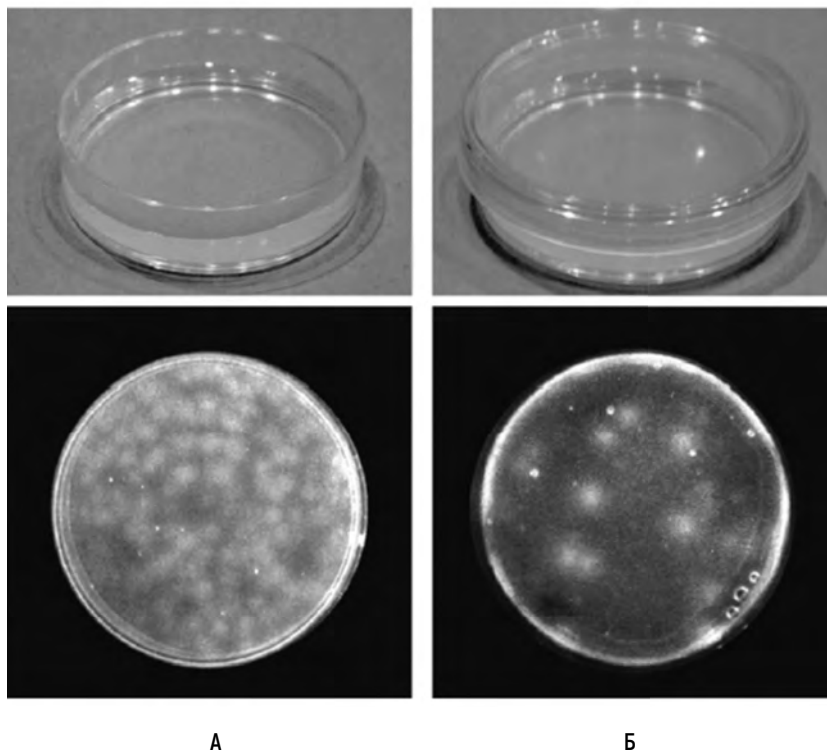


Рис. 43. Попадание реплицирующихся РНК из воздуха на агарозу, содержащую Q β -репликазу и нуклеотиды, приводит к образованию большого числа колоний РНК в открытой [А], чем в закрытой [Б] чашке Петри [112]

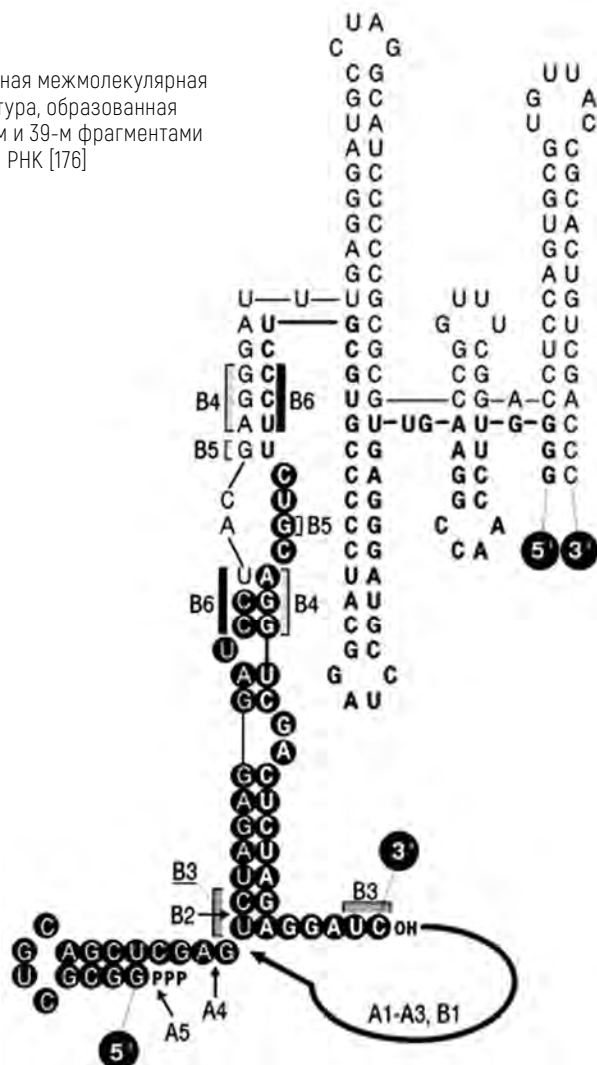
Q β -репликазу [112]. Нейлоновая мембрана обратимо связывает нуклеиновые кислоты и тем самым препятствует их диффузии. Кроме того, поскольку в процессе размножения часть молекул РНК связывается с мембраной, её можно использовать для обнаружения нанокolonий по включению меченых субстратов или по гибридизации с мечеными зондами. В то же время, поскольку значительная часть РНК остаётся в агарозе, можно изготавливать реплики нанокolonий с использованием новых мембран. При использовании [α - 32 P]-меченных rNTP колоний РНК можно зарегистрировать по включению метки в пределах первых 10 мин инкубации при комнатной температуре. Исходя из удельной радиоактивности субстратов, времени экспозиции рентгеновской плёнки и размера RQ РНК можно заключить, что в сред-

нем в каждой колонии образуется около $0,02$ пмоль RQ РНК, или 10^{10} молекул. Поскольку почти каждая наноклония происходит из единственной молекулы, это означает, что за 10 мин осуществляется около 30 циклов репликации и, следовательно, время дупликации RQ РНК составляет около 20 с. Таким образом, скорость размножения RQ РНК в агарозе не меньше, чем в жидких средах, где время дупликации на экспоненциальной фазе роста было оценено в 30 с. Если на агарозу высевать известные количества реплицирующейся РНК, то число колоний РНК увеличивается над спонтанным уровнем, причём прирост пропорционален и близок к числу посеянных молекул [141]. Выход наноклоний от числа посеянных молекул RQ РНК сравним с долей жизнеспособных (бляшкообразующих) частиц (10%) в препаратах Q β фага дикого типа. При посеве смеси, содержащей разные виды RQ РНК, и последующем анализе колоний путём гибридизации с соответствующими мечеными зондами оказалось, что разные колонии содержат разные RQ РНК. Таким образом, колонии РНК идентичны посеянным молекулам RQ РНК. Это указывало на то, что каждая колония представляет собой потомство единственной молекулы RQ РНК, то есть молекулярный клон. Так как молекулярные колонии представлены трёхмерными структурами, гипотетическая межмолекулярная вторичная структура могла выглядеть следующим образом (рис. 44).

2.5.2. Рекомбинация РНК в бесклеточной системе

Группа исследователей под руководством А. Р. Четверина (1997, 2008) в качестве субстратов рекомбинации использовала взаимодополняющие 5'- и 3'-фрагменты минус-цепи RQ135 РНК [RQ135(-) РНК], снабжённые чужеродными довесками (рис. 45, А). Рекомбинантные молекулы детектировали путём выращивания колоний RQ РНК: смесь фрагментов высевали на слой агарозы, содержащий Q β -репликазу, который затем накрывали нейлоновой мембраной, смоченной раствором gNTP, инкубировали при 22 °С в течение 60 мин, после чего мембрану гибридизовали с 32P-меченым зондом. В качестве зонда использовали 5'-фрагмент RQ135(-) РНК или олигодезоксирибонуклеотид, гомологичный чужеродному довеску. Каждый из этих зондов способен гибридизоваться с (+)-цепью ожидаемого продукта рекомбинации, которая

Рис. 44. Предсказанная межмолекулярная вторичная структура, образованная расширенными 59-м и 39-м фрагментами RQ13521 РНК [176]



при экспоненциальном размножении синтезируется наряду с (-)-цепью. О возникновении рекомбинантов судили по образованию гибридизующихся с зондом колоний RQ РНК, число которых отражало частоту рекомбинаций.

При размножении в жидкости даже природных RQ РНК, отобранных на высокую эффективность репликации, набор продуктов не воспроизводится: в разных пробирках доминируют разные

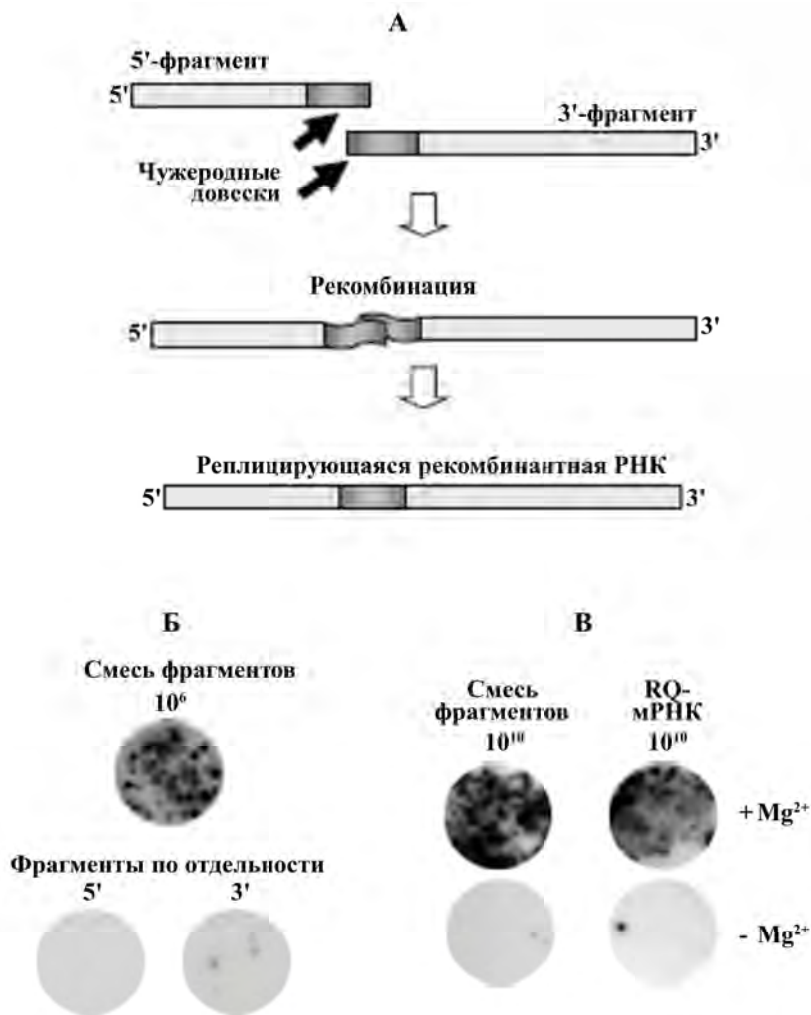


Рис. 45. Рекомбинация РНК in vitro

виды молекул (рис. 42, Б). С размножением же рекомбинантных РНК ситуация более сложная. Если рекомбинация и приведёт к появлению реплицирующихся молекул, то большинство из них окажутся дефектными (если только рекомбинация не привела к точному восстановлению природной последовательности) и не смогут составить конкуренцию примесным природным РQ РНК. Напротив, при размножении в геле разные молекулы РQ РНК

находятся в разных наноклониях и не мешают размножению друг друга (рис. 42, А). Это позволяет размножить и подсчитать даже слабо реплицирующиеся молекулы на фоне эффективно реплицирующихся РНК.

2.5.3. Техника смены матриц для рекомбинации РНК

Экстрагированные из колоний рекомбинантные RQ РНК клонируют в виде кДНК в составе плазмидного вектора и свенируют (рис. 46, А). Все рекомбинанты содержали целый 5'-фрагмент, а также целый или укороченный с 5'-конца 3'-фрагмент. Несмотря на наличие гомологичных довесков, во всех случаях рекомбинация фрагментов происходит по негомологичным участкам, то есть все рекомбинанты оказались негомологичными. В соответствии с гипотезой смены матриц сначала синтезируется

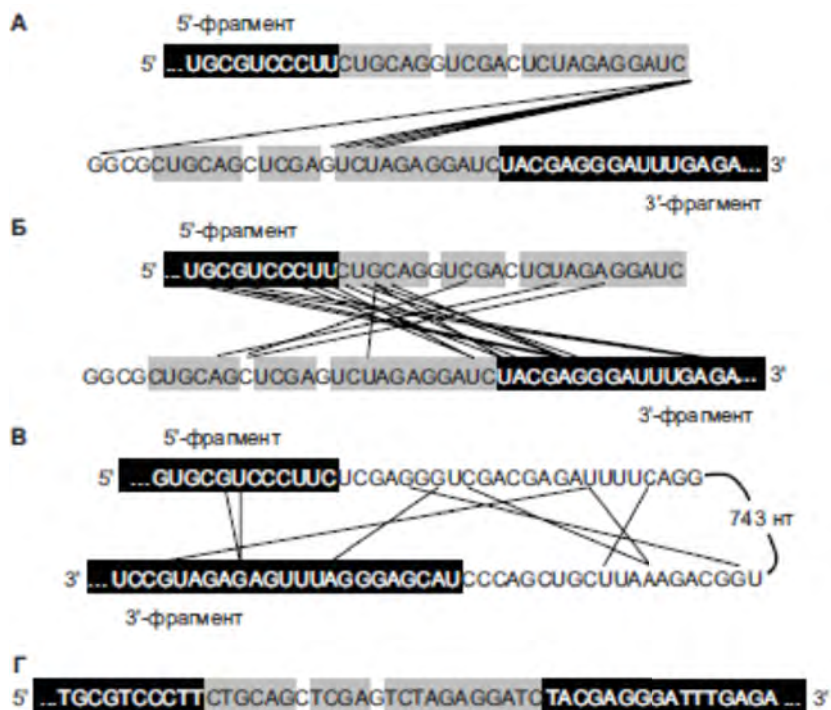


Рис. 46. Нуклеотидные последовательности продуктов рекомбинации

комплементарная копия (или её часть) первой матрицы (в нашем случае — 3'-фрагмента), которая затем служит праймером для копирования второй матрицы (5'-фрагмента). Существование такого механизма было доказано для РНК-зависимых ДНК-полимераз ретровирусов. Действительно, в результате инкубации той же смеси РНК-фрагментов в присутствии обратной транскриптазы вируса миелобластома птиц (AMV) и её субстратов (dNTP), образовывался гомологичный рекомбинант (рис. 46, Г) [139]. Следовательно, фрагменты, использованные в данных экспериментах, способны служить субстратами для гомологичной рекомбинации, однако Q β -репликаза эту возможность не использует. Более того, частота рекомбинации в присутствии Q β -репликазы не изменялась, если доведки 5'- и 3'-фрагментов меняли на негомологичные. Более того, все рекомбинанты имели такую же структуру, что и рекомбинанты, произошедшие из фрагментов с гомологичными доведками, то есть содержали целиком 5'-фрагмент и часть 3'-фрагмента.

Условия, при которых наблюдается рекомбинация (рН, температура, концентрации солей и Mg²⁺), полностью соответствуют внутриклеточным; поэтому можно ожидать, что подобная рекомбинация происходит и в клетке. Экстраполяция к концентрации Q β -РНК в инфицированных клетках *E. coli* (10⁻⁵ М, как определено Ч. Вайсманном [202]) позволяет предположить, что в клетке аналогичный процесс должен происходить с частотой 10⁻⁴–10⁻⁵ на нуклеотид за 1 ч (что примерно равно продолжительности инфекционного цикла). Это согласуется с наблюдаемой частотой негомологичной рекомбинации у РНК-содержащих бактериофагов *in vivo* и является косвенным свидетельством того, что и в клетках рекомбинантные молекулы образуются путём реакций между молекулами РНК без привлечения ДНК-интермедиатов [109].

2.5.4. Спонтанная, межмолекулярная и внутримолекулярная рекомбинация РНК

Используя окисление 5'-фрагмента для подавления рекомбинации в присутствии Q β -репликазы, отделяют собственно рекомбинацию (образование рекомбинантов) от размножения продуктов рекомбинации в виде нанокolonий. С этой целью смесь фрагментов РНК сначала инкубируется в выбранных условиях, а перед посевом

на агарозу окисляется периодатом и расплавляется, предварительно связав все свободные ионы Mg^{2+} хелатором (ЭДТА) [112]. Расплавление помогает понизить уровень остаточной рекомбинации, обусловленной неполным окислением РНК, благодаря разрушению нековалентных комплексов между фрагментами. Такая обработка практически полностью предотвращает дальнейшую рекомбинацию и в то же время не мешает росту колоний, если в образце присутствовал готовый рекомбинант. Следовательно, колонии РНК могут образоваться лишь при условии, что рекомбинация произошла до окисления и расплавления смеси фрагментов. Такой подход, то есть запрещение рекомбинации в процессе роста колоний, даёт возможность выяснить, может ли рекомбинация происходить в отсутствие Q β -репликазы, а также позволяет исследовать роль репликазы и других ферментов в рекомбинации РНК.

Оказалось, что фрагменты РНК могут рекомбинировать и в отсутствие Q β -репликазы и gNTP, образуя реплицирующиеся молекулы. Единственным, но обязательным условием является наличие двухвалентных катионов — Mg^{2+} (рис. 45, В, слева). Однако частота такой «спонтанной» рекомбинации на несколько порядков ниже, чем в присутствии репликазы: обнаружить спонтанную рекомбинацию можно лишь после инкубации смеси фрагментов в присутствии Mg^{2+} при 37 °С в течение 16–64 ч. Отличается и механизм спонтанной рекомбинации: она не требует наличия свободных гидроксильных групп, так как одинаково эффективна при любой модификации 3'-конца 5'-фрагмента [112].

Свенирование РНК, экстрагированных из колоний, показало, что рекомбинация происходит по внутренним участкам фрагментов с частичной потерей последовательности как 3'-, так и 5'-фрагмента (рис. 46, Б). Для рекомбинации не нужна гомология последовательностей, так как эффективность рекомбинации фрагментов с гомологичными и негомологичными довесками одинакова и все рекомбинанты негомологичны. Наконец, места рекомбинаций более или менее случайным образом распределены по нуклеотидной последовательности 5'- и 3'-фрагментов в пределах ± 10 –20 нуклеотидов от мест стыка последовательностей RQ135 РНК и чужеродных довесков. По-видимому, отсутствие рекомбинации за пределами этих участков является следствием отбора: Q β -репликаза плохо размножает как рекомбинанты, у которых сильно повреждена исходная структура RQ135 РНК, так и рекомбинанты, несущие слишком длинные вставки. Отсюда следует,

что за наблюдаемую рекомбинацию не отвечают не только белки, но и какие-либо рибозимоподобные структуры. Иными словами, способность к рекомбинациям является неотъемлемым свойством самих полирибонуклеотидов.

Аналогичные эксперименты уже не с фрагментами, а с длинными производными RQ РНК (650–930 нуклеотидов), внутрь которых были встроены последовательности различных мРНК, показали, что спонтанная рекомбинация может происходить и внутримолекулярно. Такие RQ мРНК не способны размножаться Q β -репликазой [112], но в процессе инкубации в присутствии Mg²⁺ происходят рекомбинации *in cis*, приводящие, как показало свенирование, к делеции вставок с образованием реплицирующихся молекул, выявляемых с помощью нанокolonий (рис. 45, В; 46, В). Вероятно, спонтанная рекомбинация происходит по механизму, включающему негидролитический разрыв сахарофосфатного остова РНК с образованием концов, несущих 2',3'-циклофосфат и 5'-гидроксил, с последующим обращением реакции с участием концов разных молекул (кросс-лигированием).

Другой возможный механизм — межмолекулярная атака межнуклеотидного фосфата 2'-гидроксилом, приводящая к образованию лариата (разветвлённой молекулы). Если репликаза умеет копировать такие структуры, то прочитывание ею лариата может привести к образованию линейной рекомбинантной РНК. Поскольку оба этих механизма требуют наличия 2'-гидроксильных групп, спонтанная рекомбинация является, по всей видимости, свойством, присущим исключительно РНК, и не должна происходить между молекулами ДНК.

Использование нанокolonий позволило качественно и количественно охарактеризовать свойства спонтанной рекомбинации РНК [112; 139]. Оказалось, что число рекомбинантных молекул нарастает линейно: к 64 часам инкубации их образуется в 4 $\pm$ 1,8 раза больше, чем к 16 часам ($n = 10$). Спонтанная рекомбинация РНК является реакцией псевдопервого порядка, то есть не зависит от концентрации рекомбинирующих фрагментов в исследованном диапазоне концентраций (5–500 нМ). Причиной как линейности кинетики, так и независимости рекомбинации от концентрации фрагментов является то, что скорость нековалентной ассоциации фрагментов РНК в условиях реакции существенно выше, чем скорость собственно химического процесса. Скорость рекомбинации увеличивается примерно в 3 раза при повышении температуры

на 10 °С. Такое значение коэффициента Вант-Гоффа характерно для некатализируемых (неэнзиматических) химических реакций. Константа скорости реакции составит $\approx 10^{-9} \text{ ч}^{-1}$ на 1 фосфодиэфирную связь при 37 °С.

Так как для спонтанной рекомбинации не требуется ничего, кроме самой РНК и Mg^{2+} , она должна повсеместно и постоянно происходить в природе. Хотя в «чистой» (все компоненты которой известны; в отличие от, например, лизатов, состав которых очень сложно контролировать) бесклеточной системе скорость спонтанной рекомбинации значительно ниже, чем скорость негомологичной рекомбинации у вирусов, она достаточно высока, чтобы играть определённую эволюционную роль как в пребиотическом «мире РНК», так и в настоящее время.

На первый взгляд, скорость спонтанной рекомбинации чрезвычайно мала. Без использования нанокolonий продукты этой реакции практически невозможно зарегистрировать, особенно на фоне огромного избытка непрорекомбинировавших фрагментов. Тем не менее спонтанные перестройки молекул РНК могут играть важную роль в эволюции как РНК-, так и ДНК-геномов. Даже не будучи промотированной клеточными РНК-связывающими белками, спонтанная рекомбинация должна приводить к появлению новой рекомбинантной РНК в одной эукариотической клетке каждую минуту. Это означает, что, например, в течение жизни в организме человека должно произойти до 10^{20} таких событий. Весьма вероятно, что ферменты, кодируемые мобильными элементами геномов [34], могут копировать рекомбинантные РНК и встраивать их кДНК-копии в хромосому. Интеграция в геном даже очень небольшой доли образовавшихся рекомбинантных последовательностей может привести к его значительному изменению. В этом процессе могут участвовать как ферментный аппарат ретротранспозонов, так и клеточные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы, в той или иной степени способные использовать РНК в качестве матрицы.

С учётом перечисленных возможностей, саморекомбинацию следует рассматривать как важный фактор, влияющий на изменчивость генома и вероятность онкогенной трансформации. Необходимо также иметь в виду, что некоторые клеточные белки, особенно РНК-связывающие, могли бы неспецифически стимулировать самопроизвольную рекомбинацию РНК, как они стимулируют действие ряда рибозимов. Кроме того, спонтанная

рекомбинация РНК могла играть важную роль в формировании и развитии мира РНК [112]. Добавим также, что способность к саморекомбинации является дополнительным аргументом в пользу идеи первичности РНК по отношению к ДНК, высказанной впервые в 1957 г. А. Н. Белозерским [95].

2.5.5. Нерепликативная и репликативная рекомбинация РНК

Спонтанная рекомбинация является нерепликативной, так как не требует синтеза (репликации) РНК и происходит в отсутствие репликазы. После опубликования группой А. Б. Четверина (1997; 2008) первых результатов по рекомбинации между фрагментами RQ РНК *in vitro* (рис. 45) аналогичные эксперименты с фрагментами вирусных РНК и их различных модификаций были проведены *in vivo*.

С этой целью фрагменты РНК, полученные с помощью транскрипции *in vitro*, вводили в клетки путём трансфекции. С использованием фрагментов генома полиовируса в лаборатории В. И. Агола и вируса диареи крупного рогатого скота в лаборатории П. Бехера было показано, что и в клетках рекомбинация РНК может происходить нерепликативно (в отсутствие активной репликазы) [151; 190]. Свенирование образовавшихся жизнеспособных вирусов выявило как негомологичные, так и гомологичные рекомбинанты. Относительно высокое содержание гомологичных рекомбинантов в этом случае (по сравнению с экспериментами *in vitro*), вероятно, является результатом отбора вследствие их большей жизнеспособности. Частота нерепликативной рекомбинации в клетках оказалась на порядки выше, чем частота спонтанной рекомбинации, катализируемой ионами Mg^{2+} , что указывает на возможное участие клеточных ферментов. Действительно, практически во всех видах клеток присутствуют гидролитические ферменты, расщепляющие РНК с образованием 5'-гидроксила и 2',3'-циклофосфата, а также РНК-лигазы, сшивающие фрагменты с такими группами на концах [172]. Более того, один и тот же фермент может и фрагментировать РНК, и лигировать фрагменты, как это показано для рибонуклеазы T1 [129]. Необходимый для лигирования 2',3'-циклофосфат может быть образован из 3'-концевой фосфатной группы с помощью циклазы. Весьма вероятно существование и других механизмов рекомбинации РНК, если учесть, что в клетке существует много

ферментов, способных неспецифически расщеплять и лигировать РНК [36; 163].

Экспериментальный подход, с помощью которого были продемонстрированы спонтанные рекомбинации (то есть разделение стадий образования и размножения рекомбинантов), был использован и для изучения влияния на рекомбинацию вирусных РНК-зависимых РНК-полимераз [112]. В этом случае перед выращиванием нанокolonий инкубационную смесь не только окисляют, но и подвергают фенольной экстракции для удаления белков. Эксперименты по инкубации смеси 5'- и 3'-фрагментов с добавлением компонентов репликационной смеси в разных сочетаниях показали, что существенно увеличить скорость рекомбинации по сравнению со спонтанным уровнем удаётся только при добавлении всех компонентов системы репликации, то есть Q β -репликазы, Mg²⁺ и всех четырёх rNTP (АТР, СТР, GTP и UTP). При этом изменяется механизм рекомбинации: она подавляется окислением 5'-фрагмента. Отсюда следовало, что рекомбинация РНК осуществлялась самой Q β -репликазой и что, по-видимому, для рекомбинации необходим синтез РНК. Для рекомбинации необходим не просто синтез РНК, а синтез довольно протяжённых участков. Даже когда 3'-дезоксид-АТР включался в растущую цепь наряду с АТР в пропорции 1:5, рекомбинация оказывалась существенно подавлена. То есть рекомбинация, осуществляемая Q β -репликазой, является репликативной.

Классическим объектом наблюдения рекомбинации РНК *in vivo* является полиовирус. Для объяснения гомологичной рекомбинации именно у этого вируса в 1974 г. был впервые постулирован П. Купером механизм смены матриц вирусной репликазой (РНК-зависимой РНК-полимеразой). С тех пор гипотеза смены матриц применялась для объяснения всех случаев рекомбинации РНК, хотя, в отличие от смены матриц при обратной транскрипции, не была доказана экспериментально. Более того, понятия «смена матриц» и «репликативная рекомбинация» использовали как синонимы. После выхода работы [139] по рекомбинации РНК *in vitro* в присутствии Q β -репликазы, поставившей механизм смены матриц под сомнение, Р. Перец-Берков и сотрудники провели эксперимент *in vitro*, в котором клетки трансфецировали плазмидой, кодирующей полноразмерный геном полиовируса. Транскрипция плазмиды давала РНК, направляющую синтез активной репликазы, но не способную к репликации из-за двух точечных мута-

ций в 5'-нетранслируемой области. При совместной трансфекции с фрагментом полиовирусной РНК, несущим интактную 5'-нетранслируемую область, благодаря рекомбинации образовывался инфекционный вирус. В то же время рекомбинация не происходила, если фрагмент РНК, несущий 5'-нетранслируемую область, нёс на 3'-конце кордицепин (3'-деоксиаденозин) и, следовательно, не имел свободного 3'-гидроксила.

Таким образом, как и в экспериментах *in vitro*, рекомбинация *in vivo* требовала наличия 3'-гидроксила на 5'-субстрате. Поскольку все рекомбинанты были гомологичными и образовывались в присутствии активной репликазы, авторы предложили механизм «гибридизации и удлинения праймера», который по своей сути является составной частью механизма репликативной смены матриц. По мнению авторов, истинными субстратами рекомбинации являются РНК разной полярности (разных знаков); применительно к нашей экспериментальной схеме — 5'-фрагмент и комплементарная копия 3'-фрагмента. Эти фрагменты гибридизуются комплементарными участками, и далее один из фрагментов или они оба служат праймерами: удлиняются полимеразой, использующей другой фрагмент в качестве матрицы. Естественно, при этом получается гомологичный рекомбинант. Частота такой рекомбинации должна зависеть от стабильности гибрида, а следовательно, от длины комплементарных участков праймера и матрицы.

Поскольку рекомбинация РНК, осуществляемая Q β -репликазой, не является гомологичной, хотя и является репликативной, важно было прямо сравнить влияние Q β -репликазы и полиовирусной репликазы (белка 3D-pol) на рекомбинацию РНК в одинаковых условиях. Общим репликазам были предложены одни и те же субстраты рекомбинации и оптимальные реакционные условия, которые оказались похожими. Использовали также одну и ту же систему детекции рекомбинантов — Q β -репликазную версию наноколоний. Для того чтобы облегчить образование рекомбинантов по механизму «гибридизации и удлинения праймера», в качестве субстратов рекомбинации использовали пары фрагментов RQ135 РНК разной полярности, включающие 5'-фрагмент и комплемент 3'-фрагмента («3'-фрагмент») с довесками разной длины. Внутри каждой пары довески комплементарны (в соответствующих парах фрагментов одной полярности они гомологичны), но так как довески имеют разную длину, то и длины комплементарных участков различаются (рис. 47, слева). Оказалось, что рекомбинация между

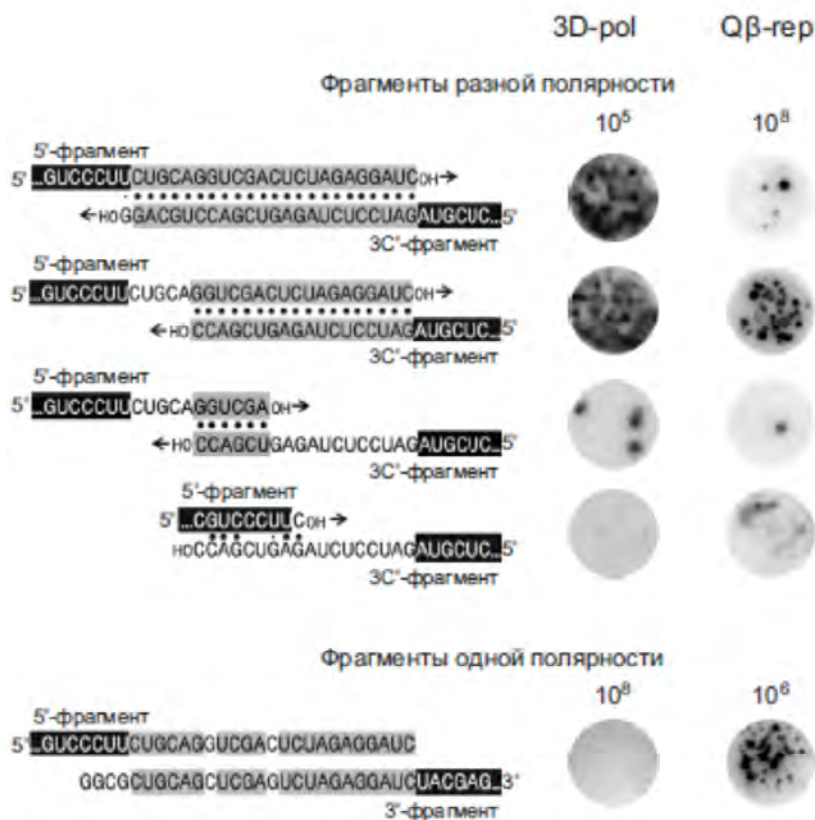


Рис. 47. Сравнение эффективностей рекомбинаций, осуществляемых полиовирусной полимеразой (3-D-pol) и Qβ-репликазой (Qβ-rep)

фрагментами разной полярности, осуществляемая полиовирусной репликазой, очень эффективна и полностью согласуется с механизмом «гибридизации и удлинения праймера»: пары фрагментов с более длинными комплементарными участками рекомбинируют с большей частотой (рис. 47, колонка «3D-pol») и все рекомбинанты гомологичны. В то же время рекомбинация между теми же фрагментами, осуществляемая Qβ-репликазой, на 3–4 порядка менее эффективна, нет корреляции между частотой рекомбинации и протяжённостью комплементарных участков (рис. 47, колонка «Qβ-гер») и все рекомбинанты негомологичны.

Вопреки механизму «гибридизации и удлинения праймера» рекомбинация, осуществляемая Qβ-репликазой между фрагмен-

тами разной полярности, на 2–3 порядка менее эффективна, чем между фрагментами одной полярности (рис. 47). Для её подавления недостаточно окисления 5'-фрагмента (как при реакции между фрагментами одной полярности), а необходимо окисление обоих фрагментов. В отличие от Q β -репликазы, полиовирусная РНК-полимераза не образует детектируемых количеств рекомбинантов при реакции между фрагментами одной полярности (рис. 47). Таким образом, нанокolonии помогли установить, что разные РНК-зависимые РНК-полимеразы используют разные механизмы для осуществления рекомбинации РНК: полиовирусная РНК-полимераза использует механизм «гибридизации и удлинения праймера», в то время как Q β -репликаза его отвергает.

Возможные механизмы рекомбинации РНК, осуществляемой Q β -репликазой, могут быть реализованы следующим образом. Рекомбинанты, полученные при рекомбинации между парами фрагментов, один из которых был окислен перйодатом, были свенированы группой А. Б. Четверина (2008, 2010). Оказалось, что почти все рекомбинанты содержат оба фрагмента целиком с дополнительными вставками различной длины между фрагментами. Последовательности вставок зависели от того, какой фрагмент был окислен, и оказались частично комплементарны участкам чужеродных довесков. На основании этих наблюдений и учитывая, что Q β -репликаза может наращивать РНК с 3'-конца, образуя шпильки [129], было сделано предположение, что вставки образуются путём удлинения 3'-конца фрагмента и частичного копирования этого же фрагмента.

Далее, возможны два пути развития событий: либо 3'-гидроксил удлинённого 3'С-фрагмента атакует межнуклеотидный 5'-фосфат на копии 5'-фрагмента (реакция трансэстерификации), либо 3'С-фрагмент удлиняется дальше, используя 5'-фрагмент в качестве матрицы. То есть второй механизм предусматривает удлинение праймера, не гибридного с матрицей. В свете ряда аргументов первый механизм выглядит предпочтительнее. Пока непонятно, зачем нужен синтез РНК при рекомбинации фрагментов одной полярности, когда оба субстрата готовы к рекомбинации с самого начала. Одна из возможностей состоит в том, что для осуществления реакции трансэстерификации Q β -репликаза должна быть в активной конформации, приобретение которой происходит только в процессе синтеза. В этой связи следует отметить, что предполагаемая реакция трансэстерификации, заключающаяся

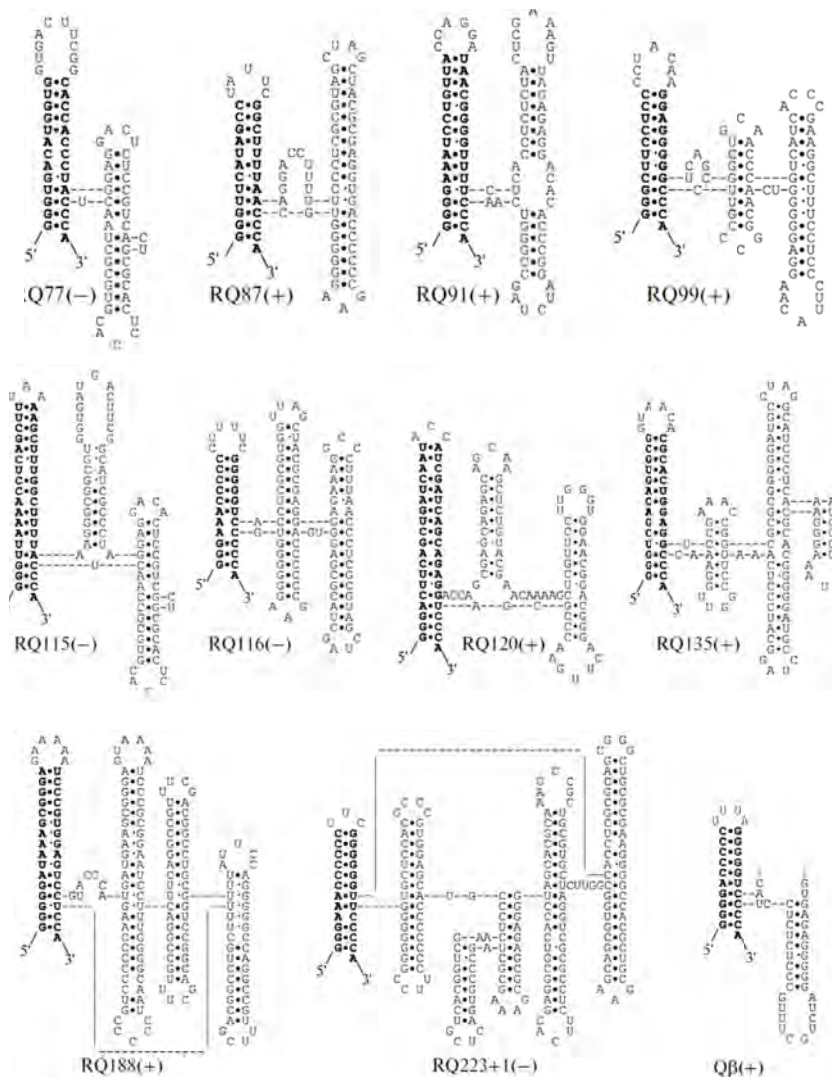


Рис. 48. Модели вторичных структур реплицирующихся РНК: RQ77 [182]; RQ87 [130]; RQ91 [190]; RQ99; RQ115 [172], RQ116 [129]; RQ120 [175]; RQ135 [176], RQ188 [129], RQ223 [163], QB [Martin Billeter, личное сообщение]. С левой стороны каждой структуры показана концевая спираль, образуемая черешком молекулы и прилегающей шпилькой. Для каждой РНК цепь противоположного знака способна образовать симметричную структуру, в которой концевая спираль располагается справа. Пунктирные линии соединяют нуклеотиды, соседствующие в первичной структуре. Для (+)-цепи геномной QB-РНК, длина которой превышает 4000 н., показаны только концевые участки [111]

в атаке межнуклеотидного фосфата одной РНК 3'-концевым гидроксилом другой РНК, химически аналогична атаке α -фосфата присоединяемого нуклеотида 3'-гидроксилом растущей цепи, то есть аналогична реакции, которая является основной функцией всех полимераз. Разработано несколько моделей вторичных структур реплицирующихся РНК (рис. 48).

2.5.6. Применение нанокolonий в химии одиночных молекул

С помощью чистой бесклеточной системы рекомбинации РНК, созданной на основе нанокolonий, исследователям удалось получить следующие основные результаты [112; 140]. Доказано, что рекомбинация происходит на уровне РНК, без участия ДНК-интермедиатов. Рекомбинация РНК значительно богаче в плане молекулярных механизмов, чем представлялось ранее. Она может быть как репликативной, так и нерепликативной. РНК способна к саморекомбинации в физиологических условиях с биологически значимой скоростью, без участия белков и рибозимов.

Разные полимеразы осуществляют рекомбинацию РНК по разным механизмам. Рекомбинация РНК может происходить без смены матриц. Проведённые эксперименты продемонстрировали, что с помощью нанокolonий можно изучать химические реакции между одиночными молекулами РНК. Нанокolonии можно использовать для исследования и иных редких химических реакций или редких реакционных интермедиатов. Для этого необходимо лишь, чтобы продукты или интермедиаты реакции обладали достаточно сложной поверхностью, чтобы образовать минимум две высокоаффинные области связывания.

Существуют другие методы размножения молекулярных колоний нуклеиновых кислот. В лаборатории Ф. Крамера пытались развить следующий метод. В первоначальном варианте в RQ РНК внедряли нуклеотидную последовательность, комплементарную участку детектируемой ДНК или РНК (мишени), и такую искусственную рекомбинантную РНК смешивали с исследуемым образцом. Затем образец обрабатывали магнитными частицами с иммобилизованным на них олигонуклеотидным зондом, комплементарным другому участку мишени. Если образец содержал молекулы мишени, они «вылавливались» магнитными частицами и увлекали за собой рекомбинантную РНК, которая затем

размножалась Q β -репликазой. По кинетике синтеза РНК судили о наличии и количестве мишени в образце: чем больше молекул мишени содержал образец, тем раньше регистрировался синтез.

Однако из-за неспецифической сорбции до 10 000 молекул рекомбинантных РНК вылавливались магнитными частицами даже в отсутствие мишени, что делало метод крайне нечувствительным. В усовершенствованной схеме вместо целой рекомбинантной РНК использовали её взаимодополняющие фрагменты, снабжённые в месте разрыва нуклеотидными последовательностями, комплементарными соседним участкам мишени, и образец дополнительно инкубировали с ДНК-лигазой фага T4 (которая может сшивать фрагменты РНК, гибридизованные «встык»). Таким образом, реплицирующаяся рекомбинантная РНК формировалась непосредственно в образце в зависимости от того, содержал ли образец мишень. По утверждению авторов, в этом случае чувствительность метода составляла ≈ 40 молекул мишени.

Группа А. Б. Четверина (2008, 2010) пыталась использовать колонии РНК для диагностики вирусных инфекций по описанной выше схеме. Выяснилось, что применимость такого подхода весьма ограничена. Во-первых, чужеродные вставки, даже короткие, часто ингибируют репликацию природных матриц репликазы и, следовательно, такой подход не является универсальным. Во-вторых, рекомбинация РНК, особенно в присутствии репликазы, приводит к появлению реплицирующихся молекул и, как результат, многочисленных нанокolonий, независимо от присутствия в образце детектируемой мишени. Таким образом, данный метод культивирования не подходит для многих других РНК, например RQ-мРНК, не способных к экспоненциальному размножению, а спонтанные делеции мРНК-вставок приводят к образованию эффективно размножающихся RQ РНК.

2.5.7. Колонии ДНК

В отличие от Q β -репликазы, ПЦР является более подходящей для диагностики и клонирования, поскольку позволяет размножать любую последовательность с помощью пары олигонуклеотидных праймеров. Однако ПЦР нельзя проводить в агарозном геле, так как она требует периодического нагревания среды до ≈ 100 °C. Группа А. Б. Четверина (1993, 2008, 2010) также разработала спо-

соб осуществления ПЦР в термоустойчивом полиакриламидном геле. Этот способ позволяет получать колонии ДНК. В качестве исходных матриц могут служить как ДНК, так и РНК, которые следует сначала перевести в форму кДНК с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы).

Гель приготавливают в подходящем контейнере, например в лунке, сделанной в предметном стекле для микроскопии. Первоначально гель полимеризовали в присутствии всех компонентов ПЦР, включая ДНК-полимеразу, и этот способ был воспроизведён в лаборатории Дж. Чёрча в Гарвардском университете (США). Однако оказалось, что лучшие результаты даёт другой подход: сначала гель полимеризуют, затем вымачивают в воде для удаления всех растворимых веществ, автоклавируют и сушат, а непосредственно перед экспериментом пропитывают полной реакционной смесью, включающей dNTP, олигонуклеотидные праймеры, термостабильную ДНК-зависимую ДНК-полимеразу и исследуемый образец. В этом случае полностью сохраняется активность ДНК-полимеразы и уничтожаются молекулы ДНК, которые могли попасть в гель в процессе его приготовления. При впитывании реакционной среды гель полностью восстанавливает исходный объём и механические свойства. Объём геля, приготовленного в лунке диаметром 14 мм и глубиной 0,4 мм, составляет 65 мкл (то есть расход реактивов почти такой же, как в стандартной ПЦР объёмом 50 мкл). Для осуществления ПЦР гель герметизируют и помещают в ДНК-амплификатор с плоским нагревательным элементом (такой ДНК-амплификатор обычно используют для ПЦР *in situ*). Далее проводят реакцию примерно в таком же температурном режиме, как при стандартной ПЦР в пробирках, лишь увеличивая продолжительность стадии отжига на 10–20 с [112].

2.5.8. Методы обнаружения нанокolonий

Выросшие в геле нанокolonии невидимы невооружённым глазом, но их можно обнаружить разными способами [109; 112]. Например, по окончании амплификации гель можно окрасить интеркалирующими красителями, такими как бромистый этидий или SYBR Green I [140]. Однако при этом окрашиваются как специфические нанокolonии (продукты размножения анализируемой мишени), так и неспецифические, образованные «димерами» праймеров

(продуктами удлинения праймеров в результате гибридизации между собой) или продуктами размножения посторонней ДНК — процесса, происходящего по причине ошибочной гибридизации праймеров с чужими матрицами.

Специфические нанокolonии можно выявить путём гибридизации с зондом, комплементарным внутреннему участку размноженной мишени, на мембранном фильтре после переноса путём промокания (блотинга) геля. В первых экспериментах для выявления нанокolonий авторы использовали радиоактивно меченные зонды. Недостатками таких зондов являются необходимость использования вредных для здоровья радиоактивных веществ (^{32}P , ^{33}P или ^{35}S), которые к тому же имеют короткий период полураспада, и длительность процедуры получения радиоавтографа, часто более суток.

В другом известном способе, использующем мишень-специфические зонды, нанокolonии гибридизуют *in situ* (в геле, где они были выращены) с флуоресцентными зондами или с немечеными олигонуклеотидными зондами, которые затем метят путём концевой включения флуоресцентных нуклеотидов. Благодаря применению флуоресцентных меток отпадает необходимость использования радиоактивных материалов и время получения изображения сокращается до нескольких минут. Однако осуществление гибридизации в геле существенно усложняет и удорожает процедуру, так как размноженные нуклеиновые кислоты необходимо ковалентно иммобилизовать на матриксе геля (для чего иммобилизуют один из используемых для размножения олигонуклеотидных праймеров). Более того, необходимо удалять из геля одну из комплементарных цепей размноженной мишени, для чего используют расшиваемый гель, после размножения осуществляют частичную расшивку с целью облегчения диффузии нуклеиновых кислот, а для ускорения удаления неиммобилизованных цепей используют электрофорез. Кроме того, при гибридизации в геле мишени оказываются менее доступными зондам и удаление несвязанных зондов из геля происходит медленнее, чем при гибридизации на мембране.

Обнаружение нанокolonий путём гибридизации с флуоресцентными зондами на мембране осуществляется следующим образом. Гибридизация с флуоресцентными зондами на нейлоновых мембранах могла бы стать решением проблемы, однако из литературных данных следовало, что это вряд ли возможно из-

за слишком низкого содержания нуклеиновых кислот в колонии и слишком высокого уровня фоновой флуоресценции мембран. По оценкам разных лабораторий, в одной колонии диаметром 0,2–0,5 мм, образующейся при осуществлении ПЦР в геле, содержится около 10^8 молекул ДНК. При блоттинге на мембрану переносится около 10 %, то есть 10^7 молекул или ≈ 10 аттомоль ДНК.

Группе А. Б. Четверина (2007, 2008) удалось разработать гибридизацию нанокolonий на мембране с флуоресцентными зондами, общая продолжительность которой (от фиксации колоний до получения результата сканирования) занимает менее 1 ч. Гибридизация нанокolonий с флуоресцентными зондами на мембране позволяет быстро обнаруживать одиночные молекулы и определять титр ДНК- и РНК-мишеней. Судя по тому, что число колоний совпадает в пределах статистического разброса с числом молекул ДНК, введенных в гель до начала ПЦР, можно заключить, что выявляются все колонии ДНК. Более того, мембрану можно гибридизовать со смесью флуоресцентных зондов и получать информацию отдельно о гибридизации каждого из зондов при условии, что спектральные характеристики меток различаются достаточно, чтобы обеспечить избирательную регистрацию флуоресценции каждого из них, как это наблюдается для флуорофоров Су3 и Су5.

Смесь зондов, меченных этими флуорофорами, использовали для обнаружения разных частей химерной молекулы кДНК AML1-ETO, состоящей из частей генов AML1 и ETO (химерная мРНК AML1-ETO является маркером часто встречающегося лейкоза: Су5-меченный зонд специфичен к AML-части, а Су3-меченный зонд специфичен к ETO-части последовательности AML1-ETO (рис. 49, А, В)).

Гибридизация обоих зондов с одной и той же нанокolonией свидетельствует о том, что данная наноколония образована химерными молекулами. Это даёт возможность повысить специфичность диагностики путём отсеечения нанокolonий, образованных нехимерными молекулами, содержащимися в нормальных лейкоцитах.

Гибридизацию одновременно с несколькими флуоресцентными зондами, различающимися как нуклеотидными последовательностями, так и флуорофорами, можно использовать и в других целях, например для отдельного определения сразу нескольких мишеней либо для определения вариантов последовательности одной мишени, в частности, для определения так называемого однонуклеотидного полиморфизма (SNP).

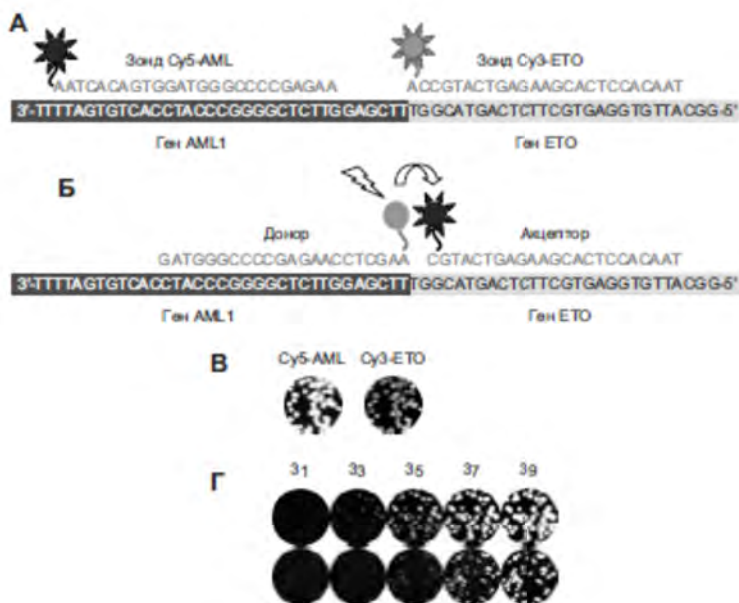


Рис. 49. Детекция нанокolonий с помощью флуоресцентных зондов

Растущие нанокolonии можно наблюдать в реальном времени [109; 112], применяя различные гомогенные системы детекции (то есть позволяющие обнаружить ДНК без удаления несвязанного флуорофора), использующие интеркалирующие красители, гибридизационные зонды или различные комбинации таковых.

Для наблюдения растущих колоний ДНК ПЦР исследования проводили следующим образом: в полиакриламидном геле, приготовленном в лунках предметного стекла и закрытом покровным стеклом [112]. Чтобы обеспечить регистрацию флуоресценции геля, покровное стекло заклеивали липкой фольгой с отверстием, вырезанным по размеру лунки.

Использование гомогенных систем позволяет обнаруживать нанокolonии без открывания геля и переноса колоний на мембрану и не требует осуществления специальной стадии гибридизации по завершении ПЦР.

Оказалось, что любой из ныне известных принципов гомогенной флуоресцентной детекции может быть использован для обнаружения нанокolonий. Наивысшая чувствительность детекции получена при использовании пары рядом гибридизующихся

зондов, на сближенных концах которых находятся флуорофоры флуоресцеин (FAM) и цианин-5 (Cy5), между которыми возможен FRET — флуоресцентный резонансный перенос энергии (рис. 49, Б, Г). Увеличение длины размножаемого фрагмента приводит к более позднему появлению колоний, но они становятся мельче, что позволяет увеличить разрешение метода (рис. 49, Г).

Нанокolonии также можно выявить, используя «молекулярный бакен» (олигонуклеотидный зонд, имеющий структуру шпильки и несущий на тесно сближенных концах флуорофор и группу, которая гасит флуоресценцию флуорофора, когда зонд свободен, но перестаёт гасить, когда зонд вытягивается в результате гибридизации с мишенью) или комбинацию интеркалирующего флуоресцентного красителя и специфического зонда, несущего флуоресцентную группу, максимум возбуждения которой совпадает с максимумом излучения красителя. Хотя детектируемые нанокolonии образуются и при обычной (симметричной) ПЦР, чувствительность детекции можно увеличить, используя режим асимметричной ПЦР, для осуществления которой концентрации праймеров подбирают так, чтобы синтезировалось больше тех цепей, которые комплементарны флуоресцентным зондам. При асимметричной ПЦР колонии флуоресцируют значительно ярче благодаря тому, что часть ДНК нанокolonий остаётся в однострунчатой форме и, следовательно, является более доступной для гибридизации с зондами.

В приведённых примерах флуоресцентные изображения получены при фиксированной (комнатной) температуре по завершении стадии элонгации. Очевидно, что изображения можно регистрировать при разных температурах и на разных стадиях ПЦР-цикла. Поскольку температура гибридизации падает на 4–8 °С при наличии даже одиночного нарушения комплементарности мишени и зонда, анализ кривой гибридизации позволяет обнаруживать точечные мутации мишени, если они произошли в участке, с которым гибридизуется зонд. Сдвиги в значениях температуры, при которой изображение колоний появляется или исчезает, могут быть использованы как инструмент SNP-анализа.

Для детекции нанокolonий, вероятно, можно адаптировать методы, использующие деградацию зонда для удаления флуорофора от его гасителя (принцип, применённый в зонде «TaqMan»), если флуоресцентную группу зонда иммобилизовать на матриксе геля, чтобы предотвратить её диффузию в геле. В такой ситуации

матрикс геля будет флуоресцировать после гидролиза зонда в месте, где была колония, даже после того, как продукты размножения диффундировали или оказались вымыты из геля; поэтому такой гель можно хранить и использовать как документальное свидетельство анализа. Также может быть реализована детекция нанокolonий нуклеиновых кислот по меченым нуклеотидам (рис. 50).

2.5.9. Перспективы развития метода молекулярных колоний

Перспективы метода молекулярных колоний авторы [112] видят в изучении экспрессии генов в единичных клетках, количественном *in situ* анализе, селекции генов по функциям кодируемых РНК и белков, изучении функциональных взаимодействий белков, детекции молекул ненуклеиновой природы.

Продолжением расширения данного метода для изучения самоорганизации РНК является необходимость добавления методов сканирующей электронной микроскопии для изучения поверхностной структуры.

Второй необходимой задачей является изучение структуры комплекта (упаковки) всей молекулярной колонии нуклеиновых кислот с учётом уже известных переходов межмолекулярной структуры. Это позволит понять особенности организации нуклеиновых кислот в трёхмерном пространстве в особых специфичных условиях среды.

Третьей задачей является изучение особенностей свободной и зависимой миграции отдельных нуклеотидов внутри самой колонии и в окружающей среде, и включение в данную экспериментальную систему не только нуклеотидтрифосфатов, но и ди- и нуклеотидмонофосфатов.

Четвёртой задачей является изучение молекулярного состава среды, изменяемой колониями нуклеиновых кислот, в частности, особенностей и возможностей захвата колониями сахаров, аминокислот, жирных кислот, углеводов и отдельных элементов из окружающей среды, а также изучение продукции метаболитов молекулярными нанокolonиями.

Пятой задачей является изучение развития молекулярных колоний на вертикальных поверхностях и сложных субстратах,

Sequencing of DNA colonies by step-by-step additions of fluorescent nucleotides

AGGCTTCATGCCGAAATTGCACTTGCCGG
 ●AGCTGAACGGCC

Nucleotides are color-coded

A C G T
 ● ● ● ●

DNA sequence, simultaneously in each colony, is determined by registering the colony color at each step

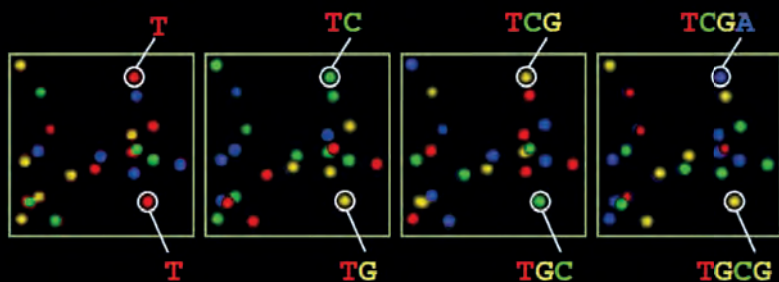


Рис. 50. Детекция нанокolonий нуклеиновых кислот по меченым нуклеотидам

и перенос колоний в другие среды. Это выращивание колоний на градиенте различных углов по отношению к поверхности Земли; выращивание колоний на вытянутых субстратах и внутри ограниченных в пространстве ячеек в нанометровом размерном диапазоне, то есть ограничение пространства для молекулярных колоний; выращивание молекулярных колоний в различных градиентах газовой, механической и электромагнитных сред, с различными режимами перемешивания и гидродинамики; выращивание молекулярных колоний с добавлением в среду аминокислот и пептидов для исследования их взаимодействия с протеомным протомиром.

Смесь функциональных, в том числе искусственно полученных рибозимов и рибосом может быть использована для получения смесей, конгломератов и функционально связанных полимеров генома и протеома, то есть функциональных полимеров нуклеиновых кислот и пептидов с элементарными белками. Эти реакции необходимо проводить в дискретных полупроточных средах.

Способы получения различных РНК с использованием искусственных рибозимов должны базироваться на том, чтобы в этих средах создавались реакции с избытком нуклеотидов. Необходимо создавать условия, чтобы разные виды РНК функционировали в разных средах для создания у РНК разной специализации. Для этого также необходима работа с циклическими РНК и ДНК: РНК-термометры, рибопереключателы и другие кольцевые РНК, плазмиды.

Для реализации получения разных РНК и изучения пределов их функционала необходимо выращивание молекулярных колоний с другими биологическими, биоорганическими и не биологическими полимерами, а также минеральными кристаллическими компонентами. Данные доработки позволят эффективно применять метод молекулярных колоний нуклеиновых кислот к получению элементов живых систем. В первую очередь созданию различных сред для автономного развития разных типов РНК.

2.5.10. Химический синтез олигонуклеотидов из естественных нуклеиновых кислот

В настоящее время наиболее распространён фосфорамидитный синтез олигонуклеотидов [118]. Исходными соединениями являются модифицированные дезоксирибонуклеотиды, у которых 3'-фосфатная группа несёт диизопропиламиногруппу, которая в свою очередь защищена метильным остатком, 5'-гидроксильная группа остатка дезоксирибозы и аминогруппы пуриновых и пиримидиновых оснований также блокированы. Такая защита нуклеозидов предотвращает нежелательные реакции в ходе синтеза олигонуклеотидов.

Первый нуклеозидный компонент, в котором 5'-гидроксильная группа защищена диметокситритильной группой, фиксируют на инертном твёрдом носителе. При снятии защиты с 5'-гидрокса к нему присоединяется следующий нуклеозид в виде фосфорамидита, активированного тетразолом. Образовавшаяся триэфирная связь нестабильна, поэтому эфир окисляют в присутствии йода до пятивалентного фосфотриэфира. Такой цикл синтеза ДНК, который в отличие от природного процесса происходит в направлении 3' — 5', повторяется, пока не будет получен олигонуклеотид с искомой последовательностью. Затем все защитные группы удаляют, а одонитевый олигонуклеотид очищают методом гель-электрофореза.

Для синтеза более длинных олигонуклеотидов или целых генов используется метод полимеразно-цепной реакции (ПЦР). Амплификацию мРНК методом ПЦР проводят в том случае, если известна последовательность хотя бы одного его конца. Сначала синтезируют праймер, комплементарный известному концу РНК, а затем проводят гибридизацию с выделенной клеточной мРНК. В образовавшемся дуплексе праймер служит в качестве затравки для достраивания кДНК ферментом обратной транскриптазой. Полученную кДНК далее можно амплифицировать методом ПЦР.

2.5.11. Искусственно полученные фрагменты ДНК и РНК и гены

Использование аптамеров РНК. Искусственно полученные гены [46]. В биотехнологиях используется несколько способов получения генов.

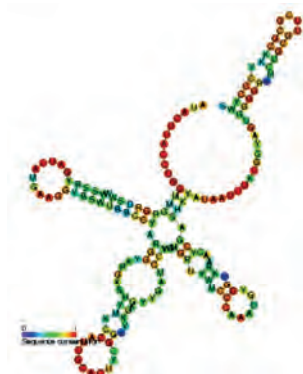
1. Выделение из природных источников — клонирование.
2. Химический синтез.
3. Копирование соответствующей гену мРНК для получения комплементарной ДНК-репликазы (кДНК).

Искусственный синтез гена берёт начало с 1969 г. [46]. Молекулярное клонирование осуществляется, когда после эндонуклеазной рестрикции и объединения фрагментов ДНК векторная молекула направляется в реципиентский организм, в котором происходит накопление рекомбинантных ДНК. Для доставки в клетку используются плазмидные векторы, фаговые векторы, космидные векторы, челночные векторы, искусственные хромосомы дрожжей. Плазмидные векторы используются при клонировании в бактериальной клетке и должны содержать участок инициации репликации для размножения плазмиды в клетке, доминантный селективный маркер и уникальный сайт рестрикции. Фаговые векторы характеризуются правым и левым плечами с генами, необходимыми для литического цикла. Космидные векторы получены искусственным путём при комбинации плазмид и фагов. Челночные векторы более универсальны и позволяют реплицироваться в двух и более организмах-хозяевах.

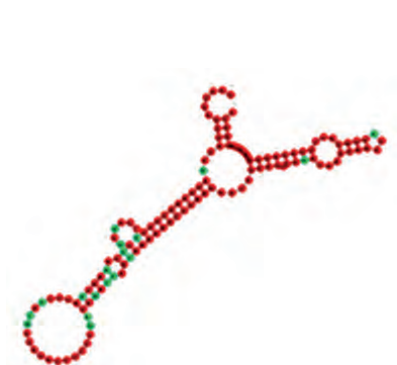
Перспективным вектором и функциональной единицей для изучения функционала жизни являются вирионы (рис. 51). Данные структуры могут культивироваться во вне-клеточной среде, что даёт возможность расширения исследовательского функционала в части РНК полимеров. Рибопереключател и РНК-термометры и другие кольцевые РНК также являются удобными агентами для различных систем моделирования, так как характеризуются кольцевой РНК и способны транслироваться *in vivo* и *in vitro* [72].

2.6. Получение порфиринов

На сегодняшний день разработано несколько путей биотического и абиотического синтеза порфиринов: путём горения, путём бомбардировки ультрафиолетом и заряженными частицами, путём растягивания в магнитном поле с получением гемов, путём синтеза из пирролов, путём синтеза из полициклических ароматических углеводов [20; 52; 41; 79; 180].



Примеры кольцевых РНК



РНК-термометр



Рибопереключател



Вироид

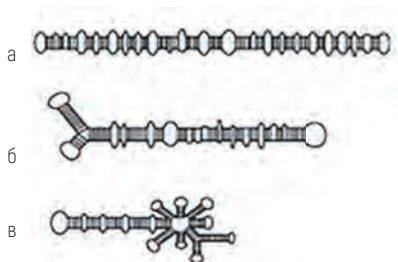


Схема вторичной структуры виридов:
а – палочковидная, б – квазипалочковидная,
в – разветвлённая

Рис. 51. Кольцевые РНК: РНК-термометры, рибопереключателы, вириды

Промежуточными звеньями являются коррины и корролы, с которыми впоследствии можно работать в различных биотехнологических направлениях. В биологических реакциях метаболизма исходными веществами являются билирубин, убихинон, а также кислоты: слизевая, алантоиновая, клиоксидовая и мочева.

Также известен синтез исходных порфириновых веществ из аминокислот (рис. 52), в частности, из глутаминовой кислоты и глицина (рис. 52). При синтезе из глицина промежуточными продуктами являются 5-аминолевулиновая кислота и порфибилиноген с последующим синтезом уропорфириногена. Распад порфиринов сопровождается образованием биливердина и билирубина [52].

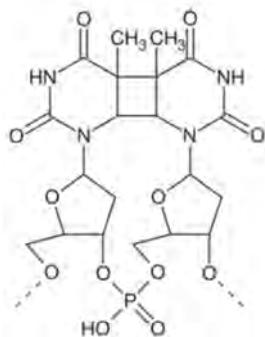
На сегодняшний день разработано несколько путей искусственного небиотического синтеза порфиринов [20]. Исходными производными являются пироллы, пиридины и различные полифенолы (рис. 53). Реакции осуществляются при температурах 140–250 °С.

Сегодня из порфиринов получают различные полимеры и комплексы для биотехнологических решений (рис. 54). Этой возможности способствуют различные формы копропорфириногена и протопорфирина. В частности, получены димеры из порфиринов с различными типами укладки (рис. 54), а также полимеры из порфиринов.

За счёт молекулярных переключений и создания различных типов координации появляется возможность создания полимеров с включениями различных молекул, в частности, даже фуллеренов, изображённых на рис. 54.

Помимо этого открывается возможность создания различных трёхмерных каркасов кристаллического типа с различными ячейками для адсорбции других биологических полимеров. При этом кристаллический каркас может являться трёхмерным по форме самого фуллерена и функционально выполнять динамику передвижения в виде дендримера с адсорбированными на его поверхности молекулами.

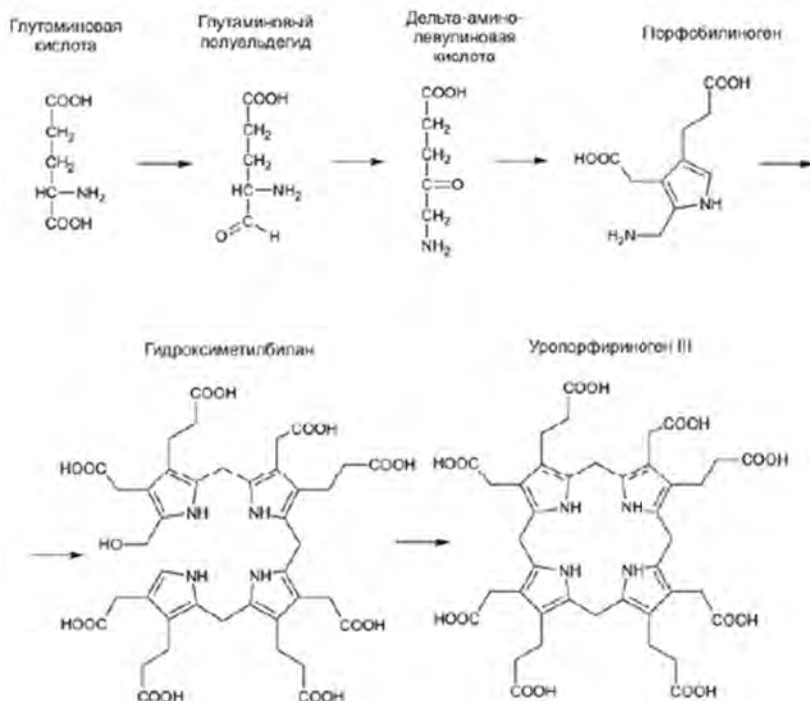
Но ещё более перспективным и функционально значимым является создание двумерных ячеек из порфириновых комплексов на поверхностной плёнке воды за счёт гидрофобности данных молекул и фитольных групп у гемов. Это позволит создать ячейки по типу бенара с различными по размеру полостями для агрегации между ними различных полимеров и агрегатов на их основе, в том числе мицеллярного типа. Таким образом, порфириновые полимеры, из которых можно создавать подложки и другие функци-



Тиминовый димер в составе ДНК



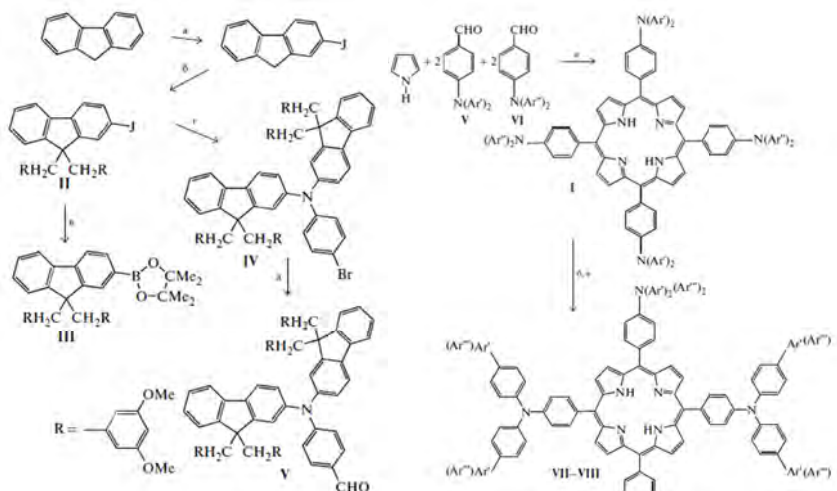
G-квадруплекс на основе гуанина



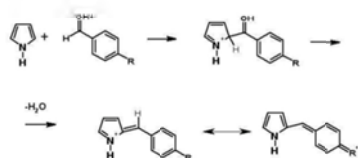
Биосинтез порфиринов из глутаминовой кислоты

Рис. 52. Пути синтеза порфиринов и гемов

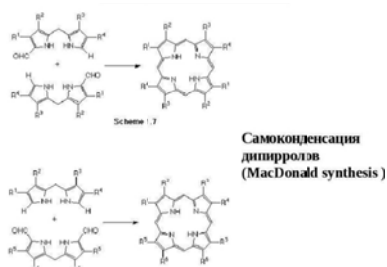
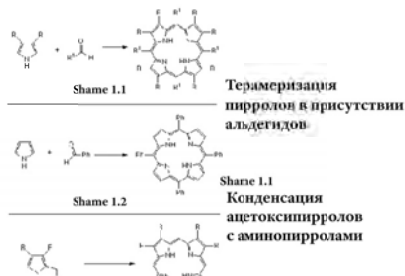
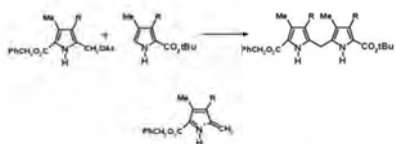
ональные комплексы в виде сферических дендримеров, являются перспективными объектами для исследования адсорбции на них олигонуклеиновых кислот и изучения их взаимодействия [200].



Механизм реакции получения порфиринов

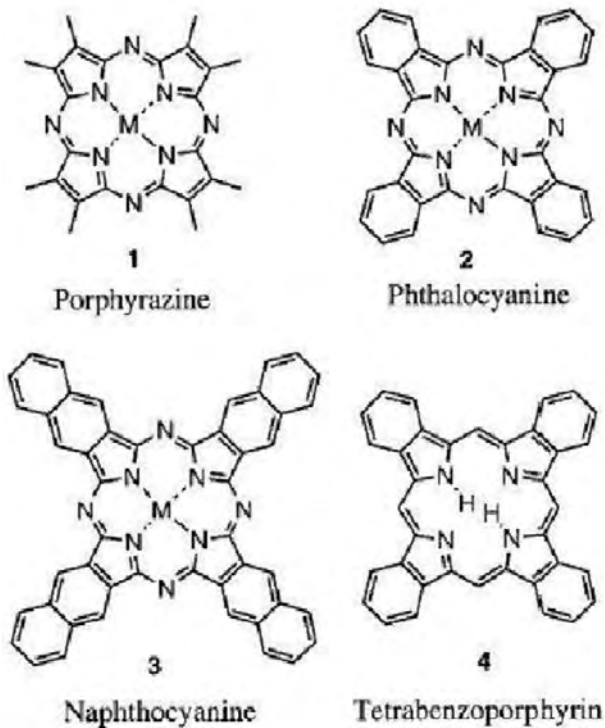


Методы получения дипирролов



Пути получения порфиринов

Рис. 53 (начало). Пути получения порфиринов небиотическими реакциями и различные типы порфириновых гемов



Различные типы порфириновых гемов

Рис. 53 (окончание)

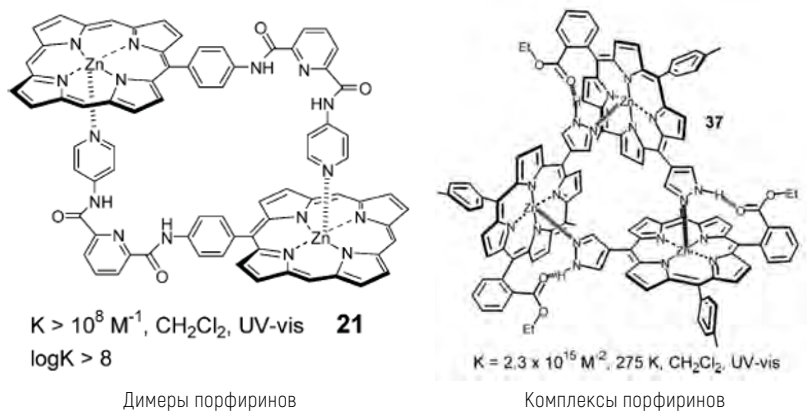
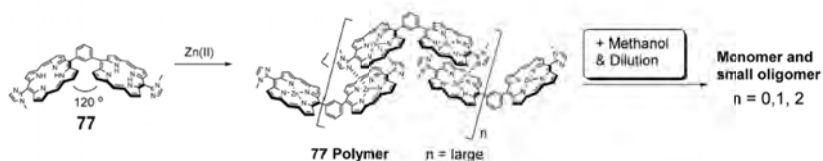
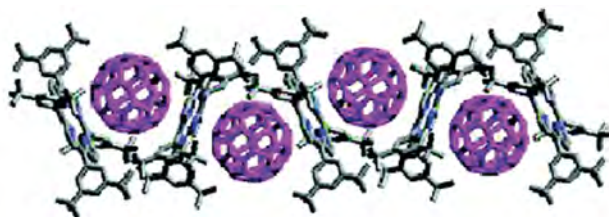


Рис. 54 (начало). Искусственно полученные композиции из порфиринов и комплексов с фуллеренами



Полимеры из порфиринов



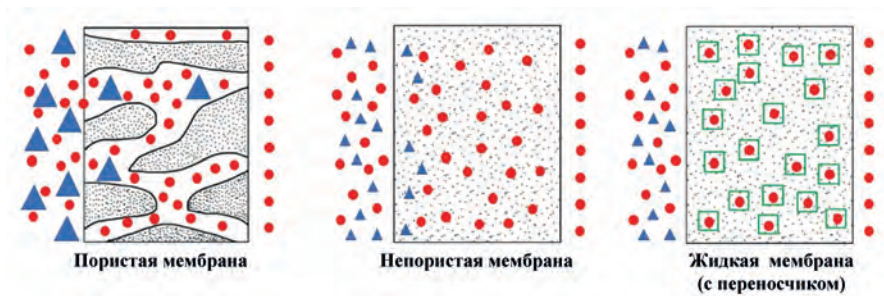
Полимеры порфиринов с фуллеренами

Рис. 54 (окончание)

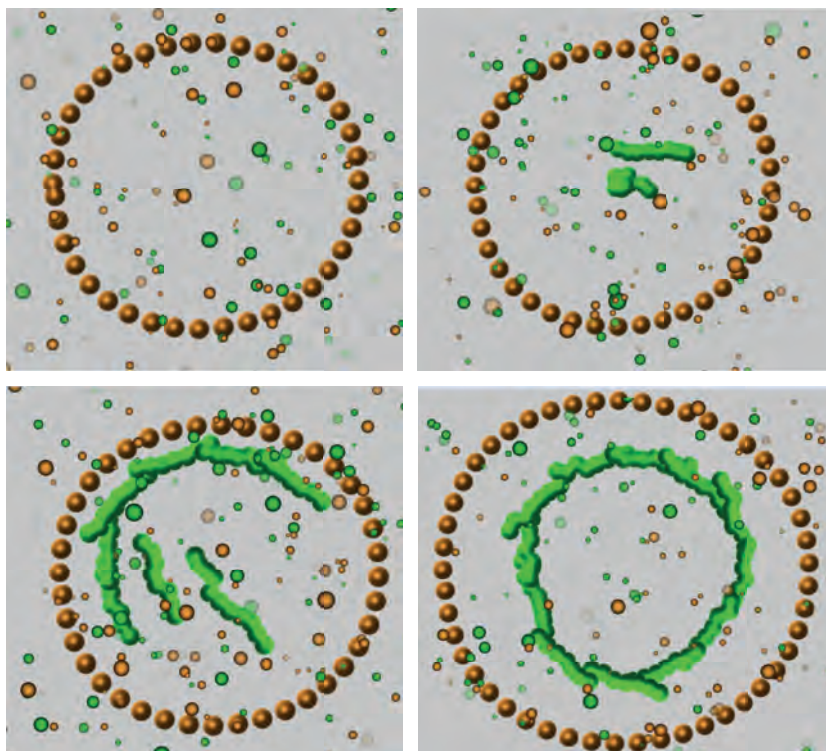
2.7. Клеточные оболочки как среда для протобионтов

Использование мембран и билипидных слоёв в виде мицелл, липосом и везикул рассмотрено в разделе про использование жирных кислот и липидов в качестве сред для нуклеиновых кислот. Вместе с тем следует указать на две тенденции в получении протобионтов. Первый — это бесклеточный путь преимущественно с использованием рибозимов и других нуклеиновых кислот. Второй — это использование искусственных мембран и клеточных оболочек. Но также начиная с работ Дж. Шостака [153] предпринимались попытки сконструировать совместное создание протоклеточных оболочек и внутренних нуклеотидных компартментов [159; 165; 212], а также рассмотреть влияние природных факторов на данный механизм [119; 148].

В нашей стране подобными исследованиями в большей степени на теоретическом уровне занимался В. А. Твердислов (2012). Исследовательская группа Дж. Шостака сначала получила искусственные полупроницаемые мембраны (рис. 55). Затем с помощью хелатных молекул пыталась внести через оболочку внутрь мембран соответствующие компартменты, в том числе нуклеиновые кислоты. Эти исследования стали основой для



Различные виды мембран по проницаемости



Полупроницаемые мембраны Шостака и механизм формирования внутренних компартментов

Рис. 55. Полупроницаемые мембраны Дж. Шостака

дальнейших, более расширенных методов получения не только искусственных мембран, но и искусственных клеточных оболочек.

Если обратиться к биотехнологиям работы с живыми клетками, то, как правило, методы основаны на том же принципе, только генетические и белковые продукты вносятся внутрь функционирующих естественных клеток организмов или клеточных культур. Современные биотехнологические пути позволяют вносить внутрь эукариотических клеток различные органеллы, как например, было реализовано в экспериментах по тройному оплодотворению, проведённому исследовательской группой Ш. Миталипова (рис. 56) [193]. Этот метод по сути позволяет отделять мембрану

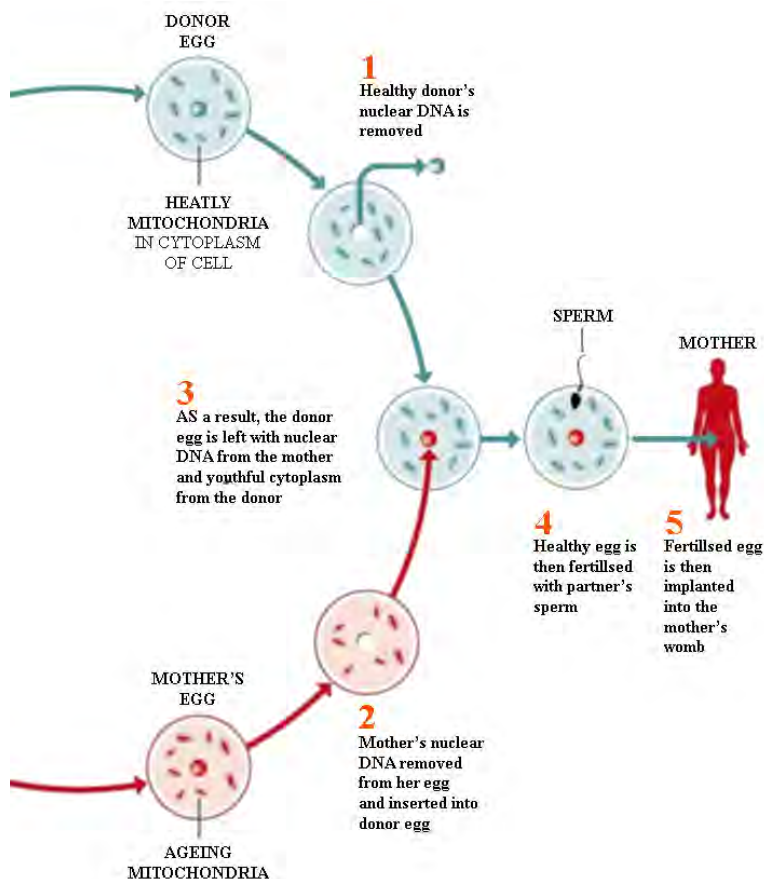


Рис. 56. Схема тройного оплодотворения с трансплантацией клеточных органелл по Ш. Миталипову

клетки от органелл и реализовывать внутри клетки различные физиологические и метаболические функции.

Нет сомнений, что принцип данного метода войдёт в практику биотехнологических решений с использованием клеточных оболочек с различными долями цитоплазмы и органелл в реализацию биотехнологических решений, в том числе по получению протобионтов. Такой пример реализован на практике с одной из наиболее простых клеток — микоплазмой. В экспериментах К. Вентера по получению искусственного генома последний был помещён в клетку микоплазмы (*Mycoplasma mycoides*) при удалении нативного генома [161]. Искусственный геном был схож с прототипом, и микоплазма продолжала функционировать с инвазивным геномом ещё какое-то время.

Для создания искусственных геномов используются искусственные хромосомы дрожжей [46]. В недавних экспериментах была синтезирована уже искусственная клетка, содержащая ряд органелл и способная синтезировать собственные липиды, из которых формируется мембрана (рис. 57). При этом ферменты были закреплены в самом билипидном слое [132].

Таким образом, на сегодняшний день налаживается производство более сложных клеточных оболочек, способных синтезировать материал для этих оболочек. Кроме того, проводится всё больше исследований с созданием искусственных клеток с различными внутренними компартментами: генетическим аппаратом и искусственными сегментами протеома. Так, в недавних исследованиях были сконструированы мицеллы, нанотрубки, бислои и везикулы для доставки внутрь клеток других молекул [179]. Причём мицеллы, нанотрубки и везикулы были синтезированы из молекул, близких по структуре к нуклеотидам и аминокислотам (рис. 58). Данные искусственные структуры адсорбировались на поверхности клеток и вносили внутрь клеток соответствующий молекулярный материал. Кроме того, формировали различные агрегаты и структуры, позволяющие расширить потенциал взаимодействия с живыми клетками.

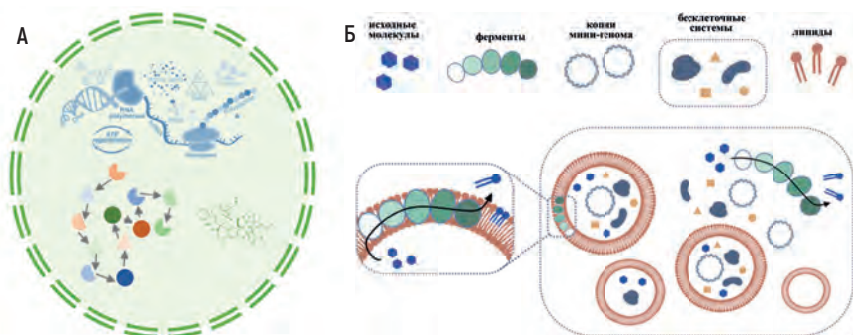


Рис. 57. Искусственная клетка – синтетическая биополимерная капсула, синтезирующая липиды [132]: А – общая схема, Б – схема эксперимента

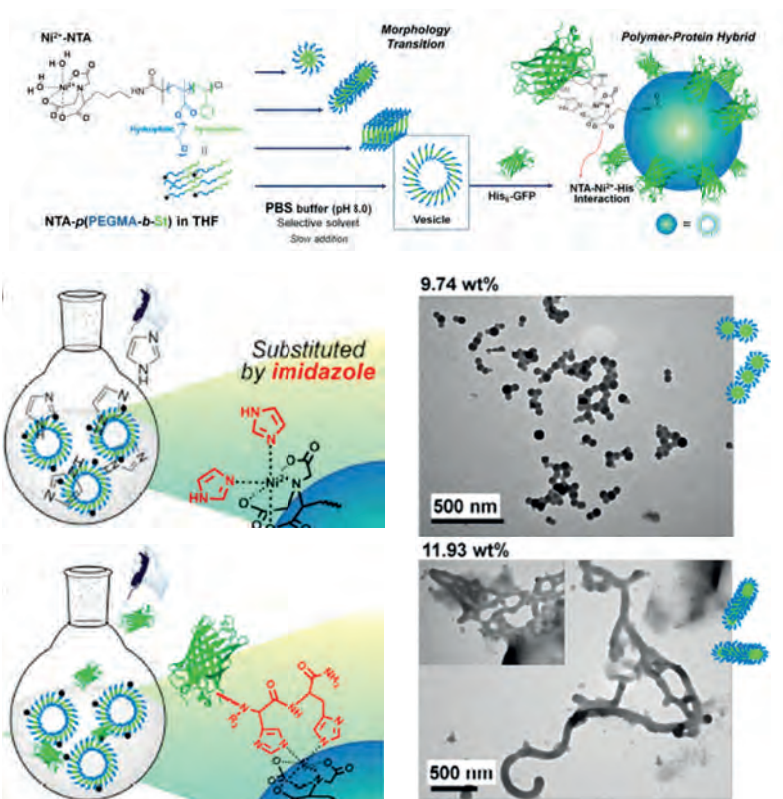


Рис. 58. Доставка везикул, нанотрубок и липосом на поверхность и внутрь клеток [179]

2.8. Автоколебательные и проточные среды

Автоколебательные реакции, режимы и среды являются ключевой основой для методов получения живых систем. Одним из необходимых этапов моделирования и получения биоорганических молекул и протобионтов заключается в создании автоколебательной среды. И здесь следует рассмотреть разделение на автономные автоколебательные среды на основе известных реакций типа Белоусова — Жаботинского и Бриггса — Раушера и искусственные автоколебательные среды, поддерживаемые с доставкой необходимых компонентов для продолжительной автоколебательной реакции или поддержания необходимого автоколебательного режима с заданной периодичностью. Это могут быть полупроточные и проточные среды. То есть среды с несколькими режимами обмена, разделённые в пространстве (рис. 59). В этом случае среда для протобионтного пула органических веществ будет неравновесной.

Данные автоколебательные режимы могут быть реализованы в специальных приборах, рассмотренных далее. Следующим этапом является связывание автоколебательных реакций с известными реакциями метаболизма живых организмов для дальнейшей реализации гиперцикла.

Встраивание реакций метаболизма, таких как цикл Вуда — Льюнгаля, цикл Вуда — Веркмана, пентофосфатный цикл, цикл Калвина и цикл Кребса, может быть также постепенным и ступенчатым. То есть необходим сначала отдельный запуск автоколебательных реакций и метаболических реакций в пробирке и дальнейшая интеграция этих двух типов реакций.

Когда данные этапы будут интегрированы или метаболические реакции в специальной среде будут поставлены в режим автоколебаний и циклических превращений, необходимо будет интегрировать в данный гиперцикл биологические полимеры. Обратный вариант подразумевает изначальное создание гиперцикла реакций с заданными полимерами.

Исходные полимеры должны обладать двумя функциями. Первая — это способность полимеризоваться в заданных условиях среды и распадаться на мономеры. Вторая — это способность полимеров образовывать различные типы собственной трёхмерной укладки с возможностью захватывать посторонние, средовые молекулы.

Наиболее целесообразным и системным является разделение полупроточных сред на среды с полимерами, среды с органиче-

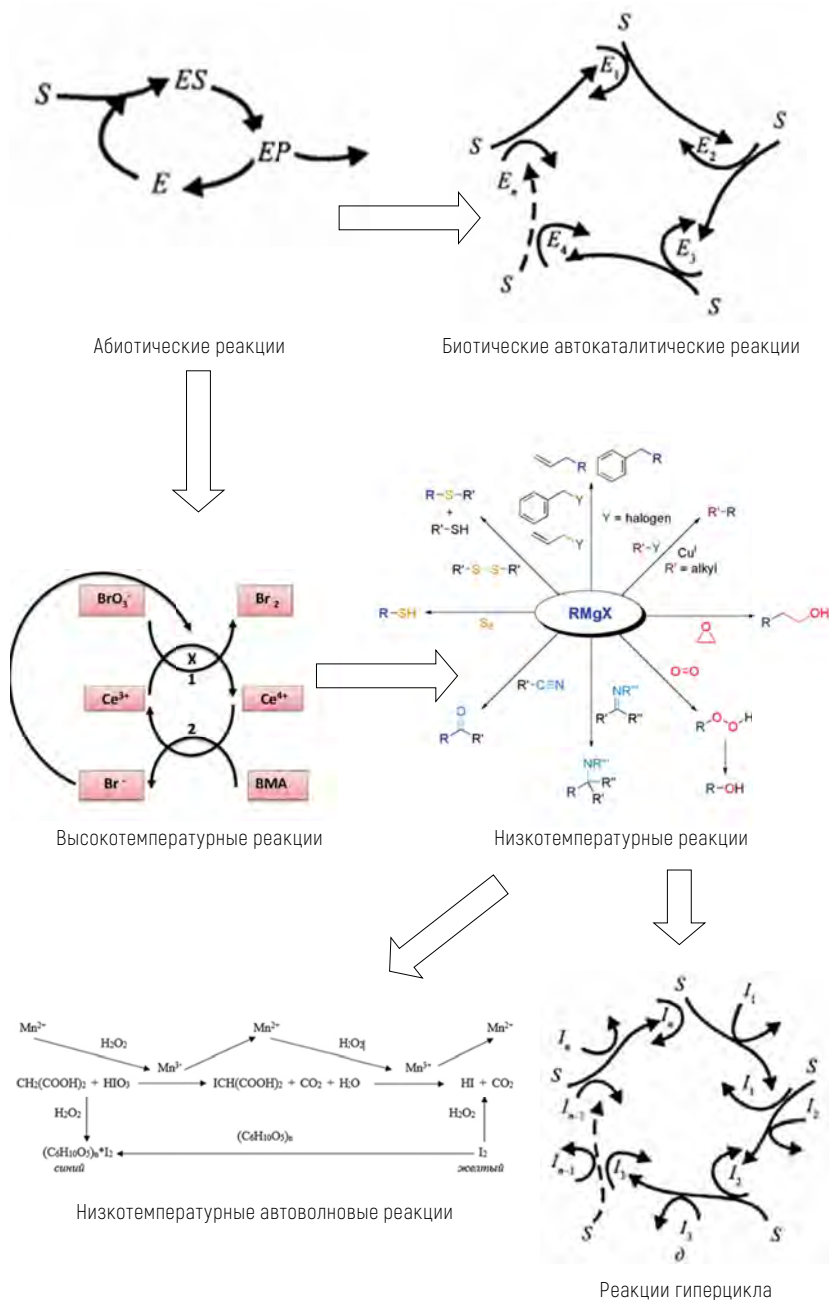
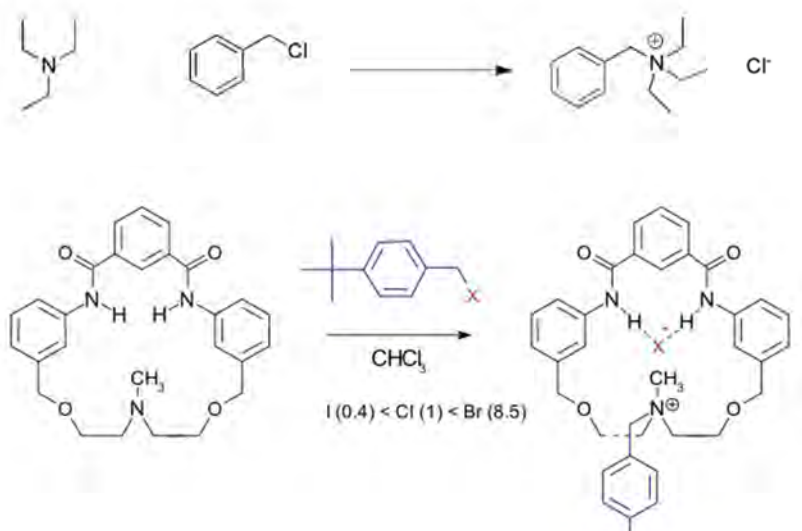


Рис. 59. Схема экспериментальных циклов с автоволновыми реакциями

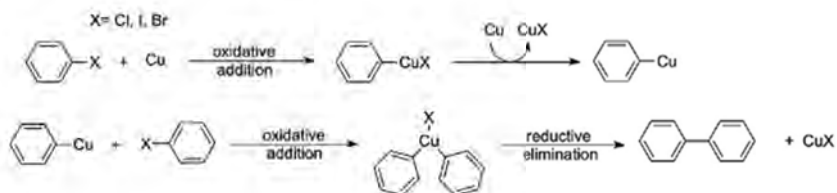
скими веществами при реакциях подобных метаболизму и среды с неорганическими компонентами, в которых реализуется часть автоволнового цикла.

Все известные автоволновые реакции построены на субстрате из органических или даже чаще биоорганических молекул, служащих восстановителями (рис. 60). Так, в реакции Гебера — Меншуткина участвуют аминокислоты и их производные с циклическими реакциями с образованием дилатов, циклогексанов. Реакция Ульмана происходит между аминами и альдегидами или кетонами с образованием цис- и транс-стереоизомеров с возможным циклобутанийским механизмом с восстановлением исходных веществ. В реакции Гриньяра с органическими соединениями также образуются циклические продукты. В реакции Вольфа — Кишнера образуются циклические соединения в виде алилов и акрилов, также происходит восстановление карбонильной группы в алкилгидрозины и последующее превращение в алканы. В реакции Вальдмана реализуется синтез иминов из кетонов и аминов в одной среде. Большинство данных реакций протекает в температурном диапазоне 100–200 °С, кроме реакции Вольфа — Кишнера, протекающей в диапазоне 200–250 °С. Полезным фактом

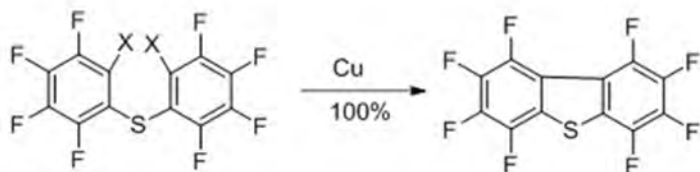


Реакция Гебера – Меншуткина

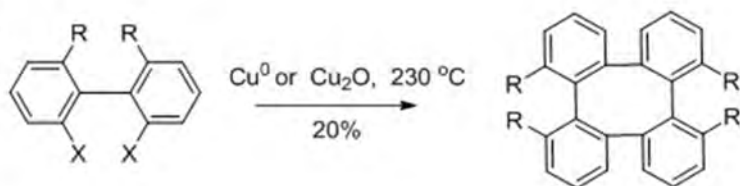
Рис. 60 (начало). Автоволновые реакции и их аналоги с органическими компонентами



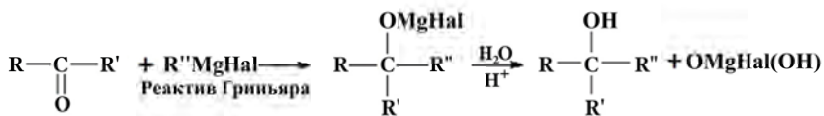
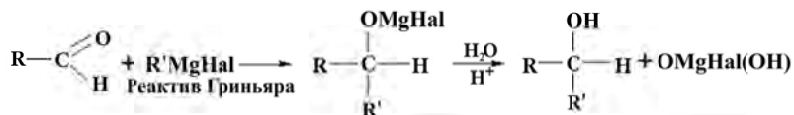
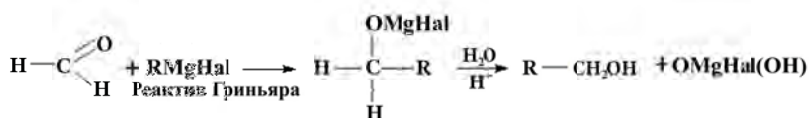
A



B

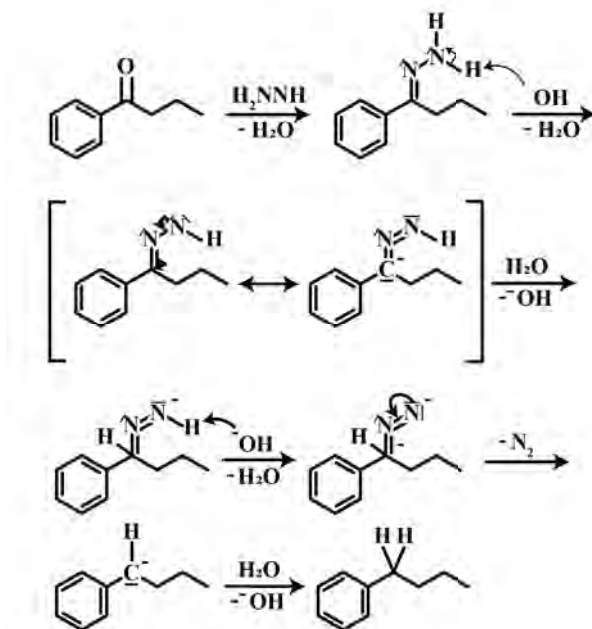


Реакция Ульмана

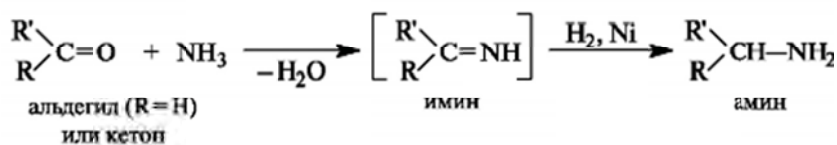


Реакция Гриньяра

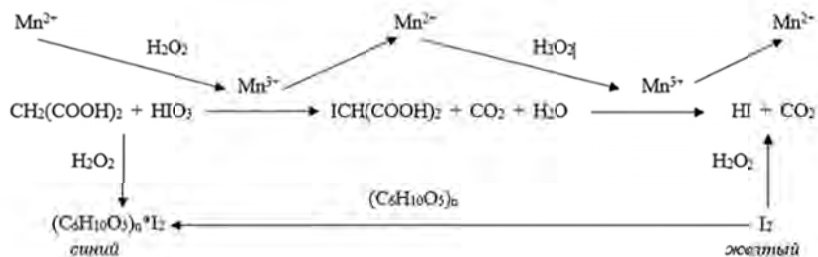
Рис. 60 (продолжение)



Реакция Вольфа – Кишнера



Реакция Вальдмана



Реакция Бриггса – Раушера

Рис. 60 (окончание)

является то, что автоволновая реакция Бриггса — Раушера протекает при комнатной температуре (3–36 °C), оптимальной для функционирования полимеров, в отличие от реакции Белоусова — Жаботинского, протекающей при экстремально высокой температуре (250 °C) для биоорганических веществ. Это обстоятельство позволяет разделить разные этапы и автокаталитические среды по температурным градиентам.

Следует брать во внимание осциллирующие реакции с твёрдыми подложками, создающими при синтезе соответствующий автоколебательный процесс. Например, платина, создающая автоколебания на кристаллической решётке, способствует ускорению реакции разложения метанола на 1–2 порядка в результате образования CO_2 и воды [49].

Вторым примером служит окисление графита при получении графена. В этом случае на поверхности графена периодически образуется упорядоченный слой атомов углерода и кислорода. Затем этот слой разрушается, и всё повторяется снова. Периодическое появление и исчезновение этой структуры приводит к колебаниям напряжения, которые наблюдаются при электрохимическом окислении графита. В данном случае эффекты наблюдаются в аллотропных модификациях углерода, рассмотренных нами выше и предложенных для изучения протобиологических реакций: полимеризации нуклеотидов и метаболических реакциях. Таким образом, одним из промежуточных элементов проточных дискретных сред могут быть среды с твёрдыми кристаллическими решётками, на поверхности которых возникают колебания среды.

Необходимым этапом является разделение сред на сектора с неорганическим компонентом, поставляющим катализаторы или органическое сырьё для последующего органического синтеза (рис. 59). Это позволит воссоздать природные процессы взаимодействия различных сред.

Органическим сырьём могут являться и мономерные звенья для полимеров, например нуклеотиды. Баланс свободных нуклеотидов и связанных в нуклеиновых кислотах внутри клетки в общих чертах характеризуется следующими особенностями. В эукариотической клетке колебания численности свободных нуклеотидов (АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ) составляют 10^5 в стационарной фазе и доходят до 10^9 в период деления или разрушения (апоптоза или лизиса) клетки. Причём несколько миллиардов нуклеотидов наблюдается для каждой из форм: АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ. В случае

с апоптозом распределение свободных нуклеотидов происходит более упорядоченно с образованием более длинных фрагментов нуклеиновых кислот и пептидов.

Аналогичные порядки величин установлены и для свободных аминокислот, численность которых в клетке колеблется в пределах 10^5 – 10^6 . В период лизиса или апоптоза количество свободных аминокислот может достигать нескольких миллиардов молекул. В клетках прокариотов количество свободных нуклеотидов колеблется в пределах тысяч и сотен тысяч. Таким образом, в разные жизненные стадии развития клетки количество нуклеотидов значительно варьирует.

Доля свободных и связанных нуклеотидов зависит от типа клеток. Так, количество АТФ в клетке в среднем составляет 0,04% на сырую массу клетки. Наибольшее количество АТФ (0,2–1%) содержится в скелетных мышцах. У млекопитающих количество нуклеотидов и нуклеиновых кислот в процентах от массы клетки колеблется примерно от 1% в клетках мышц до 15–40% в клетках вилочковой железы и сперматозоидах. В других клетках содержание АТФ ниже. Также следует отметить, что АТФ составляет в клетке в среднем 1 млрд, а нуклеотидов, связанных в геноме нуклеиновых кислот (цепочек), в среднем 5–10 млрд пар оснований — у позвоночных. Но это только АТФ, вместе с ГТФ, УТФ, ЦТФ это число увеличится в несколько раз. У беспозвоночных и одноклеточных в геноме нуклеиновых кислот (цепочек) в среднем 3–6 млн пар оснований, в геноме митохондрий — десятки тысяч пар оснований (табл. 2).

Из этого следует, что доля свободных нуклеотидов в различных типах клеток колеблется от 10 до 50% от нуклеотидов, связанных в РНК и ДНК на разных этапах жизненного цикла. Вероятно, эта доля увеличивается от 50 до 95% на стадиях разрушения клетки и при делении. Пропорции этих балансов необходимо учитывать при моделировании автоколебательных сред. Таким образом, необходимо соединить систему автоколебательных реакций с полимеризацией мономерных звеньев — нуклеотидов и подобных им мономеров.

Наиболее перспективным является синтез техник создания автоволновых реакций с метаболомикой, то есть управление обменом веществ методом метаболической инженерии необходимо внедрить в известные автоволновые реакции (рис. 61). Для этого необходимо подобрать типы фазовых переходов в живых системах к соответствующим типам автоволновых реакций [100].

Таблица 2

Число свободных нуклеотидов и связанных в нуклеиновых кислотах в различных типах клеток

Организмы	Нуклеотидные пары	Митохондрии	Свободные нуклеотиды
Аденовирус	$3-3,3 \cdot 10^5$		
Фаг T2	$2 \cdot 10^4$		
Фаг T5	$1,3 \cdot 10^5$		
Микоплазма	$5,8 \cdot 10^5$		
<i>Escherichia coli</i>	$4,5 \cdot 10^6$		$1 \cdot 10^5$
Дрожжи	$1,8 \cdot 10^7$	$7,4 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^6$
<i>Arabidopsis thaliana</i>	$7 \cdot 10^7$		
Дрозифила (<i>Drosophila melanogaster</i>)	$2,7 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^7$
Лягушка (<i>Rana pipiens</i>)	$6 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^8$
Мышь (<i>Mus musculus</i>)	$3 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^9$
Крыса (<i>Rattus norvegicus</i>)	$6 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^9$
Человек (<i>Homo sapiens</i>)	$5,8-12 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^9$

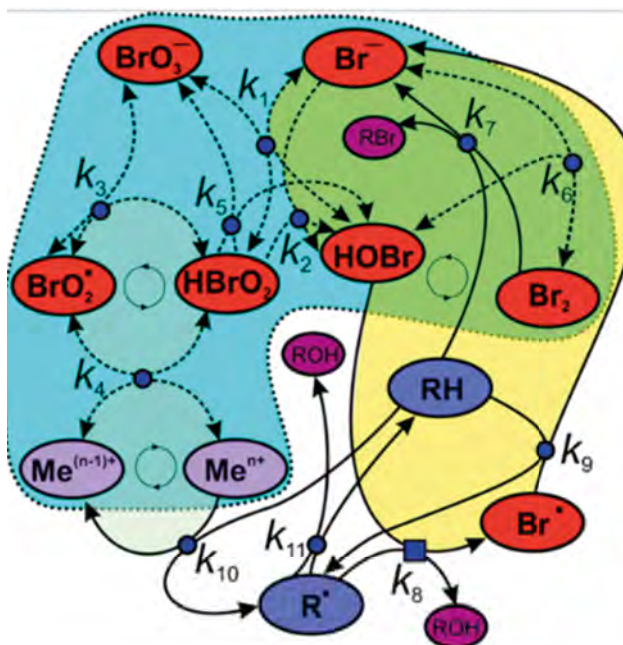


Рис. 61 (начало). Схема реакции Белоусова – Жаботинского и общего метаболизма клетки

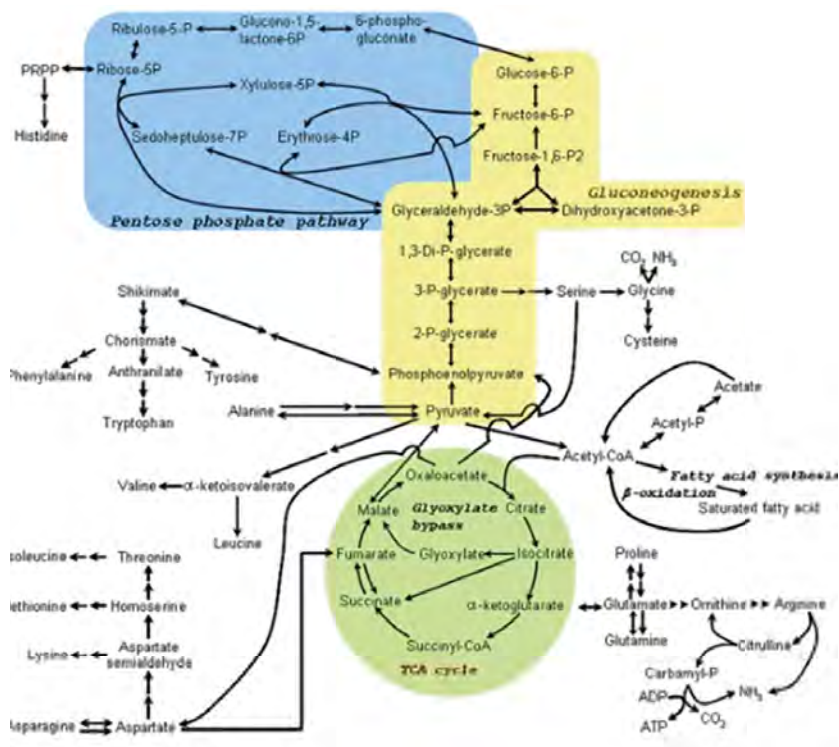


Рис. 61 (окончание)

2.9. Гидродинамическая среда

Помимо того, что среда должна быть колеблющейся, неравновесной и создающей некоторые колебания внешними факторами, например кристаллической минеральной решёткой, также необходимо учитывать динамику передвижения самой жидкой фазы — гидродинамику. Поскольку при работе с маленькими по объёму пробами молекул эффективней работать с соответствующими маленькими средами, то и специфика гидродинамический течений и перемешиваний должна быть соответствующая. С другой стороны, крупные колебания создают также значимые эффекты в природе, такие как пенообразование, вынос золя и капельной

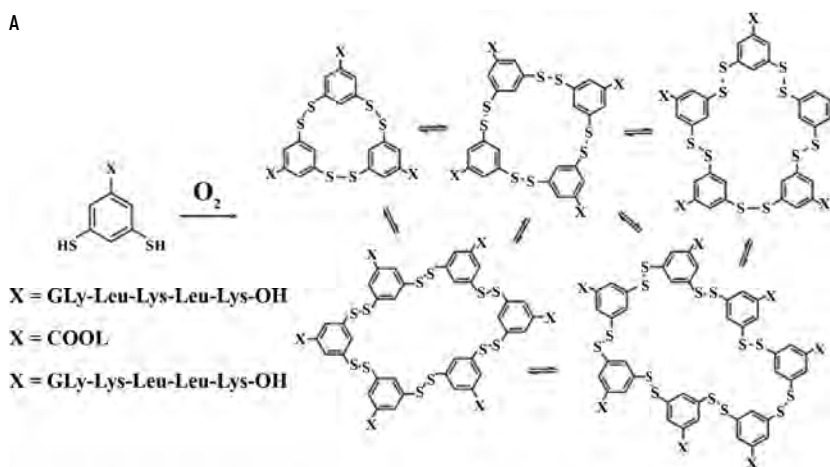
фракции, разбитие поверхностных плёнок воды и т.д. Причём при взаимодействии, например, с твёрдой фазой или газообразной специфика гидродинамики также будет меняться. Тем не менее вода, содержащаяся в небольших ёмкостях и средах, более мобильна, ею проще управлять: крутить, вертеть, трясти, испарять, изучать в части гравитации, сил Кориолиса. То есть все формы воды, помимо переходов по агрегатным состояниям, включая гигроскопическую, капиллярную формы, должны учитываться в экспериментах [100].

В первую очередь важна механическая передача движения при взаимодействии с твёрдыми субстратами. Это имеет решающее значение при росте полимеров, особенно супрамолекулярных. Так, в 2010 г. исследователи установили, что в зависимости от типа перемешивания формируется и размножается определённая группа полимеров (рис. 62) [136]. При этом если среду не перемешивать, образуются только тримеры и тетрамеры, а если встряхивать шейкером и магнитной мешалкой, образуются гексамеры и гептамеры.

Гексамеры и гептамеры существуют в растворе в виде длинных нитей — фибрилл. Каждая нить представляет собой «стопку» кольцевых молекул, приклеенных друг к другу благодаря способности пептидов образовывать бета-листы (рис. 62). Ширина фибриллы составляет от 4,7 до 4,9 нм, что соответствует диаметру гекса- и гептамеров с торчащими наружу пептидными радикалами. Длина фибрилл может достигать 1–2 мкм. При встряхивании фибриллы, состоящие из гексамеров, рвутся чаще, чем гептамерные, что способствует ускорению роста первых. В связи с этим гексамеры размножаются быстрее и побеждают своих семичленных конкурентов в борьбе за субстрат. При перемешивании магнитной мешалкой фибриллы и гексамеров, и гептамеров рвутся с одинаковой частотой. Фибриллы измельчаются мешалкой, трущейся о дно сосуда. Поскольку гептамерные фибриллы растут быстрее гексамерных, то в таких условиях победа оказывается на стороне семичленных молекул.

Выяснилось также, что гептамеры и гексамеры не могут съесть друг друга: они питаются только моно-, три- и тетрамерами (рис. 62). Размножение обоих типов репликаторов в среде с ограниченным количеством «пищи» идёт по сигмоидальной кривой, как и положено любым размножающимся биообъектам: сначала их численность растёт с ускорением, затем рост замедляется и в конце концов останавливается. Если добавить в раствор новую пор-

А



Б

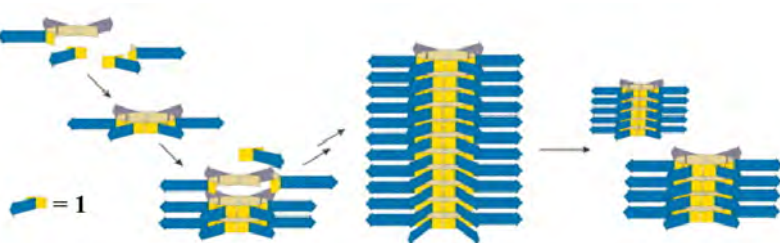


Рис. 62. Выстраивание фибрилл молекул в зависимости от типа перемешивания [136]:

А – вещества, использовавшиеся в экспериментах. Каждый мономер представляет собой бензольное кольцо, к которому присоединены две тиоловые группы $[-\text{SH}]$ и один из трёх радикалов $[\text{X}]$. Мономеры в присутствии кислорода самопроизвольно объединяются в кольцевые структуры.

Б – схема размножения молекул в эксперименте. Шесть мономеров объединяются в кольцевую молекулу – гексамер, который становится затравкой для роста фибриллы. Фибрилла растёт с обоих концов, а её разрыв ведёт к появлению двух новых точек роста.

Чем чаще рвутся фибриллы, тем быстрее идёт накопление гексамеров в растворе

цию «пищи», рост возобновляется. Данное исследование подводит иную прочную методологическую основу для экспериментальной работы с полимерами и супрамолекулярными комплексами при необходимости диверсификации гидродинамических режимов.

Но изменение гидродинамического режима влияет также и на сам синтез особенно сложных биологических молекул и на особенности их пространственного распределения в исследуемой среде. Нами для исследований была взята жирная кислота с небольшой молекулярной массой — сорбиновая кислота

в объёме 0,5 г, которая помещалась в дистиллированную воду. Затем производилось её перемешивание в магнитной мешалке и центрифуге. Контролем являлась проба, которая не подвергалась различным механическим и гидродинамическим воздействиям. Анализ обработанных образцов производился методом газовой хроматографии. Полученные данные сравнивали с базой данных масс-спектров NIST.08. В контрольном образце сорбиновой кислоты (Sorbic Acid) среди посторонних веществ были выявлены Decane и Benzoic acid (рис. 63, 1).

В экспериментальной пробе после воздействия на вещества магнитной мешалки помимо вышеперечисленных соединений также обнаружен methyl 2,3-anhydro-beta-d-ribofuranoside (рис. 63, 2). В третьей пробе (рис. 63, 3) после воздействия на вещества центрифужных сил помимо сорбиновой кислоты и декана был обнаружен phenol, 2-(1,1-dimethylethyl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl). В свою очередь бензойная кислота выпала из состава выявляемых соединений.

Все вышеперечисленные вещества снимали через колонку с использованием растворителя метанола. При исследовании прямым вводом без растворителя в первой пробе также были выявлены pentatriacontene и octanal (рис. 63, 4).

Следует отметить, что methyl 2,3-anhydro-beta-d-ribofuranoside является хиральным веществом и продуктом биологического происхождения, выявлен в метаболизме грибов и бацилл [171]. Однако вполне вероятно, что данное вещество могло попасть в пробу случайно с экзоферментами и продуктами метаболизма микроорганизмов или загрязнением индольными веществами, с которыми также ранее работали в лаборатории. Известно, что индол-индольным методом синтезируют молекулы данного ряда [33]. Следует отметить, что в данных экспериментах после механического воздействия не только появилось новое вещество, но и исчезло ранее диагностируемое. Однако это может являться следствием пространственного перераспределения веществ в пробе в ходе перемешивания, что лимитирует состав соединений, попадающих в выборку.

Тем не менее данный факт свидетельствует о специфике формирования микроагрегаций веществ в процессе перемешивания. Если эксперименты проводятся в маленьких пробах и тем более плёнках и капиллярах, наполненных ПАВами, мицеллами и везикулами, то гидродинамика может оказывать влияние и на синтез исходных веществ вследствие более интенсивного облучения

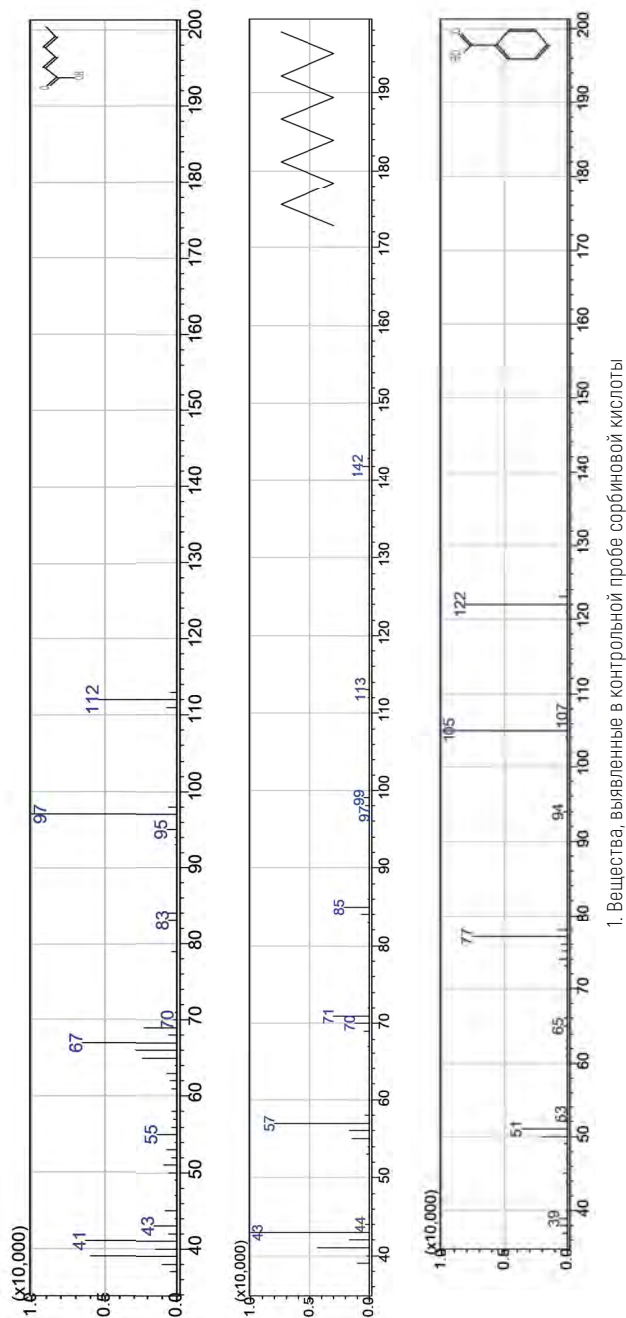
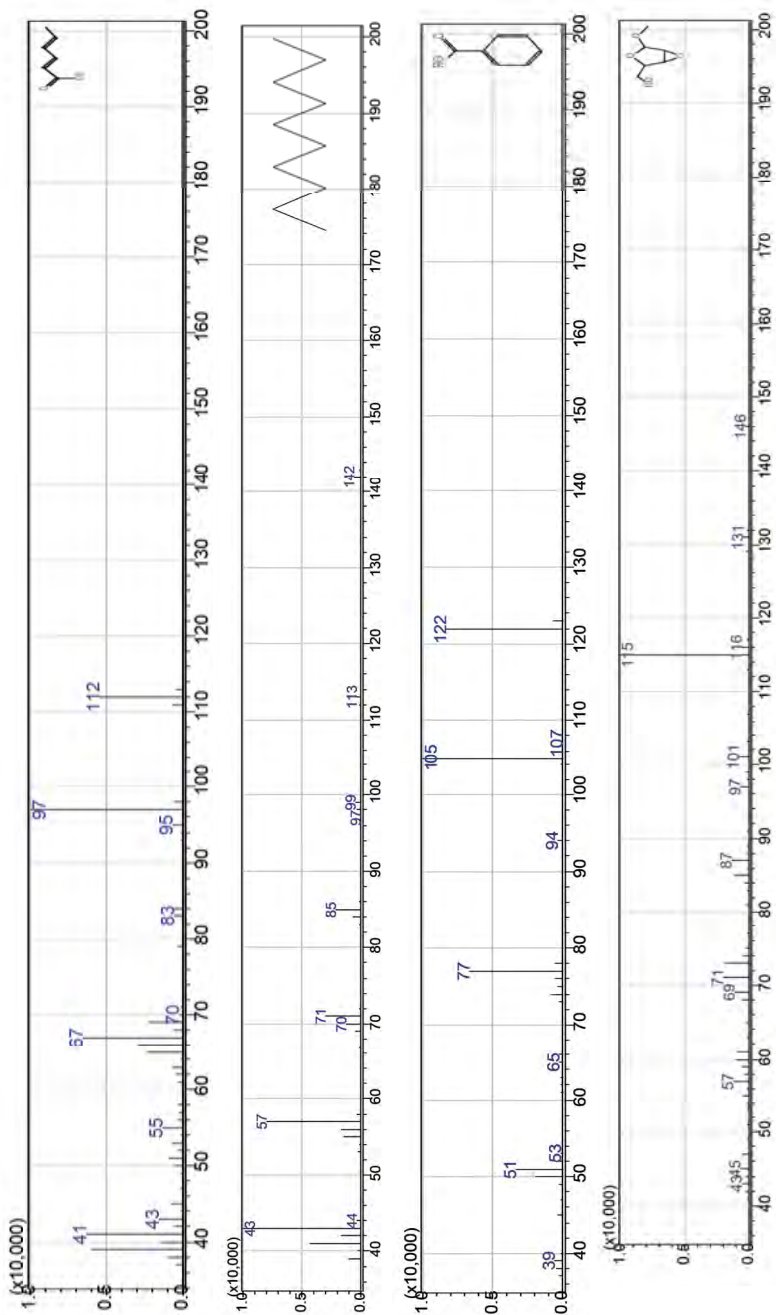
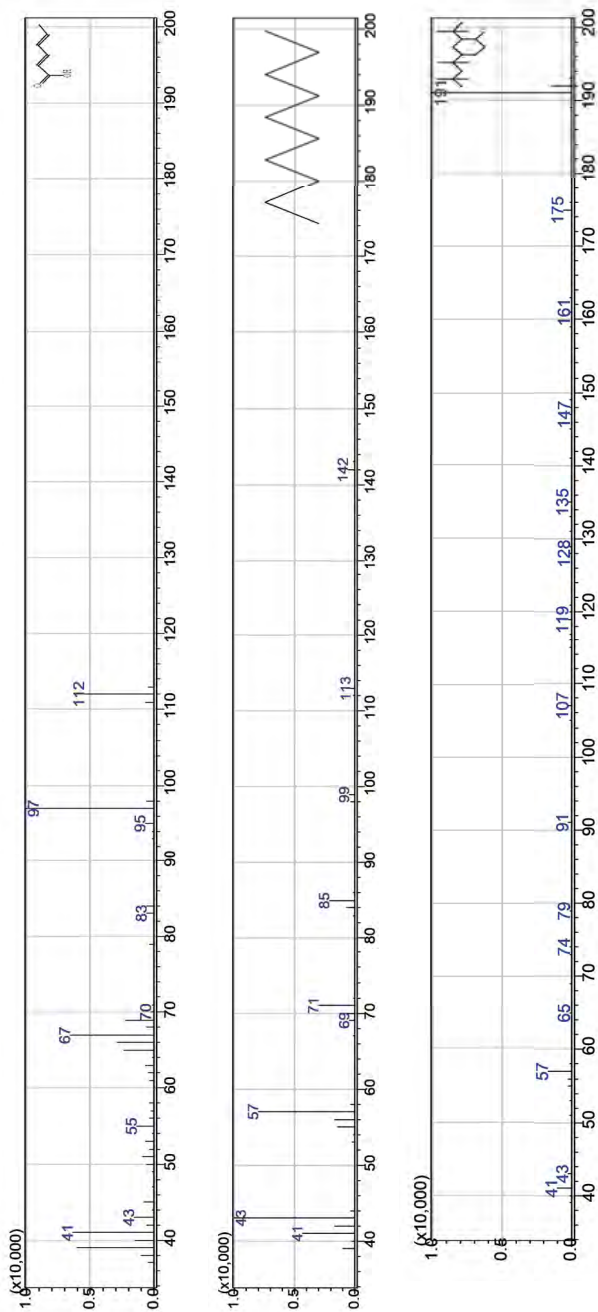


Рис. 63 (начало). Распределение органических веществ в сорбиновой кислоте в зависимости от типа перемешивания



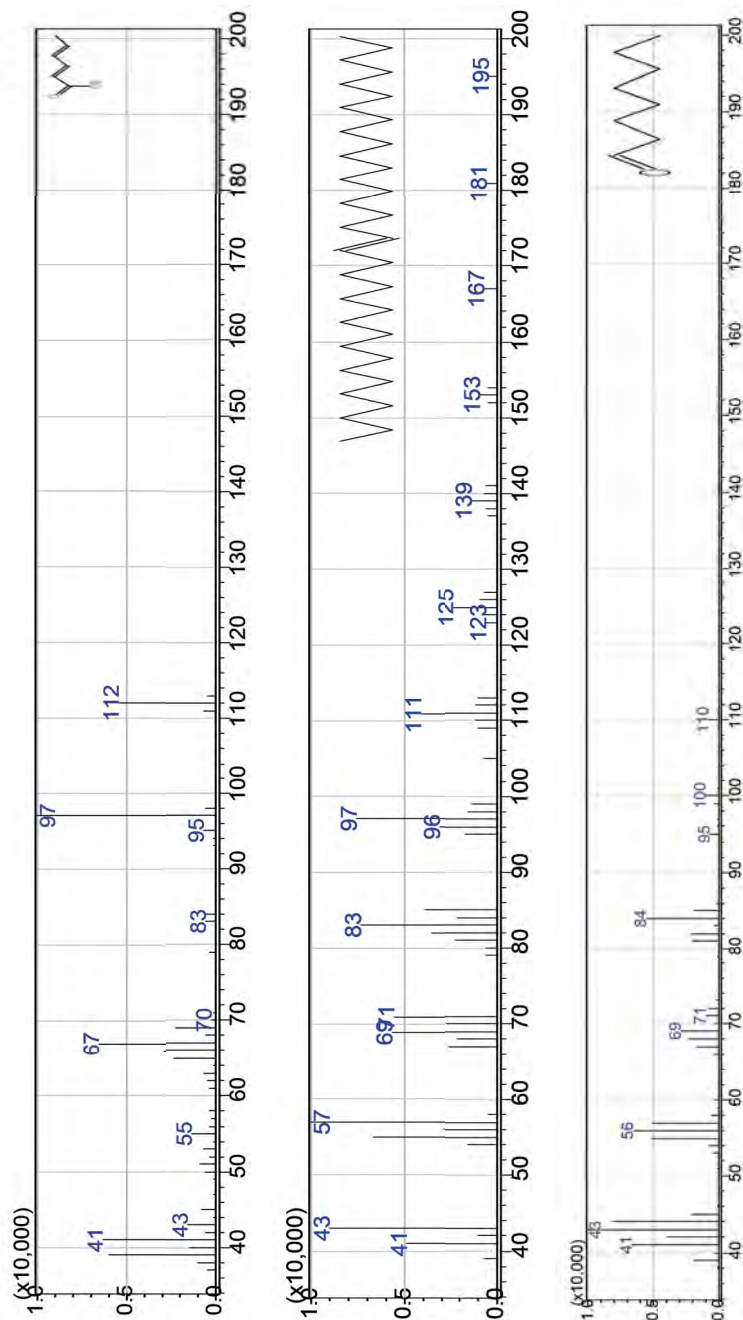
2. Вещества, выявленные в пробе сорбиновой кислоты после воздействия магнитной мешалки

рис. 63 (продолжение)



3. Вещества, выявленные в пробе сорбиновой кислоты после воздействия центрифуги

Рис. 63 (продолжение)



4. Состав веществ, выявленных в пробе сорбиновой кислоты прямым вводом

Рис. 63 (окончание)

поверхностных слоёв. Современные гибридайзеры и некоторые культиваторы включают режимы перемешивания, но диапазон этих режимов варьирует незначительно, так как направлен на решение узких задач.

Работа в капиллярах и плёнках с заданными пулами органических веществ, распределённых на поверхности в виде жирных кислот и углеводов, позволит создавать определённые слои в ходе гидродинамического перемешивания. ПАВЫ, ациклические, полициклические углеводороды и жирные кислоты могут рассматриваться в качестве доставщиков веществ в заданной среде на определённые слои по степени гидрофобности режимам мицеллообразования. После чего при создании режимов увеличения разделов фаз появится тенденция к образованию определённых форм везикул.

Если вернуться к историческому аспекту ударно-волновых эффектов, вызываемых метеоритной бомбардировкой на ранней стадии развития Земли [56; 62]), то весь перечень механических эффектов должен быть экспериментально смоделирован. Он должен включать обязательное и интенсифицированное создание разделов фаз жидкость—газ с возникновением различных форм воздушно-капельных режимов. Дополнительный фактор лунного перемешивания на ранних стадиях развития системы Земля—Луна только добавляет необходимость стабилизации гидродинамических режимов [3; 31; 60; 94].

Приведённые эксперименты подтверждают возможность хирального отбора, обусловленного динамикой среды, а также увеличение агрегативности молекул и интенсификацию роста и эволюции фибрилл и полимеров. Таким образом, режимы перемешивания воды необходимо включать в эксперименты по абиогенезу, так как они изменяют пространственное распределение молекул и их структурную организацию на более сложном супрамолекулярном уровне, а также способствуют интенсификации роста полимеров.

В этих аспектах решаются сразу две краеугольные задачи — возникновения мицеллярных биологических сфер в виде прото-клеток и формирование различных по организации рибонуклеиновых кислот. Так, если совместить выращивание молекулярных РНК-колоний, проводимых А. Б. Четверином (1991, 2008) в порах геля или рибозимов, с гидродинамикой перемешивания, проведённой нами, с колониями бактерий [61], то можно получить новые данные о поведении полимеров РНК в динамической среде.

2.10. Получение петель, узлов, клубков, катушек из полимеров, фибриллярных и нитчатых молекул

Если применить методы механического перемешивания применительно к биологическим полимерам, то появится новое методическое направление. Это направление может охватить не только абиогенез, но и другие технологические и биотехнологические сферы.

Известно, что важнейшим аспектом биологических полимеров является их способность образовывать петли, клубки, агрегаты, глобулы и другие различные типы «упаковки». Причём РНК в отличие от белков могут образовывать и петли и узлы в различных пространственных условиях и при взаимодействии с разными молекулами (рис. 51).

Способность к различным типам свёртывания известна у разных типов биологических, биоорганических и органических молекул, в том числе гуминовых кислот [82]. В связи с этим большой интерес представляют типы сворачивания и зацепления, благодаря которым биологические молекулы могут менять свои функции [72; 102]. Но так как биологические полимеры участвуют в парных взаимодействиях — нуклеиновые кислоты с белками, белки с углеводами, следует рассмотреть особенности взаимодействия различных полимеров друг с другом.

Упомянутые выше нитчатые минералы являются не только вероятной средой для геосферы, в которой проходили стадии абиогенеза, но и удобными адсорбентами и иммобилизаторами для биоты и биологических молекул. Поэтому нами был проведён ряд экспериментов с использованием нитчатых минералов. Нитчатые минералы, упоминаемые выше и являющиеся продуктом выветривания и аквализа, в последние десятилетия всё чаще синтезируются и появляются в промышленности.

Следует сначала обратиться к природным механизмам возникновения нитчатых минералов (рис. 64). Как правило, если нет процессов выветривания, минералы формируются в породах в виде жил, как, например, селенит и гипс, представленные на рис. 64, или асбест на рис. 5. В некоторых случаях нити минерала имеют разветвлённый вид, который часто наблюдается у рутила. Если минералы формируются в открытой части или иных условиях, то могут характеризоваться как вытя-

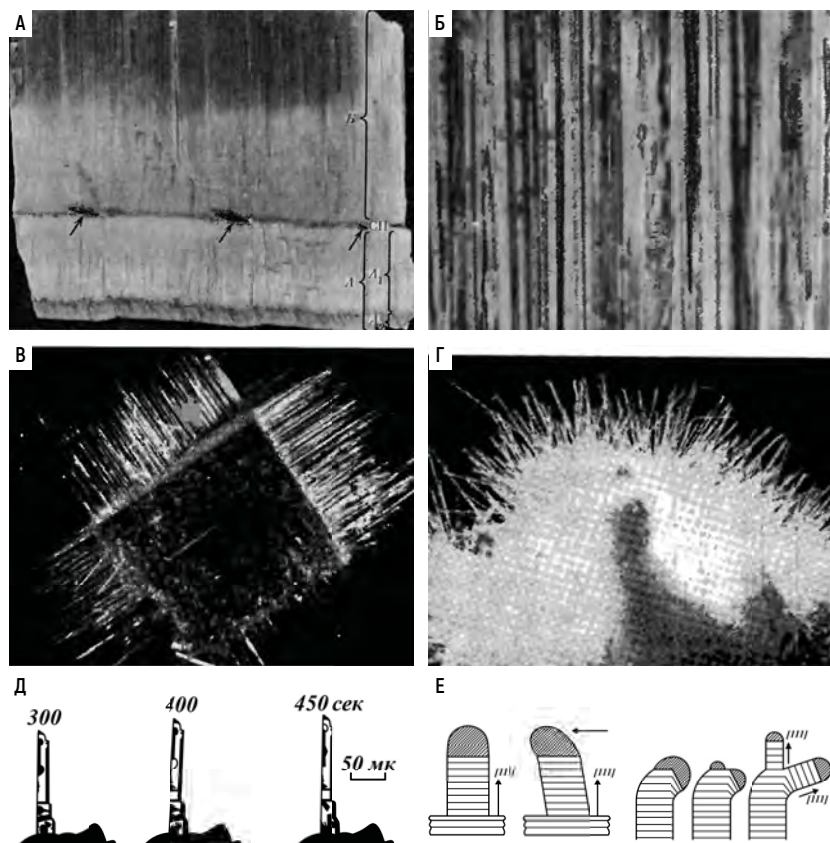


Рис. 64. Природные породы из нитчатых минералов и особенности их роста [13]:

А – участок горизонтально залегающей жилы селенита; Б – структура жилы гипса;

В – нитевидные кристаллы KBr, выращенные на кристалле в растворе, содержащем поливиниловый спирт;

Г – нитевидные кристаллы корунда, выросшие в корундовой буле;

Д – модель роста нитевидного минерала;

Е – морфологические особенности роста в нитевидных кристаллах, при изменении контактного угла между каплей сплава и подложкой

нутыми ровными формами подобно кристаллам KBr и корунда, так и искривлёнными подобно сере и халькантигу (рис. 5). На характер роста нитчатого кристалла влияет ряд факторов, например изменение контакта угла между каплей сплава и подложкой (рис. 64, Е), взаимодействие с инородным телом и ряд других факторов, позволяющих получать разветвлённые и сложные по форме нитчатые минералы.

Нами для экспериментов по взаимодействию с биотой были использованы природные и искусственные нитчатые минералы: базальтовые нити и волокна асбеста (рис. 65), а также органические волокна биологического происхождения — вата и волокна тополиного пуха. На рис. 65, Д и Е соответственно продемонстрированы адсорбированные фибриллы эластина на базальте и бактерии на волокнах тополиного пуха.

При адсорбции белковых полимеров на базальтовых волокнах (рис. 65, Д; 66, А) было установлено, что фибриллы белка связывают нитчатые минералы поперёк волокон базальта. Данный механизм также наблюдается и у живых организмов, например трихом водорослей, гифов грибов и нитчатых бактерий [56; 99]. Это проявление биоты обусловлено стремлением связать минеральные субстраты, например, в виде разрозненных фракций грунта, песка, ила. Агароза формировала на базальтовых волокнах агрегаты из собственных кристаллизованных частиц, а альгината всё связывала сплошной континуальной плёнкой (рис. 66, В, Г). Из полимерных молекул меньше всех в части структурной упорядоченной организации проявляла себя гуминовая кислота, хаотически адсорбируясь на поверхности базальтовых волокон (рис. 66, Б). Чем ближе к биологическим полимерам были исследуемые молекулы (в нашем случае это волокна эластина), тем большую структурную организацию при взаимодействии с минеральными волокнами полимеры проявляли.

При изучении взаимодействия синтетических волокон с биологическими нитчатыми и фибриллярными формами были выявлены следующие особенности (рис. 67). При взаимодействии волокон ваты с пылью и паутиной в воздушных условиях образовывались сложные конгломераты (рис. 67, А, Б), причём в отношении паутины так же, как и в случае с белком, наблюдались тенденции к поперечному пересечению хитиновыми волокнами паутины более крупных волокон ваты (рис. 67, Б). Диаметр хитиновых нитей паутины колебался в пределах 160–230 нм. В свою очередь синтетические полимеры пыли образовывали спиралевидные нити, хаотично закреплённые на различных участках (рис. 67, А, Г).

При изучении развития биоты на нитчатых минералах и волокнах ваты в средах с биотой были выявлены гифы грибов и актиномицетов, переплетающих узлы нитей или рядом расположенные базальтовые волокна (рис. 67, Д, Е). Дальнейшие исследования

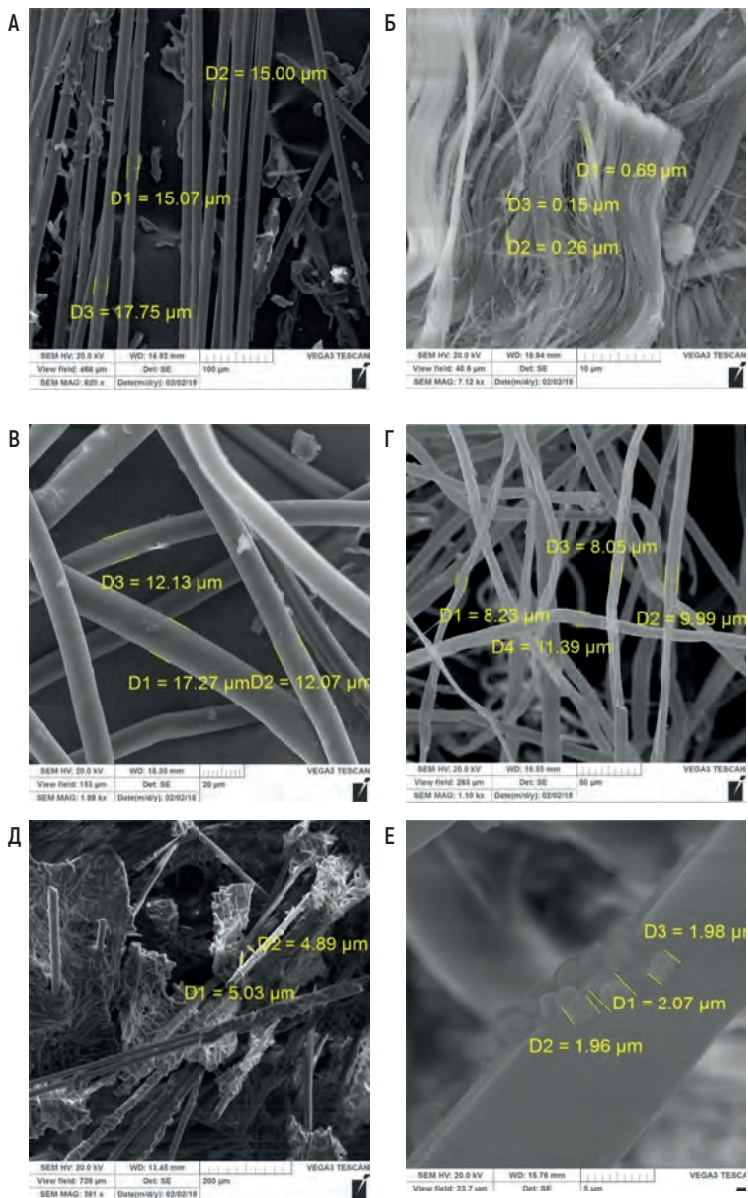


Рис. 65. Диаметр минеральных и органических волокон: А – базальтовая нить; Б – асбестовые волокна; В – волокна ваты; Г – нити тополиного пуха; Д – диаметр фибрилл эластина на базальте; Е – диаметр бактериальных клеток на поверхности волокон тополиного пуха

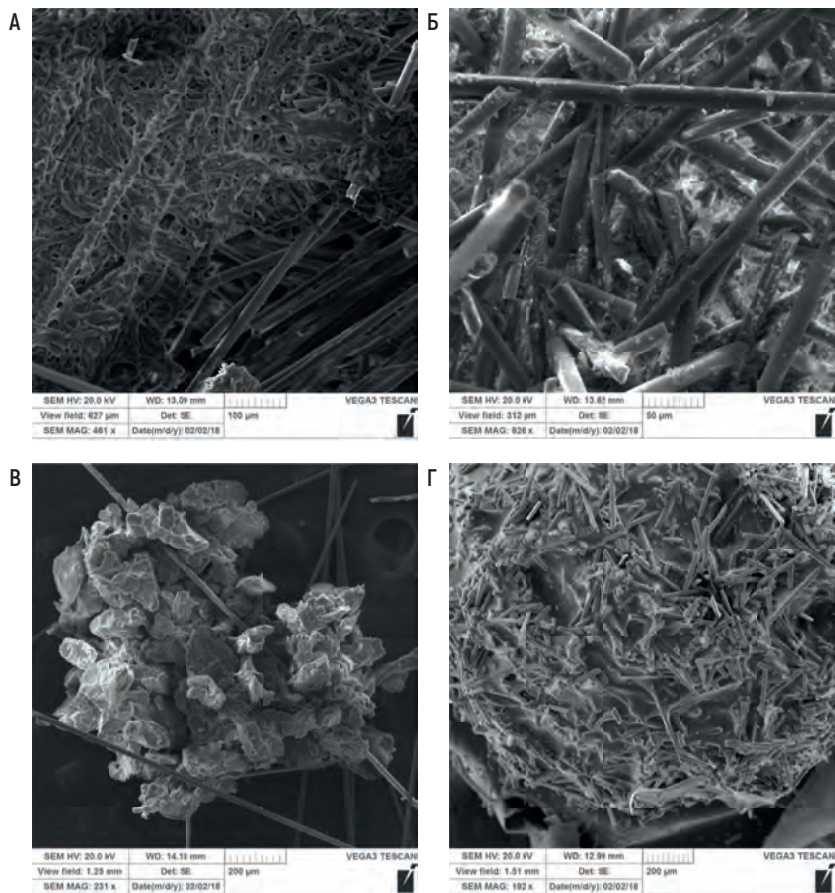


Рис. 66. Адсорбция биологических и органических молекул на базальтовых волокнах:
 А – базальт с эластином; Б – базальт с гуминовой кислотой; В – базальт с агарозой;
 Г – базальт с альгинатой

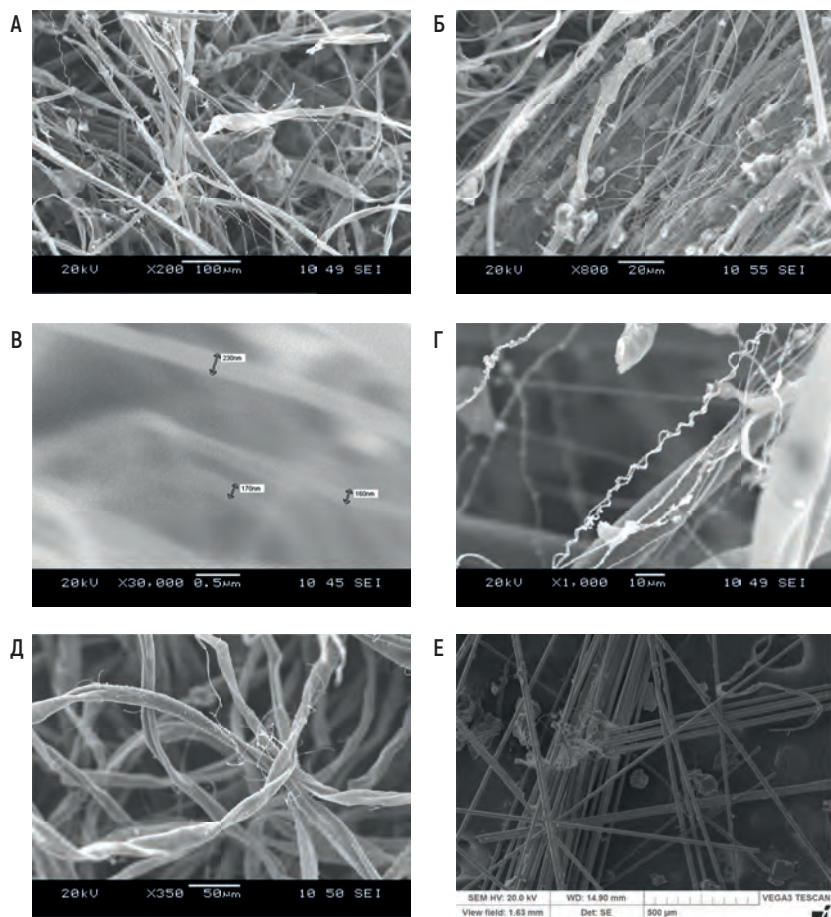


Рис. 67. Синтетические волокна с биологическими нитчатыми и фибриллярными структурами: А – вата с пылью; Б – вата с паутиной; В – диаметр волокон паутины; Г – синтетические волокна пыли.
 Д – гифы грибов на узле ваты; Е – гифы грибов на скоплениях базальтовых волокон

показали, что гифы актиномицетов располагаются на поверхности ваты с определённой частотой, вынося на поверхность спорангии на определённом расстоянии друг от друга (рис. 68). При этом переплетения гифов также располагались поперёк волокон ваты.

Организация биоты трихомной и вытянутой форм при освоении полимеров и минералов помимо видов плетения и завязывания узлов продемонстрировала следующие особенности (рис. 68). Синезелёные водоросли образовывали агрегаты из пемзы сферической формы, где в центре находился кусочек пемзы, от которого в разные стороны отходили трихомы водорослей (рис. 68, Б). Данный механизм позволял распределять минеральную составляющую в толще воды за счёт лучевого трёхмерного распределения биологических агрегатов с минеральными субстратами, служащими, судя по всему, не только точкой для механического прикрепления, но и источником микро- и макроэлементов. Следует отметить, что в норме данные водоросли (*Oscillatoria agardhii*) плавают в толще воды в виде отдельных трихом.

Также были получены агрегаты частиц стекла в oleиновой кислоте при определённых типах перемешивания и базальтовые агрегаты сферической формы на питательной среде (рис. 68, Б).

Таким образом, формирование агрегатов в воздушной среде из органических полимеров с биотой и агрегатов в одной среде из минеральных волокон и частиц с биотой демонстрирует возможные пути организации золь- и пыль-геосферы. При этом функциональная организация биологических полимеров также способствует упорядочиванию минеральной среды.

Форма плетения биологических полимеров при взаимодействии с различными субстратами имеет большое значение. В связи с этим следует рассмотреть математические приложения теории узлов и зацеплений в топологии и организации РНК-молекул (рис. 69). Среди известных топологических узлов и зацеплений в РНК выделяют несколько основных форм. Наиболее распространённая — узел-трилистник. Важно, что в структуре РНК чаще встречаются зацепления, чем узлы (рис. 69). Это объясняется тем, что биологические полимеры нередко содержат несколько непересекающихся замкнутых нитей, образующих математические зацепления [51; 90]. Иными словами большее значение имеет форма связи или «прикосновения», которые добавляют на порядки большее количество вариантов взаимодействия, а значит, и видов

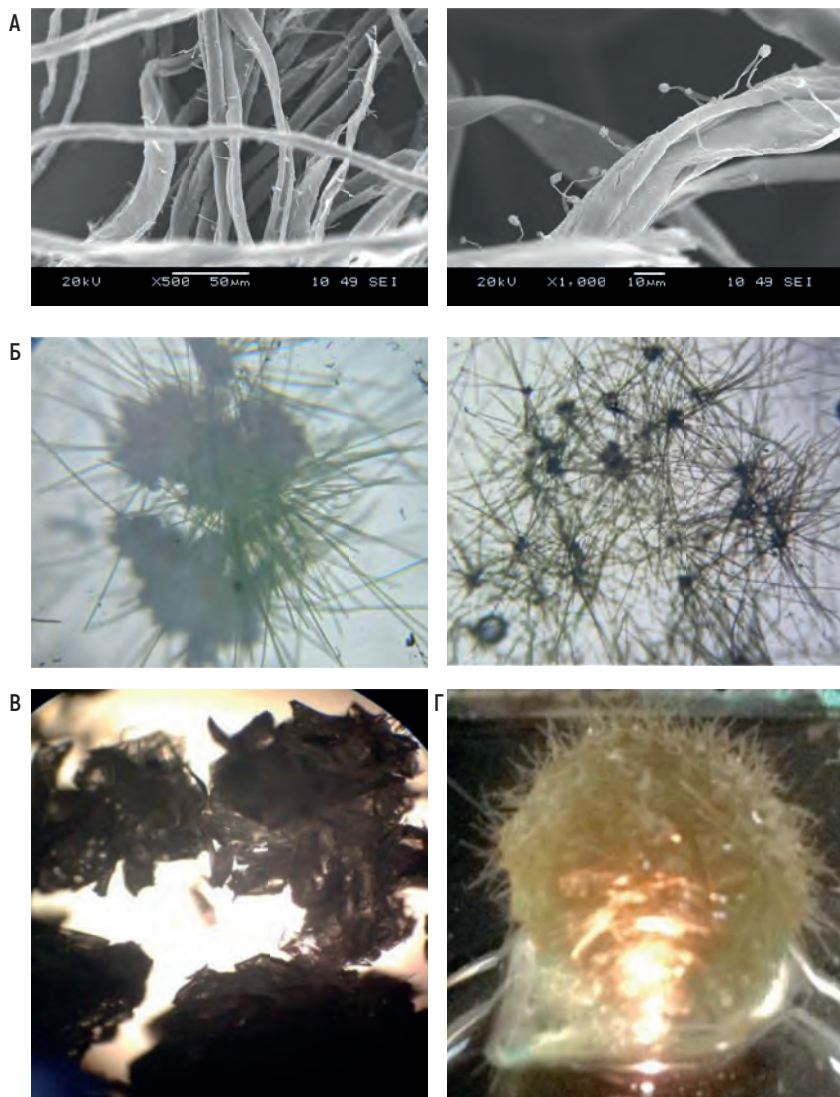
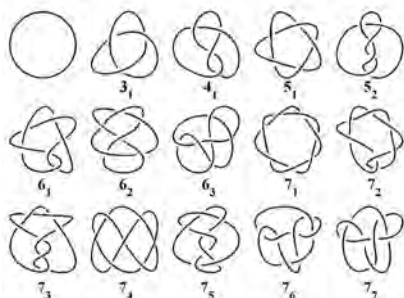


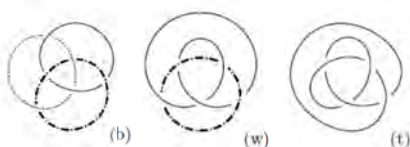
Рис. 68. Органоминеральные комплексы с минеральными и органическими волокнами: А – гифы актиномицетов, переплетающие волокна ваты с выверенной частотой; Б – агрегаты нитчатых водорослей с пемзой; В – агрегаты частиц стекла с олеиновой кислотой; Г – агрегат, образованный базальтовыми волокнами длиной 2–3 мм в питательной среде (агар)



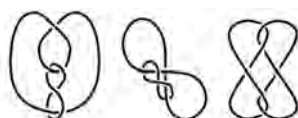
Типы узлов в топологии: 3₁ и 4₁ встречаются в РНК



Организация шпилек в РНК



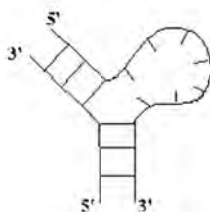
Зацепления в топологии: b – кольцо Борромео, w – зацепление Уайтхеда, t – трилистник



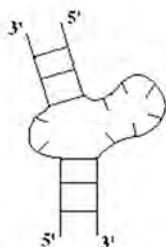
Изотопия зацеплений Уайтхеда



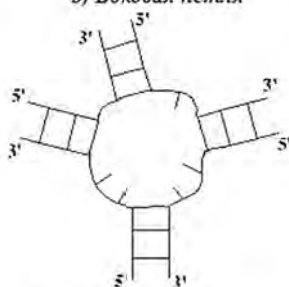
а) Шпильчатая петля



б) Боковая петля



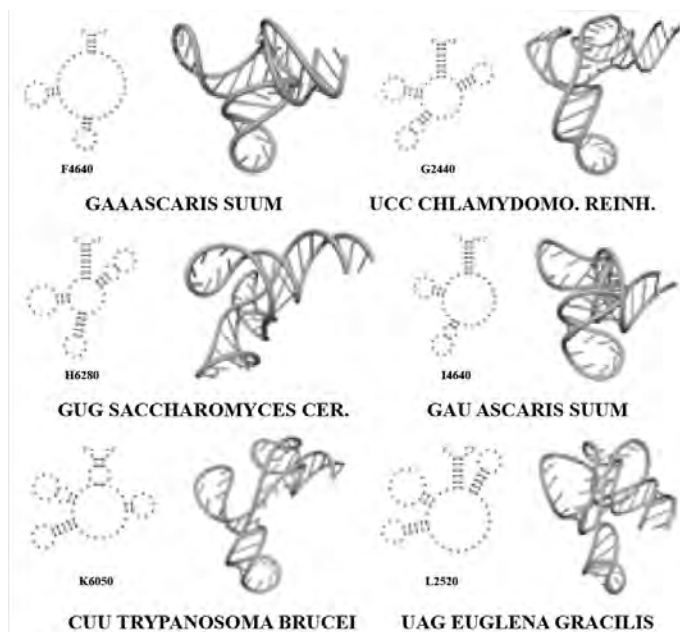
с) Внутренняя петля



д) Многозвённая петля

Типы петель – одностебельных участков вторичной структуры РНК

Рис. 69 (начало). Узлы и зацепления в топологии и в молекулах рибонуклеиновых кислот [51; 90]



Трёхмерная структура различных РНК

Рис. 69 (окончание)

самоорганизации. Это видно на примере изотопий Уайтхеда и различных форм трилистников. Причём есть основания полагать, что помимо того, что подобные варианты зацеплений фигурируют не только в полиндромных РНК, но также для некоторых зацеплений возможно нарушение комплементарности, какое наблюдается у кольцевых молекул РНК. Например, когда гуанин встаёт напротив урацила в РНК-термометрах, вирусах и других РНК (рис. 48, 51). Это снимает ещё больше ограничений в трёхмерной организации РНК молекул в части образования шпилек и зацеплений.

Вслед за нитчатыми водорослями [99] у различных видов РНК открывается ещё больше возможностей «вить из себя верёвки и узлы» в зависимости от факторов среды. Таким образом, открывается возможность изучения специфики континуальности жизни на молекулярном уровне с использованием различных видов РНК, в том числе искусственно полученных олигонуклеотидов. В данном аспекте организации полимеров РНК наблюдается и континуальная и дискретная организация одновременно, когда

кольцевые и вытянутые молекулы скатываются в клубки и когда полирибонуклеотиды полимеризуются в более длинные полимеры и обратным образом распадаются на отдельные нуклеотиды.

В отношении метода механического перемешивания среды и создания соответствующей гидродинамики можно отметить следующее. Отличие метода гидродинамического перемешивания [136] супрамолекулярных комплексов фибриллярного типа заключается в том, что в данном случае выстраиваются фибриллярные молекулы из симметричных комплексов определённого типа (рис. 62). В нашем случае гидродинамическое перемешивание используется для создания (и исследования возможности создания) более сложных узлов и клубков на уже имеющихся фибриллярных молекулах, как правило, более жёсткой структуры. То есть в данном случае не выстраиваются новые молекулы и не растут, а происходит усложнение организации уже имеющихся фибриллярных молекул. Таким образом, изучаются возможности их организации и самоорганизации в зависимости от условий среды.

Подбор различных гидродинамических условий среды может использоваться и для изучения возможностей возникновения сложной организации супрамолекулярных комплексов, для чего необходимо более тонкая настройка динамики условий среды. В этом отношении можно обратиться к исследованиям по организации полимеров, проведённым группой А. Р. Хохлова, получившей ряд значимых результатов [10; 53].

В методике данного направления необходимо использование мягких полимеров — супрамолекулярных молекул и РНК и более жёстких, подобных белкам и ДНК, и ещё более жёстких и устойчивых. То есть необходимо составить линейку фибриллярных полимеров и нитей — минеральные нити, полимерные жёсткие нити, полимерные органические мягкие нити, биоорганические фибриллы, биологические фибриллы, супрамолекулярные полимеры. Все перечисленные виды фибрилл, пилей и нитей должны быть применены в диапазоне различных диаметров и толщины. Толщина нитей и фибрилл для исследований должна составлять нанометры — 3–8 нм, десятки нанометров — 20–50 нм, сотни нанометров — 100–300 и микрометры — 1–5 мкм. То есть необходима такая же линейка полимеров не только по степени прочности, но и по диаметру волокон, что будет определять уровень их эластичности и, соответственно, возможности функционала, в том числе в части трёхмерных укладок. Более толстые нити диамет-

ром десятки и сотни микрометров удобны в работе с более плотными и нестабильными средами, где необходима устойчивость и стабильность субстрата в пространстве.

Использование нитчатых полимеров и фибрилл следует апробировать в различных средах и агрегатных состояниях среды — жидких и полутвёрдых органических гелевых средах, твёрдых минеральных средах и воздушных. Это необходимо, во-первых, для изучения взаимодействия протобиологических молекул на всех границах разделов фаз, а во-вторых, для изучения их структуры и функционирования вокруг твёрдых, стабильных, не изменяемых в среде субстратах.

2.11. Приборы

Помимо обычных химических методов, используемых в молекулярной биологии, следует более подробно остановиться на специальных приборах и оборудовании. Нет никаких сомнений, что без специального оборудования невозможно оптимизировать и интенсифицировать получение протобиологических молекул, комплексов и сред. Причём создание различных молекул органической, биоорганической природы вполне может реализовываться и стандартными химическими и физико-химическими методами, которые с периодическим постоянством поставляют новые биологические молекулы, полученные искусственным путём.

Однако создание и запуск молекулярных систем, сопоставимых по сложности с живыми, требуют специализированного оборудования. Это подтверждается тем, что протобиологические комплексы формируются значительно медленнее, чем другие органические молекулы. С полученными стандартными более выверенными и отработанными методами специальных молекул соответствующей чистоты необходимо уже экспериментировать в специальных приборах для получения более сложных самоорганизующихся систем.

Экспериментальные попытки воспроизвести процесс возникновения жизни — от работ А. И. Опарина, А. Н. Баха, С. Миллера и С. Фокса до исследований Дж. Сазерленда [181] и Р. Саладино [189] — остаются локальными и несистемными. При этом в последних работах применяется комплексный подход к моделированию орга-

нической среды для протобионтов. Пути образования нуклеотидов, аминокислот, углеводов и жирных кислот, по всей видимости, могут быть различными, а ключевым вопросом является характеристика среды, обусловившая преобразования и самоорганизацию РНК-молекул и обеспечившая основные факторы появления новой материи — дискретность, необратимость, эволюцию.

Ряд закономерностей, установленных в химической эволюции и пробиотической самоорганизации, косвенно указывает на то, что жизнь может появиться в ходе различных путей самоорганизации и условий среды [84; 121]. И характеристики этой жизни также могут быть различными. Описанные очень изменчивые условия среды на ранних этапах функционирования планеты ставят необходимость соответствующих специальных технических подходов к решению проблемы возникновения жизни.

В советский период в пионерных исследованиях космической биологии под руководством Э. И. Заара (1971) были сконструированы установки серии «Фотостат» для изучения реакции организмов на физические условия планеты Марс. Аппарат был оборудован камерой низкого давления, нагревателем и холодильной машиной, баллоном с газом, вакуумным насосом, ультрафиолетовой лампой видимого света и соответствующими датчиками (рис. 70).

Недостатком прибора являлся небольшой диапазон создаваемых температур $-35...+30^{\circ}\text{C}$, отсутствие возможностей подачи разных газов для создания сложного состава атмосферы и отсутствие механизмов для перемешивания. При этом на первом экспериментальном этапе космической биологии прибор позволил решить ряд задач в части толерантности ряда живых организмов и оказался весьма полезным.

По мере всё большего развития идей космического карантина акцент делался на увеличение средств стерилизации аппаратов перед космическими полётами. Космические биологические эксперименты проводились на спутниках преимущественно в ближнем космосе. Стало превалировать моделирование и сбор данных с экзопланет путём различных зондов. Параллельно для решения узкоспециализированных задач, зачастую далёких от космической биологии, стали разрабатываться всё более узкоспециализированные экспериментальные приборы с возможностью создания условий внутри установок, сильно отличающихся от Земных, но, как правило, по одному или двум-трём параметрам (табл. 3). Эти приборы служили для получения специальных материа-

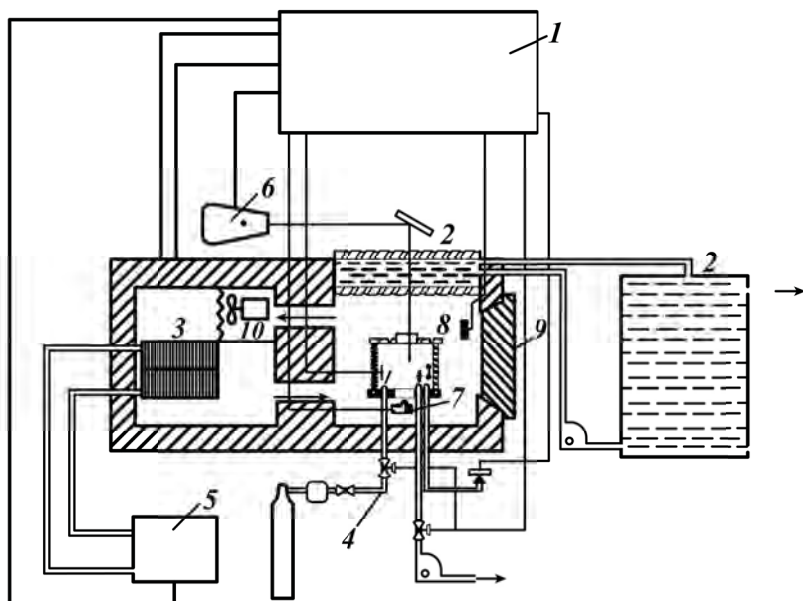


Схема размещения основных узлов установки «Фотостат-1»: 1 – пульт управления, 2 – ИК-фильтр с теплообменником, 3 – кондиционер, 4 – система низкого давления, 5 – холодильная машина с испарителями, 6 – источник видимого и УФ-спектра с зеркалом, 7 – датчики УФ-радиации, 8 – датчик температуры, 9 – дверь в рабочую камеру, 10 – нагреватель с вентиляторами

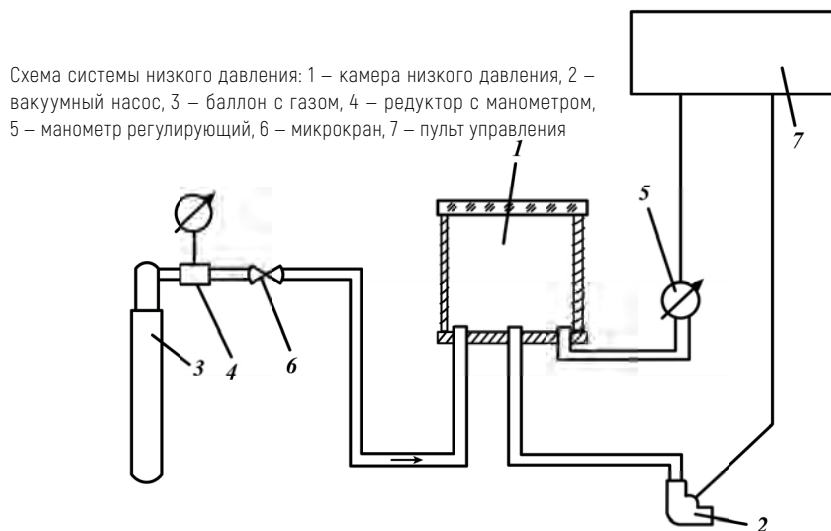


Рис. 70. Схема «Фотостата-1» по Э. И. Заару [47]

Таблица 3

**Приборы, позволяющие создавать специальные среды
и производить биотехнологические операции на молекулярном уровне**

Прибор	Характеристики
Камера агрессивных сред	Воздействие сернистого газа от 70–2 000 мг/м ³ при колебаниях температуры +0...+40 °С.
Камера соляного тумана	Равномерное распределение тумана без кристаллизации объёмом 80 л и подачей сжатого воздуха 4 кг/см ²
Камера криогенных температур	Температуры -180...+200 °С. Скорость охлаждения при отрицательных температурах от 0,1 до 5 °С/мин
Испытательная камера статической и динамической пыли	Скорость потока зольной пыли, талька, SiO ₂ , CaCO ₃ , кварцевого песка, портландцемента от 0,5 до 15 м/с. Концентрация пыли от 2 до 10 г/м ³ . Размер частиц пыли 2–250 мкм
Камера воздействия дождя и солнечного излучения	Температура от -30 до +120 °С, влажность 10–98 %, диапазон воспроизводимой интенсивности излучения, включая излучение, отражённое от стенок камеры, 700–1200 Вт/м ² . Спектр ультрафиолетового излучения при спектральном распределении в соответствии с ГОСТ РВ 20.57416-98 при плотности светового потока, 68 Вт/м ² . Излучаемый спектральный диапазон 280–3000 нм,
Термобарокамеры	
Камеры тепла, холода и пониженного давления	Температуры от -70 до + 120 °С, диапазон воспроизводимых давлений, мм рт. ст. – от атмосферного до 1
Камеры тепла, холода и повышенного давления	Температуры от -70 до +120 °С, предельные значения относительной влажности при температурах от 20 до 95 °С, 10–98 %. Диапазон воспроизводимых давлений, мм рт. ст. – от атмосферного до 1500
Камеры глубокого вакуума, имитаторы космоса	Диапазон воспроизводимых давлений, мм рт. ст. – 1 · 10 ⁻⁶ . Температуры от -40 до +60 °С
Реактор высокого давления	Давление до 200 бар, температура до 250 °С, клапаны для подачи реагентов, отбора проб и создания требуемой атмосферы. Мешалка с крутящим моментом 100 Н · см, количество оборотов – 0–500 об./мин
Климатические камеры	Температура -70...+100 °С, влажность 10–98 %
Глов-боксы (glovebox) – перчаточный бокс	Используемые газы: N ₂ , Ar, He, H ₂ O, H ₂
CO ₂ -инкубатор	Среда из CO ₂ со стерилизацией горячим воздухом 30 мин при 180 °С
Гибридайзеры	Температуры от +5 до + 100 °С, вращающиеся цилиндры и качающаяся полка
Пептидный синтезатор	Перемешивание на твёрдом носителе при повышенной температуре +55 до + 200 °С

лов и проверки уже имеющихся, а не испытания выживаемости и адаптации различных форм биоты [38; 50; 54; 97; 113]. При этом комплексных установок, учитывающих весь спектр условий среды экзопланет, практически нет.

В части получения элементов жизни также используют стан-

дартные методы, такие как ПЦР, гибридайзеры, пептидные синтезаторы и т. д. Но комплексных систем, воспроизводящих условия среды формирующихся планет или отвечающих условиям зарождения жизни, не существует. В связи с этим следует рассмотреть типы приборов, значительно изменяющих среду для проведения различных исследований и получения новых материалов и молекул.

Существует множество отдельных приборов, функционирующих по типу климатических камер, фотостатов и перчаточных боксов, каждый из которых решает узкую задачу (табл. 3). Например, камера агрессивных сред или камера тепла, влажности и коррозионных газов предназначены для оценки устойчивости металлических материалов, но также могут помочь в изучении биохимических реакций и особенностях адаптации биоты к специфичным газовым условиям. Камера соляного тумана позволяет оценить влияние избыточного содержания солей в воздушной или водной среде. Аналогом данной камеры являются туманогенераторы, используемые при выращивании растений. Камера криогенных температур позволяет оценить устойчивость материалов и организмов при сверхнизких температурах, хотя для основных экологических групп и таксонов биоты величины криоустойчивости установлены. Например, верхний предел для архей составляет $+120^{\circ}\text{C}$, а споры микроорганизмов и грибов способны выдерживать температуры, близкие к абсолютному нулю.

Данные камеры позволяют варьировать скорости охлаждения и нагревания и использовать это при синтезе и распаде биологических молекул. Камера на воздействие пыли позволяет изучить влияние пылевых бурь и промышленных производств с мелкодисперсной пылью на изучаемые компоненты. Данные приборы могут оказаться очень эффективными при изучении взаимодействия биоты и минералов в условиях золь-геосферы, планетезималей, метеоритных бомбардировок и т. д. Среди данных приборов есть камеры статической и динамической пыли (модель). Камера на воздействие дождя и на воздействие солнечного излучения в отличие от классической климатической камеры позволяет в искусственных условиях облучать исследуемые системы аналогом солнечного света, но недостатком этих камер является, то, что нельзя ограничивать отдельные спектры излучений. Однако внутри этих камер возможно создание специальных условий, блокирующих некоторые виды и частоту излучений. В камерах воздействия

тепла и солнечного излучения скорость нагрева (-30 до $+100$ °C) составляет 3,4 мин, а скорость охлаждения (от $+20$ до -30 °C) — 1 мин. Это позволяет работать с очень широким температурным диапазоном, в который можно встраивать различные реакции.

Термобарокамеры, или камеры тепла, холода и пониженного давления, также позволяют проводить изучение термических воздействий при пониженном давлении, что может помочь в изучении влияния среды на ранних стадиях формирования планеты или планетезимального облака. Камеры глубокого вакуума, имитаторы космоса также позволяют изучать объекты не только при абсолютной нуле, но и при давлениях $1 \cdot 10^{-6}$ мм рт. ст. Камеры тепла, холода и избыточного давления, нагнетающие до 1 500 мм рт. ст. и более, наоборот, могут позволить изучать процессы во внеземных условиях, а также при стадиях первичного формирования планет, когда при высоких температурах, высокой плотности минеральной материи и метеоритных бомбардировках давление может возрастать.

Также следует отметить, реакторы высокого давления, позволяющие производить обработку водными и неводными растворителями при высоких давлениях и температурах, а также гидро- и сольвотермальный синтез. Преимуществом данных реакторов является возможность перемешивания реакционной среды, отбор проб, создание инертной атмосферы и возможность контролировать давление, температуру и скорость вращения мешалки. Из недостатков следует отметить слишком высокие градиенты давлений (до 200 бар) и температур, закладываемых производителями, в связи с чем необходимо выбирать оптимальные величины. Ещё одним недостатком является один способ механического перемешивания — мешалка, а для инвариантности организации и самоорганизации протобиологических молекул необходим более широкий спектр механизмов и режимов перемешивания, таких, какие создают, например, вихревое течение, шейкер, центрифуга и т. д. Также в моделях Berghof BR отсутствует возможность облучения видимым и ультрафиолетовым спектром излучения.

Традиционно более широко распространённые климатические камеры позволяют работать только с диапазоном температур и влажности. Вместе с тем перчаточные боксы дают возможность заполнять резервуары для экспериментов с различной газовой средой. Среди газов, применяемых в перчаточных боксах, используют N_2 , Ar, He, H_2O , H_2 . Однако не во всех боксах можно создавать

газовую смесь и применять различные виды газов. По такому же принципу работают газовые инкубаторные системы, позволяющие содержать внутри один из видов газа, отличный от атмосферного, например CO₂-инкубатор.

Специальные приборы для создания биологических полимеров, такие как гибридайзеры, пептидные синтезаторы, включают комплектацию специальных перемешиваемых, качающихся и вращающихся устройств, однако их недостатком является наличие мембран, препаратов и твёрдых носителей, предназначенных для уже известных, изученных биомолекул из живых систем. Но в направлении исследований по искусственному получению протобионтов необходима работа с новыми биомолекулами и получение этих биомолекул.

Гибридайзеры предназначены для гибридизации нуклеиновых кислот — соединения двух комплементарных цепочек ДНК и РНК. При этом степень комплементарности также может быть различной. Использование праймеров в методах ПЦР позволяет получать уже достаточно разнообразные фрагменты молекул нуклеиновых кислот.

В направлении протеомики пептидные синтезаторы позволяют получать достаточно широкие варианты различных пептидов. Однако, как упоминалось выше, универсальных сред для соединения геномного и протеомного материала, подобного живой клетке, пока нет. В этой связи ещё одним логичным путём является создание искусственной среды, подобной той, что содержится внутри живой клетки. До сих пор природные живые клетки организмов являются средой для различных молекулярных биотехнологий.

Таким образом, различные виды камер позволяют решать узкие задачи. Например, варьировать параметрами температур, влажности, давления и излучений, но не изменять состав газовой или жидкой среды. Подобным образом специальные боксы и инкубаторы позволяют создавать отличную от земной газовую среду, но не позволяют варьировать параметрами температур, давлений и перемешиваний. Следует отметить, что ни один из приборов не позволяет увеличивать или снимать фоновые параметры магнитного поля Земли. Гибридайзеры и пептидные синтезаторы позволяют перемешивать среду, но работают в узком диапазоне температур и других показателей среды.

Для более широких экспериментов с протобиологическими

молекулами и биологическими полимерами, а также клетками организмов нами была разработана модель прибора, позволяющего изменять параметры среды в части газового состава, температур, магнитного поля и электромагнитных излучений при различных типах перемешивания (шейкер, вортекс, магнитная мешалка). Термическая составляющая позволяет создавать более высокие температуры для сжигания органики. Использоваться могут различные смеси и соотношения органических молекул, а также со временем минеральных частиц. Современные аналитические методы позволяют устанавливать степени влияния долей различных компонентов и факторов среды на различные типы самоорганизации. Этот прибор позволит моделировать процессы, происходящие на ранних стадиях формирования планет и Земли, в частности, а также создавать неравновесные условия среды, приближённые к абиогенезу.

Научно-исследовательский комплекс «Климатический биореактор» предназначен для проведения опытов с биоматериалом в замкнутой полости с контролируемым микроклиматом и атмосферой (заданный состав смеси газов, заданные температура и давление, возможное воздействие излучения различных типов). Допускается использование следующих газов: O_2 , CO_2 , CH_4 , Cl_2 , NH_4 , H_2S , H_2 . Возможно применение холодильной установки для получения отрицательных температур в реакторе (табл. 4).

Комплекс состоит из следующих основных узлов и блоков:

- 1) биореактор;
- 2) блок нагрева биореактора;
- 3) блок подачи и сброса газов;
- 4) блок вакуумирования;
- 5) блок управления и контроля параметров.

Биореактор представляет собой герметичную ёмкость из нержавеющей стали со съёмной крышкой с устройством запирания (рис. 71). На крышке расположены диоптры для наблюдения, видеофотосъёмки и облучения биоматериала. Кроме этого, имеется центральная съёмная фланцевая крышка для возможного монтажа механической мешалки. На крышке также расположены мановакууметр для визуального контроля давления в реакторе и биметаллический термометр для визуального контроля температуры в реакторе, они необходимы для дублирования основных измерительных датчиков в случае отключения электропитания и обеспечения безопасности испытаний (табл. 4). Через штуцеры

Таблица 4

Основные технические характеристики комплекса «Климатический биореактор»

Характеристика	Ед. изм.	Значение	Примечание
Рабочая ёмкость реактора	л	6	Объём цилиндрической части
Внутренний диаметр цилиндрической части ёмкости реактора	мм	200	
Внутренняя высота цилиндрической части ёмкости реактора	мм	200	
Рабочее давление в полости реактора	МПа (изб.)	–0,01...0,3	
Минимальная рабочая температура в реакторе	°С	+5	Определяется температурой в помещении
Максимальная рабочая температура в реакторе	°С	+200	
Количество каналов подвода газа	шт.	3	Возможно больше 3
Мощность электронагревателя	кВт	1	

в крышку заведены два датчика температуры, которые измеряют температуру в реакторе на различных высотах над уровнем дна ёмкости. Также на крышке расположены разъёмные штуцерные соединения для подключения трубопроводов блока вакуумирования и блока подачи и сброса газов.

Блок нагрева биореактора выполнен в виде открытого сверху цилиндра с нижними опорами, имеющего электрический нагреватель по цилиндрической части с наружной теплоизоляцией (рис. 71). Снизу имеется дно из немагнитного неметаллического теплоизоляционного материала, через которое можно осуществлять магнитное воздействие на содержимое биореактора для перемешивания биоматериала магнитной мешалкой. Биореактор устанавливают в блок нагрева так, чтобы его днище соприкасалось с дном блока. Это обеспечивает простой монтаж и демонтаж устройства, что упрощает его обслуживание, загрузку и очистку.

Блок подачи и сброса газов в биореактор состоит из нескольких идентичных модулей наполнения газа (в нашем случае три модуля), с помощью которых в биореактор подаётся заранее заданное количество газа того или иного типа (рис. 71). Модуль состоит из ресивера заданного объёма, электроклапанов наполнения ресивера и напуска в реактор, обратного клапана, запорного вентиля ресивера, датчиков давления и температуры в ресивере. Газ известного типа наполняет ресивер; после временной выдержки

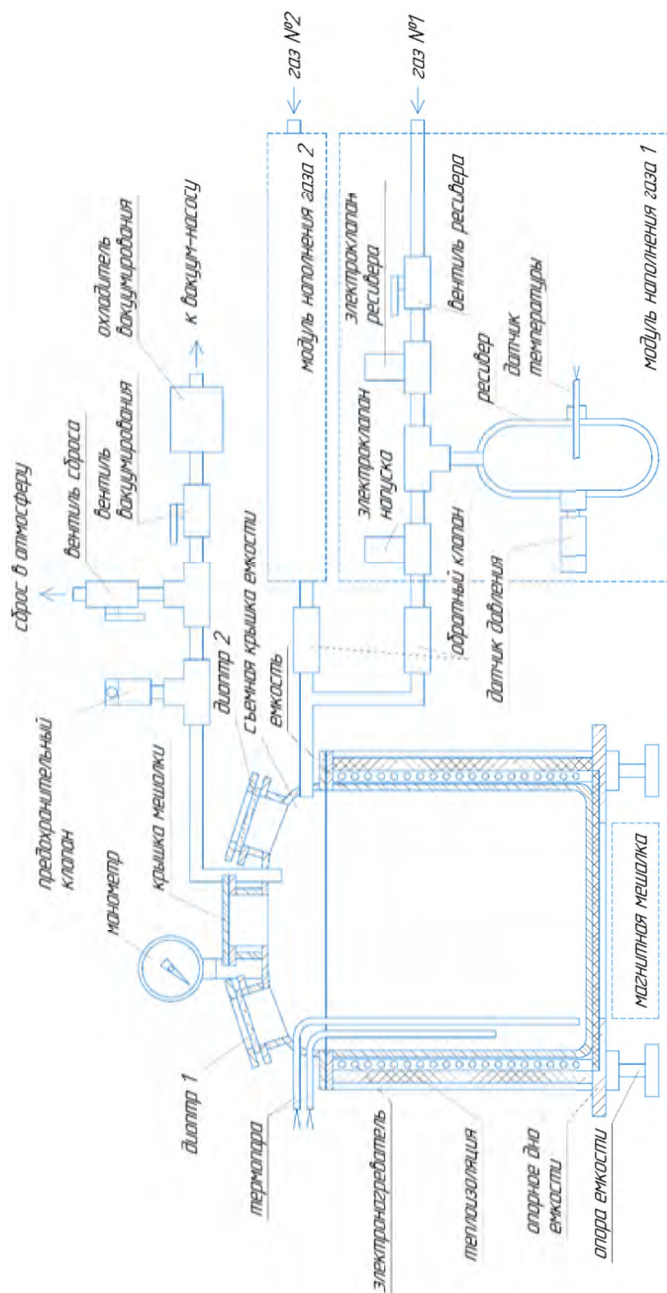


Рис. 71. Схема «климатического биореактора»

для стабилизации термодинамических параметров газ при помощи клапана напуска подаётся в биореактор, при этом по падению давления в ресивере определяется количество поступившего в реактор газа (по уравнению состояния газов). Кроме этого, имеется клапан для подачи воздуха из атмосферы после проведения исследований и предварительного вакуумирования ёмкости.

Блок вакуумирования необходим для создания разрежения в реакторе и получения в дальнейшем заданного состава атмосферы в реакторе. Он состоит из вакуумного насоса, охладителя вакуумирования и запорной арматуры (рис. 71). Кроме этого, имеется предохранительный клапан для аварийного сброса газа из реактора в атмосферу при критическом превышении давления. Охладитель необходим для охлаждения газа, откачиваемого из реактора при помощи вакуум-насоса, чтобы последний не вышел из строя.

Блок управления и контроля параметров служит для автоматизации процессов испытаний, контроля и записи параметров испытаний и обеспечения безопасности работы биореактора (рис. 71). Основу блока составляет контроллер управления с сенсорным дисплеем, на котором отражаются основные параметры испытаний, а также имеются кнопки и регуляторы для настройки параметров проводимых испытаний. Кроме этого, имеется модуль управления нагревателем, модуль управления вакуум-насосом и опционально модуль управления холодильной установкой.

Опционально в комплекс может входить холодильная установка, которая позволит проводить испытания при пониженных и отрицательных значениях температуры в биореакторе. В состав холодильной установки входят холодильный агрегат компрессорного типа, циркуляционный контур теплообменника для передачи тепла от хладагента к антифризу и блок охлаждения реактора, который представляет собой конструкцию по типу блока нагрева биореактора, в котором электронагреватель заменён на рубашку охлаждения с циркулирующим по ней охлаждённым антифризом (рис. 71).

Климатический биореактор при дальнейшей проработке и проверке эксплуатации позволит решать следующие задачи:

1. Интенсифицировать получение данных, их обработку и возможность работать как с отдельными молекулами, так и ансамблями в широких градиентах условий среды, приближённых к различным типам геосфер планет.
2. Получать новые биоорганические молекулы для решения

проблемы абиогенеза и отслеживать биохимические реакции самоорганизации.

3. Исследовать молекулярные механизмы организации и развития жизни: возникновение биохимического гиперцикла, возникновение полимеров нуклеиновых кислот, протоклеток и клеточного гомеостаза, каталитических систем, гомотеральности молекул, построение нуклеотидов, белковых комплексов и порфириновых гемов.

4. Изучать условия и особенности протекания различных гиперциклов и автоколебательных процессов, обеспеченных колебаниями условий среды.

5. Моделировать и экспериментально апробировать различные пути возникновения жизни и определять условия среды, обеспечивающие данные процессы.

6. Оптимизировать поиск состояний среды для увеличения эффективности получения данных.

7. Готовить специализированные формы биоты в виде отдельных видов и биоценозов, функционирующих в экстремальных условиях среды.

8. Проводить направленную подготовку биоты и создавать биомы, функционирующие в средах, сходных с поверхностью других планет, отличающихся от Земли.

ГЛАВА 3

О создании новых форм жизни на других принципах и иной материальной основе

Учитывая рассмотренные возможности и факты искусственного получения практически всех молекулярных структур жизни и органелл, следует рассмотреть варианты получения других форм жизни — на другой материальной основе и других принципах самоорганизации и саморазвития. То есть эксперименты с другими по функционированию нуклеотидами и соответствующими молекулярными блоками.

Одним из путей является получение жизни с другой, обратной хиральностью в противовес современным формам. Из этого направления вытекает создание жизни на базе совсем другой симметрии и организации таким образом, чтобы современная жизнь никак, структурно и функционально, не взаимодействовала с современной жизнью.

Вторым путём является получение жизни с иной дискретностью — это обратимая жизнь, способная делиться вечно и не стареть, то есть континуальная жизнь.

Третий путь, вытекающий из второго, подразумевает создание жизни только с горизонтальным переносом генов, то есть абсолютно континуальную материю. В этой проблематике проблема возникновения жизни будет вбирать в себя проблему старения.

Четвёртым направлением является создание жизни с более быстрым метаболизмом и частотой эволю-

ционных переходов. Это направление подразумевает изменение степени бифуркации в эволюционных переходах и изменение качества стабильности устойчивых наследственных форм.

Пятое направление охватывает создание жизни на другой материальной основе — из сочетаний других элементов, других нуклеотидов, других полимеров, другом генетическом коде.

В методологическом аспекте необходимо рассмотреть все фундаментальные свойства всех форм материи применительно к живой материи: аспект организации материи, её энергетическую и информационную сущность, а также дискретности и континуальности при построении новых форм материи на биологическом принципе. Это наиболее общие направления в моделировании и искусственном построении материи. Рассмотрим конкретные примеры и ключевые аспекты.

Методические, методологические и практические направления для создания полностью искусственных и автономных форм жизни требуют создания фабрики, завода, производства и академического института с соответствующим направлением, как это реализовывалось в СССР. На сегодняшний день жизнеспособным вариантом является распределение функций между различными международными научными учреждениями, где в отдельной специализированной лаборатории производят определённые по функционалу молекулы или органеллы. При этом все методические и методологические аспекты по данному направлению, в том числе санитарные, должны быть стандартизированы. На практике в настоящее время в отдельных лабораториях реализуются элементы данного подхода, однако нет общих задач и целей для реализации широко структурированных и дифференцированных решений по созданию различных форм искусственной жизни. При этом практика показывает, что для решения таких специфичных и одновременно глобальных задач необходима локализация всего пула экспериментально-исследовательского оборудования в одном месте. Это значительно ускоряет процесс и позволяет получать более эффективные результаты.

Одним из ограничителей создания данного целостного направления являются биоэтические вопросы. В связи с этим научное сообщество доисследует естественные процессы и пытается реконструировать их историю в части первых молекулярных предпосылок возникновения жизни. Вместе с тем следует отметить, что на сегодняшний день технические возможности и фактические

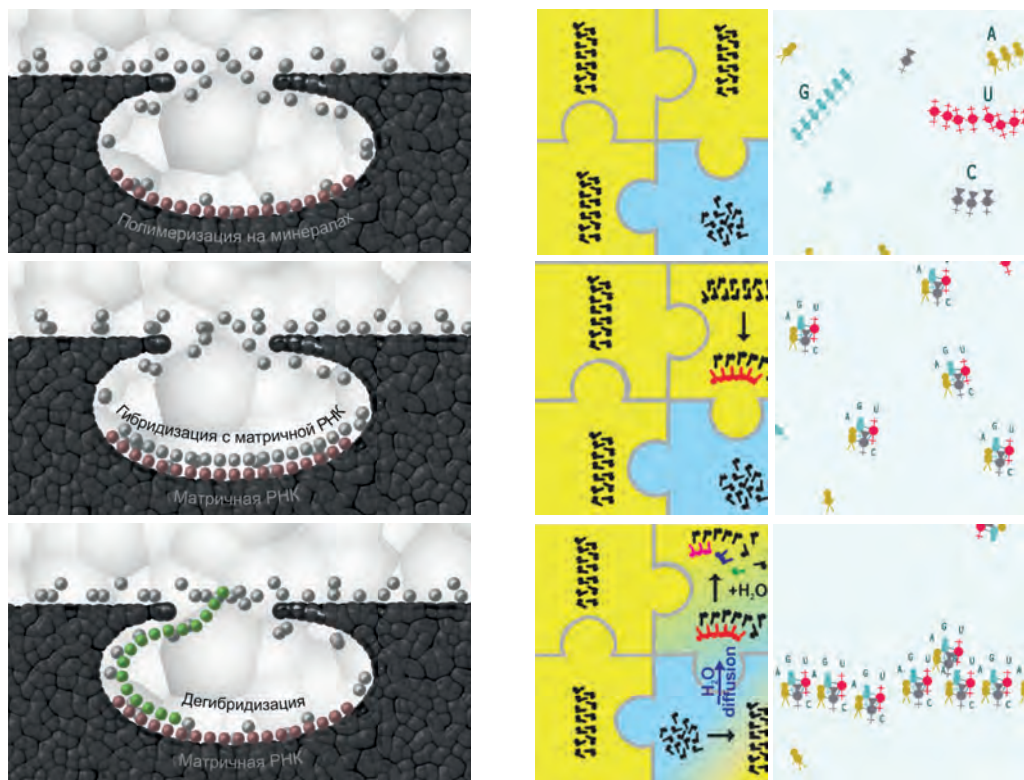
исследования затрагивают только молекулярный уровень и редко клеточный для построения новых жизненных принципов, например использование других нуклеотидов, а ключевым является то, что при построении новой материи, сильно отличной от живой, к ней уже не могут быть применимы биоэтические нормы, разработанные непосредственно для существующей формы жизни.

Первичной задачей является создание специальной линейки приборов. Некоторые из них рассмотрены нами в предыдущей главе. Вторым этапом является создание специальных сред для получения и воспроизводства дискретных элементов жизни (рис. 72), в том числе с первичного разобъённого пула протобиологических элементов. Один из возможных путей — это создание сред, позволяющих поддерживать необходимую периодичность в симметрии и асимметрии материи при соответствующей обратимости.

Для создания данных систем необходимы условия среды для одновременного синтеза и взаимодействия нескольких полимеров, то есть необходимо создание системы проточных инкубаторов с разными по уровню фильтрами для запуска систем гиперцикла и протометаболизма.

Одна из главнейших задач при конструировании аналогов молекулярных систем, подобных биологическим, — это создание сред, способных поддерживать как сохранение, так и развитие этих молекулярных комплексов в виде автоколебательных реакций или реакций гиперцикла. В первую очередь необходимы среды для поддержания таких простых молекулярных систем, как полимеры из одного или двух нуклеотидов, или систем, способных поддерживать постоянство или баланс с растущим количеством порфиринов, или систем, создающих стабильные по размеру, форме и функционалу липосомы и везикулы. То есть ключевым при создании принципиально новых форм жизни или материи, подобной живой, является подготовка всех атрибутов среды как на глобальном, так и на микроуровне. Актуальность ведущей роли среды и уникальности условий для возникновения жизни находит понимание у всё большего числа специалистов, занимающихся проблематикой возникновения жизни [68].

Для подбора оптимальных свойств среды и создания разных форм дискретности при самоорганизации материи необходим балансовый подход в отношении подключения исходных компонентов среды. Взаимодействие между разными по длине



В порах минералов
На поверхностной плёнке

Рис. 72. Развитие нуклеиновых кислот на минералах и на поверхностной плёнке [по 62; 143]

биополимерами определяется их долями в среде и другими ме-
ханохимическими взаимодействиями в виде баланса, например
распад на отдельные нуклеотиды, аминокислоты, моносахариды
и т. д. Это важный аспект для определения особенностей полиме-
ризации и распада многокомпонентных сред, осуществляющих
при этом эти функции на расстоянии друг от друга.

В связи с этим необходимо учитывать многофакторные ме-
жмолекулярные взаимодействия, навязанные как самой мо-
лекулярной средой, так и внешней. Вторым важным аспектом
является постановка системы неравновесного баланса, чтобы
в ходе взаимодействия двух компонентов появлялся третий
компонент, так или иначе связанный с двумя предыдущими.
То есть система баланса должна лежать в изолированной систе-
ме метаболизма и гиперцикла. Необходимо найти симметрию
в бинарных балансах полимеров, например баланс нуклеиновых
кислот и белков, сахаров и жиров, как это было реализовано в
нашей жизни при её возникновении (рис. 73), например
нуклеиновых кислот с белками или нуклеиновых кислот с
липидами. То есть необходимо найти небιологические аналоги
функционально связанных полимеров, отличающихся по
хиральности или векторам метаболизма. При этом в данном
балансе должен возникать третий вектор в виде образующихся
продуктов и энергии. Например, при взаимодействии нуклеино-
вых кислот и белков образуются сахара. Сахара в данном случае
являются третьим вектором, который накапливается. К этому
третьему вектору в виде сахаров добавляем функционально
связанную с ним пару по метаболизму, хиральности и другим
параметрам, например в виде углеводов или липидов. Эта
функционально связанная пара должна быть организована та-
ким образом, чтобы продуктом её взаимодействия был третий
вектор, например ациклические углеводороды. Далее к ацикли-
ческим углеводородам находится аналогичная комплементарная
пара. То есть создаётся баланс из трёх типов полимеров: к двум
парным добавляются дополнительные полимеры, сопряжённые
по метаболизму. Например, к жирам добавляем дополнительный
полимер, и идёт дальнейшее метаболическое и эволюционное
развитие. При этом каждая новая пара, присоединённая к двум
предыдущим, должна быть связана с ней и метаболически в виде
гиперцикла, то есть обладать пространственно-временной дис-
кретностью.

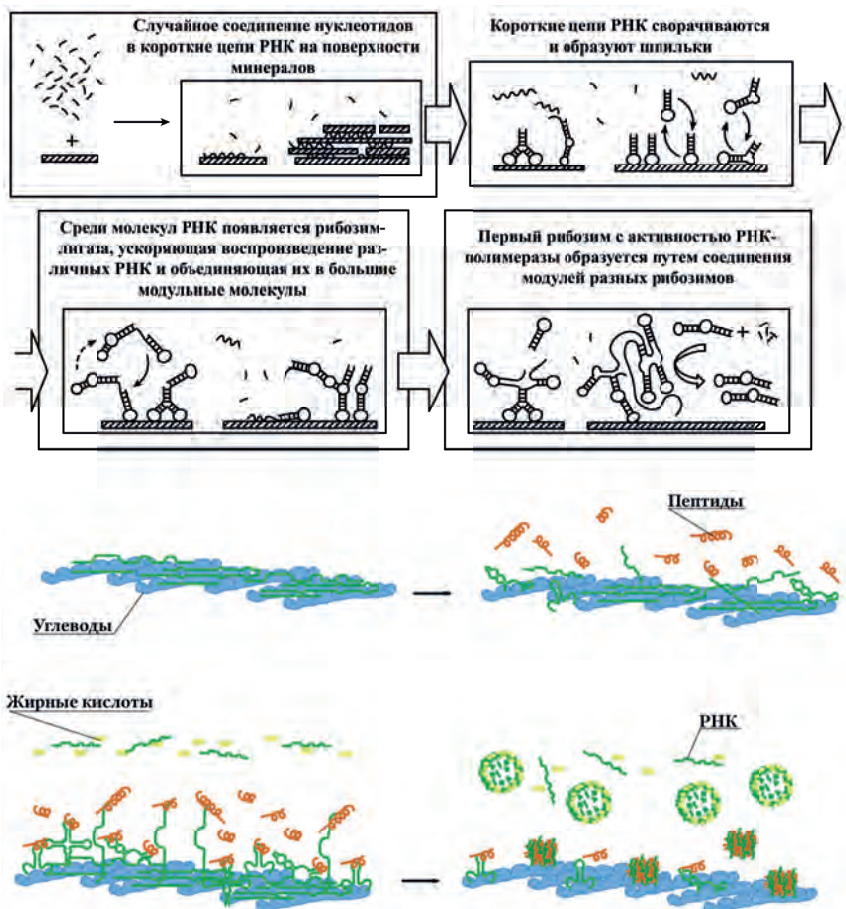


Рис. 73. Последовательные стадии развития рибозима-полимеразы через сообщество рибозимов-лигаз [73; 134]. Б – наша модель взаимодействия РНК с другими биологическими полимерами

В современных условиях жизни основа построена из нуклеотидов с двумя антагонистами из правых сахаров и левых аминокислот. Здесь важно отметить, что третий вектор или образующийся продукт может быть не только в виде полимеров, но и в виде мономерных смесей, но в этом случае он должен быть локализован и изолирован в среде, например в виде клеточной оболочки, или другом компартменте. При этом в дальнейшем функционале у этого мономерного продукта должна быть способность полимеризоваться и в лучших случаях самокопироваться.

Таким образом, создавая дополнительные пары к двум предыдущим для изучения особенностей усложнения самоорганизующейся системы, необходимо подбирать такое же сопряжённое функциональное взаимодействие между двумя парами. При присоединении к двум парам третьей пары необходимо также подбирать условия взаимодействия: метаболические, энергетические, хиральные и т. д. Это позволит изучать пределы сложности самоорганизующихся живых систем и получать соответствующие искусственные системы. Есть все основания полагать, что данная механика позволит получать новые самоорганизующиеся системы из небиологических молекул и полимеров.

В ближайшем будущем самым интересным и перспективным направлением является создание более быстро развивающихся и более разнообразных живых систем. Для этого имеются теоретические и экспериментальные предпосылки. Ранее нами рассматривалось одним из наиболее перспективных направлений изучение степени неупорядоченного развития двухкодовых олигонуклеотидов. Так, моделирование продемонстрировало, что РНК-молекула с двумя типами оснований характеризуется большим разнообразием вариантов сворачивания в шпильчатые структуры, чем с четырьмя основаниями, способными образовывать одну или две устойчивые структуры [21; 196; 197]. Рибозимы из РНК с двумя основаниями также возникают реже, и их эффективность ниже, чем у рибозимов с четырьмя основаниями [73].

Для проверки этих моделей необходима практическая реализация возможности создания жизни с другими скоростями метаболических реакций, системами копирования и неустойчивыми формами сворачивания полимеров на основе двухбуквенного набора нуклеотидов. То есть более быстрых и, наоборот, более медленных в части различного функционала. Более неупорядоченных и более выверенных. Это позволит проверить, к чему приведёт

рост количества вариантов сворачивания в шпилечные структуры и каким будет переход в новое качество при накоплении большого разнообразия разных типов сворачивания.

При отсутствии возможностей для стабилизации новых качеств может быть использован путь добавления необходимых условий среды для стабилизации неустойчивых вариантов развития. Построение самокопирующихся и развивающихся систем, развивающихся более неупорядоченно и более быстро, позволит ответить на ряд более фундаментальных и глобальных вопросов. В частности, оценить степень возможности преодоления тепловой смерти биотой путём связывания ею абиотического пространства вселенной. Или вопроса практического применения более быстрого развития биоты в ходе космических путешествий или, наоборот, более замедленного развития.

Создание быстро развивающихся форм жизни очень важно для различных экспериментов. Создание жизни с разными степенями неравновесности, быстро и бесконечно меняющейся, также важно в первую очередь для фундаментальных вопросов. Обратное направление тоже имеет большой практический потенциал — создание более выверенной жизни — работающей, как машина с высокой точностью, где анаболизм равен катаболизму. Эту форму можно назвать «стационарной жизнью».

Для ближайших экспериментов наиболее интересны и актуальны быстро метаболизирующаяся и развивающаяся жизнь — это удобно для отслеживания различных функций, а также наиболее неравновесная жизнь, не имеющая вектора или, наоборот, очень сильно отклоняющаяся от нормы. Это необходимо для изучения прогноза развития материи, путей её развития, до которых ещё не дошла сама эволюция с её отдельными блоками в виде живых организмов, также для изучения пределов устойчивости живых систем и их целостности.

В части создания более выверенных форм жизни и более неустойчивых следует рассмотреть следующие направления. На сегодняшний день наиболее перспективными являются эксперименты с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами и их аналогами с большим размахом вариабельности трёхмерной укладки этих полимеров и конформаций. Дальнейшее развитие данного направления позволит сильно ускорить получение данных о пределах выверенности и неустойчивости мира нуклеиновых кислот.

Вторым направлением является экспериментальная линия с ограниченным и несимметричным числом мономерных звеньев — двумя и тремя нуклеотидами и их аналогами [164; 167; 209; 210]. В этой экспериментальной линейке должно быть заложено исследование всех функциональных свойств полимера с чётным количеством букв — 2, 4, 6, 8 — и нечётным количеством букв или мономерных звеньев — 3, 5, 7, 9. Третьим направлением является одновременное культивирование нескольких биополимеров с нечётным количеством азотистых оснований или букв в фазах синтеза в стационарном состоянии. Например, биоорганических кислот с 3, 5, 7, 9 разными видами азотистых оснований и их аналогов. Параллельная экспериментальная линейка должна состоять из чётного количества полимеров биоорганических кислот с 2, 4, 6, 8, 10 азотистыми основаниями или буквами, для выяснения возможных пределов взаимодействия и сосуществования с выявлением особенностей вытеснения и самоограничения. Таким образом, экспериментальные направления должны состоять из параллельного культивирования и синтеза полимеров с чётным и нечётным количеством комплементарных звеньев в виде нуклеотидов или их аналогов.

Ещё одним направлением является создание полимеров с заданной частотой возникновения отличающегося мономерного звена. Например, чтобы новое мономерное звено в полимере возникало через каждые 4, 5, 6, 10 звеньев и т. д. Эти полимеры могут быть получены как искусственным путём в ходе встаривания инородных мономеров в цепочку, так и естественным экспериментальным путём. Например, периодическое закидывание отдельных отличающихся нуклеотидов в среду с нуклеиновыми кислотами на основе двух оснований (двухкодовых нуклеотидов) и одного основания. И проверка возможностей встраивания новых нуклеотидов в одноцепочечные и двуцепочечные полимеры путём создания дефицита питательной среды в виде отдельных звеньев.

Ещё одним направлением является создание таких форм циклических и других РНК-полимеров с разным количеством оснований и подобных им искусственных биополимеров, чтобы они были не ограничены комплементарностью при разных типах сворачиваний и зацеплений. Нарушение комплементарности естественной жизни наблюдается в некоторых вирусах, РНК-термометрах и других кольцевых РНК [129]. То есть необходимо получение полимеров, способных создавать пары друг с другом

в любых местах. Это позволит создавать из них более разнообразные формы, на порядки большее количество вариантов шпилек и способов укладки и изучать функциональные возможности жизнеспособных биополимеров [90].

При возникновении различных по степени упорядоченности глобул должна изучаться их структура. Помимо снятия помех в виде комплементарности или создания заданной комплементарности путём встраивания иных нуклеотидов в заданных участках полимера, необходимо создание специальных условий среды для сворачивая в функциональные клубки. Для этого, помимо введения в среду специальных малекулярных катализаторов, активаторов, необходимо применение спектра электромагнитных воздействий и упругих механических манипуляций для проверки всех факторов среды на типы сворачивания и соответствующей самоорганизации полимеров.

Эксперименты с двухбуквенными кодами со множеством вариантов сворачивания, большим количеством букв в коде (6–8), эксперименты с полимерами, не ограниченными комплементарностью при копировании материала, и возможности создания различных трёхмерных структур укладки позволят значительно изменить функциональный потенциал нуклеиновых кислот. В частности, в живой материи это позволит создать функциональные формы без вертикального переноса генов, соединяющиеся между собой в любой момент времени при подходящих условиях среды, то есть биоту, функционирующую посредством только горизонтального переноса генов. В этом случае может быть реализована «дарвиновская интерлюдия» по Фриману Дайсону, когда будет преодолен молекулярно-генетический и метаболический обмен между прокариотами и эукариотами, то есть появится возможность преодолевать вертикальный перенос генов и биота разных уровней организации сможет обмениваться почти любыми компонентами.

Некоторые биотехнологические молекулярные механизмы в современной практике для этого имеются. Но полная реализация «дарвиновской интерлюдии» может быть реализована только при преодолении «пределов Хайфлика» в виде ограничения клеточных делений, когда будет поставлена техника связывания хромосом и всего хромосомного аппарата.

Связь проблемы старения или необратимости развития жизни проявляется на фазе создания молекул, способных соединяться

в циклические реплицирующиеся системы. Такие системы известны на молекулярном уровне и хорошо проявлены в прокариотическом мире или онкогенном мире. В этом аспекте видятся возможности естественного соединения хромосом, функциональной замены теломер и всего теломеразного аппарата. Одним из путей является освоение техник управления онкологическими клетками с возможностями изменения их тканевого функционала и контроля окружающей межклеточной средой. Способность онкологических клеток бесконечно делиться может в будущем открыть технические пути преодоления проблемы старения.

Абсолютно континуальная жизнь, соединяющая между собой любые другие элементы собственной материи, может быть реализована другим путём, посредством преодоления клеточной дискретности. В этом случае развитие материи будет происходить в условиях бесклеточной среды: в полисахаридном и полипептидном матриксе, жидкости и других континуальных средах.

Некоторые элементы сегодня уже реализуются, например, при выращивании молекулярных колоний на гелевой питательной среде. Вариант развития диверсификации имеющегося биологического материала по Фриману Дэйсону может быть реализован по рассмотренным нами выше средовым компартментам в виде клеточных сред. Для этого происходит создание искусственных сред в виде искусственных клеток и оболочек клеток, в которых можно вести биотехнологии, и продажа этих оболочек и органелл в отдельности от генетического и протеомного материала для дальнейших экспериментов не только исследователями, но и массовыми пользователями — селекционерами, генетиками.

Последовательным этапом является создание или реконструкция живых систем с внедрением внутрь метаболизма ещё большего количества химических элементов и большего количества агрегатных фаз. Оптимальным пиком данного функционала является включение в метаболизм всех элементов планеты. До настоящего времени взаимодействие и использование не включённых в метаболизм живых систем химических элементов поддерживается искусственным способом в виде инструмента технической культуры. Возникновение материи, способной использовать не только весь спектр элементов среды и агрегатных состояний, но и физических органов, реализующих воздействие на расстоянии, в качественно других масштабах, позволит в другом качестве изменять окружающую среду. Это откроет способность материи

разделяться на отдельные элементы и соединяться при возникновении в среде специальных условий. Это футурологическое направление является продолжением ноосферной идеи развития материи или материи с общей нейросистемой [24].

На сегодняшний день у биоты воздействие физическими полями на объекты посредством механических или электромагнитных волн осуществляется для решения узких задач, в большей части связанных с питанием. Примером могут служить электрические органы у рыб или флуоресценция у беспозвоночных. Аналитические аппараты, такие как органы слуха, зрения, сенсоры магнитных полей, выполняют функции коммуникаций, в то время как сами функции размножения осуществляются посредством только прямых контактов живых организмов (если не принимать во внимание митогенетические эффекты, влияние которых незначительно [18; 19; 39; 40; 131].

Преодоление ограничения живых систем копировать себя только прямым механическим путём также является новым качественным переходом. Здесь следует обратить внимание на то, что существующая на Земле биота имеет ряд инструментов для изменения ряда качеств среды на расстоянии, после чего эта изменённая среда в дальнейшем используется биотой. До появления человека большую часть трансформации среды биота производила химическим и механическим путём, без дистанционного воздействия физическими полями. Так эволюционно сложилось, что физические дистанционные поля использовались для коммуникаций. В части материальной основы вновь создаваемой материи следует отметить следующее. Жизнь на другой материальной основе рассматривалась неоднократно в космической биологии в части внеземной жизни, например на основе кремния, фосфора и других элементов. На примере имеющейся живой материи очевидно, что такая сложная форма материи, как биота, может полноценно возникать и функционировать только на базе нескольких химических элементов, несмотря на то, что ключевым является углерод. Построение сложных по функционалу полимеров обязывает вовлекать другие элементы, и по мере усложнения и формирования органелл или энергетических молекул, таких как порфириновые гемы, количество вовлекаемых в жизнь элементов неуклонно растёт. Поэтому построение новой материи, подобной жизни, на основе другого химического элемента потребует больших поддерживающих средовых факторов для её саморазвития.

И при замене на другой элемент, являющийся основой полимеризации, необходимо будет присоединение в мономерные звенья других элементов. В практическом плане полимеры необходимо экспонировать и испытывать в таких средах, чтобы они создавали сложные цепочки, не описываемые в природе ранее. Это позволит создавать новые биологические структуры, способные эффективней использовать среду.

Второй путь — это захват биополимерами микроэлементов по типу гемов и хелатов с образованием кристаллических и поликристаллических, возможно, синтетических структур. Это также позволит эффективней взаимодействовать со средой. Такой путь будет являться аналогом культурной среды, использующей небиологическую, абиотическую природу, но с применением естественных метаболических циклов. Это могут быть суперупакованные трёхмерные структуры или нити/цепочки, имеющие на концах информационные и индикаторные центры для соединения и отслеживания в среде соответствующих им для взаимодействия других цепочек или активных центров молекул по типу «ключ—замок».

Ещё одним важным аспектом является взаимодействие разных видов материи биологического типа и возможности создания для них изоляции в развитии. Необходимо создать условия в имеющейся живой материи или новой модернизированной материи, в том числе искусственно полученной для возникновения на её базе новой ещё более тонко организованной материи, с последующим отделением от основной материи метаболически, как, например, было реализовано появление полипептидных и полисахаридных полимеров на нуклеиновых кислотах. Но при этом новая форма материи, возникшая на базе старой, должна быть способна к самовоспроизводству. Для этого необходимы эксперименты с совместным сосуществованием жёстких и мягких супрамолекулярных полимеров в питательных средах. Это поможет исследовать характер и возможности возникновения новых, более тонких материй на базе консервативных, более выверенных. В том числе в ходе коэволюции двух разных типов полимеров.

Здесь могут наблюдаться два пути. Первый — это естественное возникновение новой материи на базе имеющейся живой при создании специальных для этого условий. Второй путь — это искусственное создание новой материи при её воспроизводстве через посредника в виде человеческой культуры. Во втором случае так-

же оптимальным является создание искусственных сред, реализованных посредником с последующим их изучением и внедрением в естественные циклы геосферы и биосферы. Апробацией для воспроизводства новых материй могут служить как искусственные условия в соответствующих инкубаторах в условиях Земли, так и естественные условия других планет, при дальнейшей панспермии этих планет и терраформировании.

На экспериментально-теоретическом этапе также должны быть разработаны разные варианты взаимодействия двух и более материй друг с другом, включая имеющуюся на Земле форму биоты, с последующим выявлением свойств и получением неконкурирующей материи с уже имеющейся биотой или другой искусственно полученной самоорганизующейся формой материи. То есть создание жизни с внутренними и внешними барьерами в противовес континуальной жизни с горизонтальным переносом генов.

Земная биота в процессе эволюции не раз создавала барьеры в развитии жизни, увеличивая её необратимость согласно закону Долло [145] в виде вертикального переноса генов или нервной системы, существующей с рядом фильтров и осуществляющей дополнительные функции управления и перераспределения энергетических потоков. Изолированные формы биоты и аналогичной ей материи необходимы для ряда не только этических, но и санитарных и энергетических норм в части сохранения лимитов на ресурсы среды. В этом случае помимо изолированных «временно» стерильных лабораторий могут быть рассмотрены пока не эксплуатируемые подземные резервуары в виде линз, неиспользуемых толщ осадков, в которых наряду с имеющимися анаэробными изолированными ценозами могут быть запущены иные по функционированию искусственные экосистемы.

Список литературы

1. Абашкин, Д. Наночастицы — инструмент адресной доставки лекарств / Д. Абашкин. — URL: <https://share.google/LwDYeNcnrOyoyQrxz>
2. Абиогенный синтез предбиологических веществ под воздействием факторов космических полётов / М. А. Хенох [и др.] // Биологические исследования на орбитальных станциях «Салют». — М., 1984. — С. 21–25.
3. Авсюк, Ю. Н. Широтная зависимость областей осадконакопления как проявление хода приливной эволюции системы Земля — Луна — Солнце / Ю. Н. Авсюк, Ю. С. Генштафт, А. Я. Салтыковский, З. П. Светлосанова // Доклады Академии наук. — 2005. — Т. 402, № 5. — С. 643–646.
4. Андронов, А. А. Пределные циклы Пуанкаре и теория колебаний // VI съезд русских физиков (Москва, Н. Новгород, Казань, Саратов, 5–16 августа 1928 года) : перечень докладов с кратким содержанием. — М. ; Л. : Гос. изд-во, 1928. — С. 23–24.
5. Аристовская, Т. В. Микробиология подзолистых почв / Т. В. Аристовская. — М. ; Л. : Наука, 1965. — 187 с.
6. Аристовская, Т. В. Микробиология процессов почвообразования / Т. В. Аристовская. — Л. : Наука, 1980. — 187 с.
7. Афонников, Д. А. Адаптация к бездне / Д. А. Афонникова // Химия и жизнь. — 2010. — № 3.
8. Байклз, Н. Целлюлоза и её производные. Т. 2 / Н. Байклз, Л. Сегал. — М. : Иностранная литература, 1974. — 510 с.
9. Бакиров, А. В. Самоорганизующиеся макромолекулярные системы на основе секторообразных производных бензолсульфоновой кислоты : автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук / А. В. Бакиров. — М., 2010. — 22 с.
10. Барабанова, А. И. Нанокмпозитные гидрогели с мультифункциональными сшивками / А. И. Барабанова, А. В. Шибаев, А. Р. Хохлов, О. Е. Филиппова // Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах. — 2021. — Т. 497, № 1. — С. 33–40.
11. Бауэр, Э. С. Теоретическая биология / Э. С. Бауэр. — М. ; Л. : Изд-во ВИЭМ, 1935. — 206 с.
12. Белова, Н. А. Первичные мишени во взаимодействии слабых магнитных полей с биологическими системами : дис. ... д-ра биол. наук / Н. А. Белова. — Пушчино, 2011. — 43 с.
13. Бережкова, Г. В. Нитевидные кристаллы / Г. В. Бережкова. — М. : Наука, 1969. — 158 с.
14. Бинги, В. Н. Физические механизмы магнитобиологических явлений : дис. ... д-ра физ.-мат. наук / В. Н. Бинги. — М., 2005. — 305 с.
15. Богданов, А. А. Всеобщая организационная наука (тектология) : в 3 ч. / А. А. Богданов. — 3-е изд., перераб. и доп. — Л. ; М. : Книга, 1925–1929. — Ч. 1. — 1925. — 300 с.
16. Болдырева, Е. В. Молекулы под нагрузкой // Природа. — 2010. — Т. 6. — С. 3–12.
17. Болдырева, Е. В. Супрамолекулярные системы в экспериментальных условиях / Е. В. Болдырева // Вестник РАН. — 2012. — Т. 82, № 11. — С. 982–991.
18. Бурлаков, А. Б. Взаимодействие сверхслабых биоизлучений в развивающихся самоорганизующихся биосистемах / А. Б. Бурлаков // Ритмическая жидкостная целостность организма : сб. «МИС-РТ», № 50-1-10-12.30. — 2011. — 10 дек.

19. Бурлаков, А. Дистантные волновые взаимодействия в раннем эмбриогенезе вьюна / А. Бурлаков, О. Бурлакова, В. Голиченков // Онтогенез. — 2000. — Т. 31, № 5. — С. 343–349.
20. Вайнер, А. Я. Полифенольные производные флуоресценсодержащих порфиринов: синтез и позитивные фоторезисты для 22-нанометровой литографии / А. Я. Вайнер, К. М. Дюмаев, А. М. Коваленко, Я. Л. Бабушкин, С. А. Кричевская, Г. Р. Лубенский // Доклады академии наук. — 2016. — Т. 468, № 5. — С. 525–529.
21. Вальба, О. В. Взаимодействие молекул РНК: энергия связывания и статистические свойства случайных последовательностей / О. В. Вальба, С. К. Нечаев, М. В. Тамм // Химическая физика. — 2012. — Т. 31, № 6. — С. 23–23.
22. Вепринцев, Б. Н. О связи электрической активности нервной клетки с синтезом в ней РНК и роли клеточной мембраны в регулировании биосинтеза РНК в клетке : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Б. Н. Вепринцев. — Пушино, 1971. — 38 с.
23. Верландер, М. С. Катализаторы самополимеризации циклического 2'-3'-фосфат аденозина / М. С. Верландер, Л. Лорманн, Л. Е. Оргель // Журнал молекулярной эволюции. — 1973. — Т. 2. — С. 303–316.
24. Вернадский, В. И. Биосфера и ноосфера / В. И. Вернадский. — М. : Айрис-пресс, 2004. — 576 с.
25. Вернадский, В. И. Живое вещество / В. И. Вернадский. — М. : Наука, 1978. — 358 с.
26. Вернадский, В. И. О пределах биосферы // Изв. АН СССР. ОМОН. Сер. геол. — 1937. — № 1. — С. 3–24.
27. Волкова, Л. А. Жидкокристаллическое состояние концентрированных растворов цианэтилцеллюлозы в трифторуксусной кислоте и её смесях с органическими растворителями / Л. А. Волкова, Л. И. Куценко, О. М. Кулакова, Ю. А. Мельцер // Высокомолекулярные соединения. Б. — 1986. — Т. XXVIII, № 1. — С. 27–30.
28. Волькенштейн, М. В. Биофизика / М. В. Волькенштейн. — М. : Наука, 1988. — 591 с.
29. Вшивков, С. А. Влияние магнитного поля на реологические свойства растворов эфиров целлюлозы / С. А. Вшивков, Е. В. Русинова, А. Г. Галяс // Высокомолекулярные соединения. — 2012. — Т. 54, № 11. — С. 1596–1601.
30. Вшивков, С. А. Самоорганизация макромолекул и фазовые жидкокристаллические переходы в растворах эфиров целлюлозы / С. А. Вшивков [и др.] // Высокомолекулярные соединения. — 2011. — Т. 53, № 1. — С. 3–8.
31. Галимов, Э. М. Динамическая модель образования системы Земля — Луна / Э. М. Галимов, А. М. Кривцов, А. В. Забродин, М. С. Легкоступов, Т. М. Энеев, Ю. И. Сидоров // Геохимия. — 2005. — № 11. — С. 1139–1150.
32. Галимов, Э. М. Феномен жизни. Между равновесием и нелинейностью. Происхождение и принципы эволюции / Э. М. Галимов. — М. : УРСС, 2001. — 256 с.
33. Гараева, Л. Д. Синтез D-рибофуранозидов и 2-дезоксид-рибофуранозидов замещённых бис(индолин)фурана, пиррола и индоло[2,3-а]карбазола и изучение их цитотоксических свойств / Л. Д. Гараева [и др.] // Биоорганическая химия. — 2003. — Т. 29, № 2. — С. 181–189.
34. Гвоздев, В. А. Вариабельность гетерохроматических районов эукариотического генома в связи с их возможной биологической ролью (на примере *Drosophila melanogaster*) // Молекулярная биология. — 1993. — Т. 27, № 6. — С. 1205–1217.
35. Гинзбург, Б. М. Гелеобразование в системе поли-γ-бензил-L-глутамат-диметилформамид / Б. М. Гинзбург, Т. А. Сыромятникова, С. Я. Френкель [и др.] // Высокомолекулярные соединения. Б. — 1985. — Т. 27, № 10. — С. 747–752.

36. Гмыль, А. П. Многообразие механизмов РНК-рекомбинации / А. П. Гмыль, В. И. Агол // Молекулярная биология. — 2005. — Т. 39, № 4. — С. 618–632.
37. Горькавый, Н. Н. Базальтовые нити в пыли Челябинского болида: аналог волос Пеле / Н. Н. Горькавый, С. В. Таскаев, А. Е. Дудоров, А. В. Кочеров // Челябинский суперболид. — Челябинск : Изд-во Челяб. гос. ун-та, 2016. — С. 148–153.
38. Гостев, В. Н. Способ установки оборудования в перчаточный бокс, загрязнённый токсичными веществами : пат. RU 2611576 С1 Рос. Федерация / В. Н. Гостев, А. А. Иванов. — № 2016103520; заявл. 03.02.2016; опубл. 28.02.2017.
39. Гурвич, А. Г. Митогенетическое излучение / А. Г. Гурвич. — 3-е изд. — М., 1945. — 284 с.
40. Гурвич, А. Г. Теория биологического поля / А. Г. Гурвич. — М. : Советская наука, 1944. — 154 с.
41. Даванков, В. А. Естественная гомохиральность элементарных частиц и метеоритная бомбардировка как возможный источник добиологической молекулярной хиральности / В. А. Даванков // Журнал физической химии. — 2009. — Т. 83, № 8. — С. 1405–1416.
42. Дахнов, В. Н. Геофизические методы определения коллекторских свойств нефте- и газонасыщения горных пород / В. Н. Дахнов. — М. : Недра, 1985. — 312 с.
43. Диброва, Д. В. Системы Na⁺/K⁺-гомеостаза как предшественники мембранной биоэнергетики / Д. В. Диброва, М. Ю. Гальперин, Е. В. Кунин, А. Я. Мулкиджанян // Биохимия. — 2015. — Т. 80, № 5. — С. 590–611.
44. Еськов, К. Ю. Удивительная палеонтология: история Земли и жизни на ней / К. Ю. Еськов. — М. : ЭНАС, 2008. — 312 с.
45. Жабин, А. Г. Онтогенез минералов. Агрегаты / А. Г. Жабин. — М. : Наука, 1979. — 276 с.
46. Жимулев, И. Ф. Общая и молекулярная генетика : учеб. пособие / И. Ф. Жимулев ; под ред. Е. С. Беляева, А. П. Акифьева. — 4-е изд. — Новосибирск : Сиб. изд-во, 2007. — 479 с.
47. Заар, Э. И. Установка «Фотостат-1» для изучения реакции организмов на физические условия планеты Марс / Э. И. Заар, В. Г. Зеликсон, М. Г. Китайгородский, И. В. Кошелев, Л. К. Лозина-Лозинский, М. А. Рыбин // Проблемы космической биологии. — 1971. — № 16. — С. 296–302.
48. Звягинцев, Д. Г. Взаимодействие микроорганизмов с твёрдыми поверхностями / Д. Г. Звягинцев. — М. : Изд-во Моск. ун-та, 1973. — 176 с.
49. Каичев, В. В. Разложение и окисление метанола на платине: исследование методами РФЭС и масс-спектрометрии in situ / В. В. Каичев, И. П. Просвирина, В. И. Бухтияров // Кинетика и катализ. — 2014. — Т. 55, № 4. — С. 535–546.
50. Каталог климатических камер. — URL: <https://npf-reom.ru/katalog.html>
51. Козлов, Н. Н. Компьютерный анализ процессов структурообразования нуклеиновых кислот / Е. И. Кугушев, Д. И. Сабитов, Т. М. Энеев // Математическое моделирование. — 2013. — Т. 25, № 4. — С. 126–134.
52. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рем. — М. : Лаборатория знаний, 2021. — 509 с.
53. Комаров, П. В. Самоорганизующиеся полимерные нанокомпозиты на основе симметричных диблок-сополимеров: мезоскопичное моделирование / П. В. Комаров, М. Д. Малышев, П. Г. Халатур, А. Р. Хохлов // Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах. — 2022. — Т. 505, № 1. — С. 71–75.

54. Комнатнов, М. Е. Климатическая экранированная камера : пат. RU 2558706 С1 Рос. Федерация / М. Е. Комнатнов, Т. Р. Газизов. — № 2014103639/07; заявл. 03.02.2014; опубл. 10.08.2015.
55. Корляков, К. Возникновение четырёхбуквенного алфавита в мире нуклеотидов / К. Корляков, Н. Бобровская // Журнал научной анимации. — 2020. — URL: <http://nauka21science.ru/2020/12/29/возникновение-четырёхбуквенного-алф> (дата обращения: 30.12.2020).
56. Корляков, К. А. Ёмкость среды : монография / К. А. Корляков. — Челябинск : Изд-во Челяб. гос. ун-та, 2018. — 385 с.
57. Корляков, К. А. Мир нуклеотидов как предшествующая фаза развития мира РНК / К. А. Корляков // Молодёжная наука : сб. ст. V Междунар. науч.-практ. конф. — Пенза : МЦНС «Наука и Просвещение», 2021. — С. 22–24.
58. Корляков, К. А. Некоторые данные об изменении органических молекул в различных гидродинамических условиях среды и теоретические предпосылки для создания климатического биореактора — прибора для изучения реакций абиогенеза / К. А. Корляков // Вестн. Совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. — 2018. — Т. 1, № 4 (23). — С. 9–12.
59. Корляков, К. А. Некоторые данные об изменении пористости минералов после культивирования водорослей и цианобактерий / К. А. Корляков, Е. А. Бондарь, Р. С. Морозов // Вестник Совета молодых ученых и специалистов Челябинской области. — 2016. — Т. 1, № 4 (15). — С. 78–82.
60. Корляков, К. А. Реконструкция возникновения жизни с позиций современной экологии / К. А. Корляков // Успехи современного естествознания. — 2019. — № 6. — С. 138–147.
61. Корляков, К. А. Теория неравновесных балансов в природе / К. А. Корляков // Вестник Совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. — 2022. — Т. 1, № 4 (39). — С. 4–9.
62. Корляков, К. А. Экологические факторы в не до конца разрешённых проблемах возникновения жизни: магнитное поле, углеводная среда, симметрия в организации предбиологических молекул / К. А. Корляков // Вестник Совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. — 2020. — Т. 2, № 4 (31). — С. 10–20.
63. Корляков, К. А. Электронно-микроскопическое исследование органических волокон (вата, пыль, паутина), заселённых микроорганизмами / К. А. Корляков, А. В. Малева, А. Д. Липская // Вестник Совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. — 2016. — Т. 1, № 3 (14). — С. 23–27.
64. Луков, В. В. Управляемый молекулярный магнетизм би- и полиядерных комплексов переходных металлов на основе гидразонов, азометинов и их аналогов / В. В. Луков [и др.] // Координационная химия. — 2019. — Т. 45, № 3. — С. 131–157.
65. Макшакова, О. Н. Структура комплексов поли-γ-бензил-L-глутамата с молекулами воды и диоксана по данным ИК-спектроскопии и квантово-химических расчётов / О. Н. Макшакова, Д. А. Файзуллин, Ю. Ф. Зуев // Журнал структурной химии. — 2014. — Т. 55, № 8. — С. 383.
66. Малева, А. В. Заселение микроорганизмами ваты в воздушных и водных условиях среды / А. В. Малева, К. А. Корляков // Вестник Совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. — 2015. — Т. 1, № 4 (11). — С. 14–21.
67. Малеев, М. Н. Свойства и генезис природных нитевидных кристаллов и их агрегатов / М. Н. Малеев. — М. : Наука, 1971. — 199 с.
68. Марков, А. Место жизни во Вселенной / А. Марков, Б. Штерн, М. Гельфанд, Е. Кунин, А. Мулкиджанян, М. Никитин. — М. : Троян, «Троицкий вариант — Наука», 2025. — 320 с.

69. Марков, А. В. Рождение сложности. Эволюционная биология сегодня. Неожиданные открытия и новые вопросы / А. В. Марков. — М. : Астрель, Corpus, 2010. — 528 с.
70. Марков, А. В. Ядро Земли и ядро клетки — что общего? / А. В. Марков // *Экология и жизнь*. — 2010. — № 9. — С. 50–55.
71. Молин, Ю. Н. Инфракрасная фотохимия / Ю. Н. Молин, В. Н. Панфилов, А. К. Петров. — М., 1985. — 254 с.
72. Назипова, Н. Н. Разнообразие некодирующих РНК в геномах эукариот / Н. Н. Назипова // *Математическая биология и биоинформатика*. — 2021. — Т. 16, № 2. — С. 256–298.
73. Никитин, М. Происхождение жизни. От туманности до клетки / М. Никитин. — М. : Альпина нон-фикшн, 2016. — 542 с.
74. Новиков, В. В. Биологические эффекты слабых и сверхслабых магнитных полей : дис. ... д-ра биол. наук / В. В. Новиков. — М., 2005. — 43 с.
75. Опарин, А. И. Возникновение жизни на Земле / А. И. Опарин. — 2-е изд., доп. — М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1941. — 267 с.
76. Опарин, А. И. Происхождение жизни / А. И. Опарин. — М. : Московский рабочий, 1924.
77. Опарин, А. И. Теоретические и экспериментальные предпосылки экзобиологии / А. И. Опарин // *Основы космической биологии и медицины*. Т. 1 : Космическое пространство как среда обитания / под ред. О. Г. Газенко, М. Кальвина. — М. : Наука, 1975. — С. 317–354.
78. Павлович, С. А. Магниточувствительность и магнитовосприимчивость микроорганизмов / С. А. Павлович. — Минск, 1981. — 170 с.
79. Пастухов, А. В. Магнитные нанокompозиты на основе сверхсшитых полистиролов / А. В. Пастухов, В. А. Даванков, В. В. Волков, К. А. Дембо, Я. В. Зубавичус, А. А. Корлюков, Филатова А. Г. // *Известия Российской академии наук. Серия физическая*. — 2009. — Т. 73, № 4. — С. 496–498.
80. Перфильев, Б. В. Капиллярные методы изучения микроорганизмов / Б. В. Перфильев, Д. Р. Габе. — М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1961. — 534 с.
81. Перфильев, Б. В. Микроразональное строение иловых озёрных отложений и методы его исследования / Б. В. Перфильев. — Л. : Наука, 1972. — 271 с.
82. Попов, А. И. Гуминовые вещества: свойства, строение, образование / А. И. Попов. — СПб. : Изд-во СПбГУ, 2004. — 248 с.
83. Руденко, А. П. Саморазвивающиеся каталитические системы / А. П. Руденко // *Докл. АН СССР*. — 1964. — Т. 159. — С. 1374–1377.
84. Руденко, А. П. Теория саморазвития открытых каталитических систем / А. П. Руденко. — М. : Изд-во МГУ, 1969. — 276 с.
85. Руденко, А. П. Термодинамические закономерности химической эволюции и основы биоэнергетики / А. П. Руденко // *Методологические и теоретические проблемы биофизики*. — М. : Наука, 1979. — С. 120–127.
86. Руденко, А. П. Химическая эволюция и биогенез / А. П. Руденко. — М. : Изд-во МГУ, 1964.
87. Сафронов, В. С. Эволюция допланетного облака и образование Земли и планет / В. С. Сафронов ; АН СССР, Ин-т физики Земли им. О. Ю. Шмидта. — М. : Наука, 1969. — 244 с.
88. Северцов, А. С. Причины и условия формирования ароморфной организации / А. С. Северцов // *Журнал общей биологии*. — 2008. — Т. 69, № 2. — С. 94–101.
89. Системы ведения товарного рыбоводства в агропромышленном комплексе Тюменской области / И. С. Мухачев, Н. П. Слинкин, Н. Я. Попов, Д. А. Размашкин, А. А. Бабушкин. — Тюмень, 2005. — 240 с.
90. Скопенков, А. Б. Основы теории узлов и зацеплений для пользователя / А. Б. Скопенков // *Матем. просв.* — 2021. — Вып. 27. — С. 128–165.

91. Снытников, В. Н. Абиогенный допланетный синтез пребиотического вещества / В. Н. Снытников // Вестн. Рос. акад. наук. — 2007. — Т. 77, № 3. — С. 218–226.
92. Соков, Л. А. Происхождение жизни. Мультиматрица (from stardust to men) / Л. А. Соков. — Челябинск : Изд-во ЧелГМА, 2012. — 411 с.
93. Солиман, Т. С. А. Влияние магнитного поля на реологические свойства растворов эфиров целлюлозы : дис. ... канд. физ.-мат. наук / Т. С. А. Солиман. — Екатеринбург, 2016. — 135 с.
94. Сорохтин, О. Г. Теория развития Земли: происхождение, эволюция и трагическое будущее / О. Г. Сорохтин, Д. В. Чилингар, Н. О. Сорохтин. — Ижевск : Ин-т компьютерных исследований, 2010. — 751 с.
95. Спирин, А. С. Мир РНК и его эволюция / А. С. Спирин // Молекулярная биология. — 2005. — Т. 39, № 4. — С. 550–556.
96. Стабникова, Е. В. Взаимодействие клеток с поверхностью раздела жидкость — газ / Е. В. Стабникова, А. С. Гордиенко, В. С. Ксенофонтов. — Киев : Наукова думка, 1991. — 195 с.
97. Старевский, А. В. Климатическая камера : пат. RU 162896 U1 Рос. Федерация / А. В. Старевский, Е. И. Быковская. — № 2015146702/28; заявл. 29.10.2015; опубл. 27.06.2016.
98. Суздалев, И. П. Нанотехнология: физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов / И. П. Суздалев. — М. : КомКнига, 2006. — 592 с.
99. Сумина, Е. Л. Поведение нитчатых цианобактерий в лабораторной культуре / Е. Л. Сумина // Микробиология. — 2006. — Т. 75, № 4. — С. 532–537.
100. Суховольский, В. Г. Использование теории фазовых переходов второго рода в анализе возрастной и гендерной зависимости возникновения мутации V617F/JAK2: миелопролиферативные новообразования и клональный гемопоэз неопределённого потенциала / В. Г. Суховольский, А. В. Ковалев, И. В. Арджевнишвили, А. С. Горбенко, М. А. Столяр, В. И. Бахтина, И. А. Ольховский // Клиническая лабораторная диагностика. — 2024. — Т. 69, № 10. — С. 504–512.
101. Твердислов, В. А. Биофизическая экология / В. А. Твердислов, А. Э. Сидорова, Л. В. Яковенко. — М. : URSS, КРАСАНД, 2012. — 544 с.
102. Терещук, В. МД-2023: Онкогенетика / Вася Терещук. — URL: <https://pcr.news/novosti/md-2023-onkogenetika/>
103. Трошенкова, С. В. Светорассеяние в разбавленных растворах целлюлозы и гидроксипропилцеллюлозы в ацетате 1-этил-3-метилимидазолия / С. В. Трошенкова, Е. С. Сашина, Н. П. Новосёлов, К.-Ф. Арндт // Журнал общей химии. — 2010. — Т. 80, № 3. — С. 479–484.
104. Холодов, Ю. А. Магнетизм в биологии / Ю. А. Холодов. — М., 1970. — 96 с.
105. Холодов, Ю. А. Магнитные поля биологических объектов / Ю. А. Холодов, А. Н. Козлов, А. М. Горбач. — М., 1987. — 144 с.
106. Чернавский, Д. С. Проблема происхождения жизни и мышления с точки зрения современной физики / Д. С. Чернавский // Успехи физических наук. — 2000. — Т. 170, № 2. — С. 157–183.
107. Четверин, А. Б. А. С. Спирин о молекулярных машинах и происхождении жизни / А. Б. Четверин // Биохимия. — 2021. — Т. 86, вып. 8. — С. 1105–1119.
108. Четверин, А. Б. История одного метода / А. Б. Четверин // Природа. — 2010. — № 2. — С. 41–48.
109. Четверин, А. Б. Научные и практические приложения молекулярных колоний / А. Б. Четверин, Е. В. Четверина // Молекулярная биология. — 2007. — Т. 41, № 2. — С. 284–296.

110. Четверин, А. Б. Неразгаданные загадки Q β -репликазы / А. Б. Четверин, В. И. Угаров, Е. В. Четверина // Молекулярная биология. — 2019. — Т. 53, № 6. — С. 899–910.
111. Четверин, А. Б. Парадоксы репликации РНК бактериального вируса / А. Б. Четверин // Молекулярная биология. — 2011. — Т. 45, № 1. — С. 160–172.
112. Четверина, Е. В. Нанокolonии: обнаружение, клонирование и анализ индивидуальных молекул / Е. В. Четверина, А. Б. Четверин // Успехи биологической химии. — 2008. — Т. 48. — С. 3–64.
113. Чжан, Д. Перчаточный бокс : пат. RU 105853 U1 Рос. Федерация / Д. Чжан. — № 2010128156/02; заявл. 20.11.2008; опубл. 27.06.2011.
114. Чичибабин, А. Е. Основные начала органической химии / А. Е. Чичибабин. — М. : Госхимиздат, 1963. — 910 с.
115. Шапиро, Р. У истоков жизни / Р. Шапиро // В мире науки. — 2007. — № 10. — С. 21–29.
116. Шевкунов, С. В. Механизм сцепления мономолекулярной плёнки воды с поверхностью кристалла β -AgI при термических флуктуациях / С. В. Шевкунов // Журнал физической химии. — 2018. — Т. 92, № 7. — С. 1132–1138.
117. Шевкунов, С. В. Нуклеация паров воды на кристаллической поверхности в сильном электрическом поле / С. В. Шевкунов // Коллоидный журнал. — 2013. — Т. 75, № 4. — С. 494–510.
118. Шмид, Р. Наглядная биотехнология и генная инженерия / Р. Шмид; пер. с нем. — 3-е изд. — М. : Лаборатория знаний, 2019. — 324 с.
119. Шостак, Д. Код жизни. Как случайность стала биологией / Д. Шостак, М. Ливио. — М. : Альпина нон-фикшн, 2025.
120. Щербина, М. А. Самоорганизующиеся супрамолекулярные системы различной симметрии на основе макромолекулярных секторообразных дендронов / М. А. Щербина, А. В. Бакиров, А. Н. Якунин, В. Перчек, У. Бегин, М. Меллер, С. Н. Чвалун // Кристаллография. — 2012. — Т. 57, № 2. — С. 195–214.
121. Эйген, М. Гиперцикл. Принципы самоорганизации макромолекул / М. Эйген, П. Шустер. — М. : Мир, 1982. — 270 с.
122. Эйген, М. Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул / М. Эйген. — М. : Мир, 1973. — 224 с.
123. Юшкин, Н. П. Структура и проблемы биоминералогии / Н. П. Юшкин. — Сыктывкар : Геопринт, 2003. — 20 с.
124. Яровой, В. В. Этапы эволюции органических соединений. Самообразование клетки. Вынужденная симметрия биологических систем / В. В. Яровой. — М. : Граф Цеппелин, 2017. — 158 с.
125. Baltimore, D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses / D. Baltimore // Nature. — 1970. — Vol. 226, no. 5252. — P. 1209–1211.
126. Barany, F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase / F. Barany // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. — 1991. — Vol. 88. — P. 189–193.
127. Bazzi, H. S. Adenine-containing block copolymers via ring-opening metathesis polymerization: synthesis and self-assembly into rod morphologies / H. S. Bazzi, H. F. Sleiman // Macromolecules. — 2002. — Vol. 35, no. 26.
128. Becker, S. Wet-dry cycles enable the parallel origin of canonical and non-canonical nucleosides by continuous synthesis / S. Becker, C. Schneider, H. Okamura, A. Crisp, T. Amatov, M. Dejmek, T. Carell // Nature Communications. — 2018. — Vol. 9. — P. 1–9.
129. Biebricher, C. K. In vitro recombination and terminal elongation of RNA by Q β replicase / C. K. Biebricher, R. Luce // EMBO Journal. — 1992. — Vol. 11. — P. 5129–5135.

130. Biebricher, C. K. Replication and evolution of short-chained RNA species replicated by Q β replicase / C. K. Biebricher // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. — 1987. — Vol. 52. — P. 299–306.
131. Biophotonics and coherent systems in biology / ed. by L. V. Beloussov, V. L. Voeikov, V. S. Martynyuk. — New York : Springer Science + Business Media, LLC, 2007.
132. Blanken, D. Genetically controlled membrane synthesis in liposomes / D. Blanken, D. Foscchepoth, A. C. Serrão, C. Danelon // *Nature Communications*. — 2020. — DOI: 10.1038/s41467-020-17863-5.
133. Boutlerow, A. Faits pour servir à l'histoire des dérivés méthyléniques / A. Boutlerow // *Bulletin de la Société chimique de Paris*. — 1861. — P. 84–90.
134. Briones, C. The dawn of the RNA World: toward functional complexity through ligation of random RNA oligomers / C. Briones, M. Stich, S. C. Manrubia // *RNA*. — 2009. — Vol. 15. — P. 743–749.
135. Caminade, A. M. Uses of dendrimers for DNA microarrays / A. M. Caminade, C. Padie, R. Laurent, A. Maraval, J. P. Majoral // *Sensors*. — 2006. — Vol. 6. — P. 901–914.
136. Carnall, J. M. A. Mechanosensitive self-replication driven by self-organization / J. M. A. Carnall, C. A. Waudby, A. M. Belenguer, C. A. Stuar, J.-P. Peyralans, S. Otto // *Science*. — 2010. — Vol. 327. — P. 1502–1506.
137. Cassidy, L. M. Guanine-centric self-assembly of nucleotides in water: an important consideration in prebiotic chemistry / L. M. Cassidy, B. T. Burcar, W. Stevens, E. M. Moriarty, L. B. McGown // *Astrobiology*. — 2014. — Vol. 14, no. 10. — P. 876–886.
138. Chen, I. A. The emergence of competition between model protocells / I. A. Chen, R. W. Roberts, J. W. Szostak // *Science*. — 2004. — Vol. 305. — P. 1474–1476.
139. Chetverin, A. B. Nonhomologous RNA recombination in a cell-free system: evidence for a transesterification mechanism guided by secondary structure / A. B. Chetverin, H. V. Chetverina, A. A. Demidenko, V. I. Ugarov // *Cell*. — 1997. — Vol. 88. — P. 503–513.
140. Chetverin, A. B. On the nature of spontaneous RNA synthesis by Q β replicase / A. B. Chetverin, H. V. Chetverina, A. V. Munishkin // *Journal of Molecular Biology*. — 1991. — Vol. 222. — P. 3–9.
141. Chetverina, H. V. Cloning of RNA molecules in vitro / H. V. Chetverina, A. B. Chetverin // *Nucleic Acids Research*. — 1993. — Vol. 21. — P. 2349–2353.
142. Compton, J. Nucleic acid sequence-based amplification / J. Compton // *Nature*. — 1991. — Vol. 350, no. 6313. — P. 91–92.
143. Costanzo, G. Sustainability and chaos in the abiotic polymerization of 3',5'-cyclic guanosine monophosphate: the role of aggregation / G. Costanzo, J. E. Šponer, J. Šponer, A. Cirigliano, P. Benedetti, V. Giliberti, R. Polito, E. D. Mauro // *ChemSystemsChem*. — 2020. — Vol. 3, no. 1. — P. 1–15.
144. Crick, F. Chapter 8: The genetic code / F. Crick // *What Mad Pursuit: A Personal View of Scientific Discovery*. — New York : Basic Books, 1990. — P. 89–101.
145. Dollo, L. Les lois de l'évolution / L. Dollo. — New York : Arno, 1893.
146. Dreiling, J. M. Chirally sensitive electron-induced molecular breakup and the Vester-Ulbricht hypothesis / J. M. Dreiling, T. J. Gay // *Physical Review Letters*. — 2014. — Vol. 113. — P. 1–8.
147. Ehrenfreund, P. Experimentally tracing the key steps in the origin of life: the aromatic world / P. Ehrenfreund, S. Rasmussen, J. Cleaves, L. Chen // *Astrobiology*. — 2006. — Vol. 6, no. 3. — P. 490–520.
148. Fan, Z. Did the exposure of coacervate droplets to rain make them the first stable protocells? / Z. Fan, Y. Deckel, L. A. Lowe et al. // *Science Advances*. — 2024.

-
149. Fire, A. Rolling Replication of Short DNA Circles / A. Fire, S.-Q. Xu // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. — 1995. — Vol. 92. — P. 4641–4645.
150. Folsome, C. E. Prebiological membranes: synthesis and properties / C. E. Folsome, H. J. Morowitz // *Space Life Sciences*. — 1969. — Vol. 1, no. 4. — P. 538–544.
151. Guatelli, J. C. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication / J. C. Guatelli, K. M. Whitfield, D. Y. Kwok, K. J. Barringer, D. D. Richman, T. R. Gingeras // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. — 1990. — Vol. 87, no. 5. — P. 1874–1878.
152. Gwak, G. H. Controlled supramolecular structure of guanosine monophosphate in the interlayer space of layered double hydroxide / G. H. Gwak, I. Kocsis, Y. M. Legrand, M. Barboiu, J. Min // *Beilstein Journal of Nanotechnology*. — 2016. — Vol. 7. — P. 1928–1935.
153. Hanczyc, M. M. Experimental models of primitive cellular compartments: encapsulation, growth and division / M. M. Hanczyc, S. M. Fujikawa, J. W. Szostak // *Science*. — 2003. — Vol. 302. — P. 618–622.
154. Hodgson, G. W. Prebiotic porphyrin genesis: porphyrins from electric discharge in methane, ammonia and water vapor / G. W. Hodgson, C. Ponnampereuma // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. — 1968. — Vol. 59. — P. 22–28.
155. Hoesl, M. G. Chemical evolution of a bacterial proteome / M. G. Hoesl, S. Oehm, P. Durkin, E. Darmon, L. Peil, H. R. Aerni, J. Rappsilber, J. Rinehart, D. Leach, D. Söll, N. Budisa // *Angewandte Chemie (International Edition)*. — 2015. — Vol. 54, no. 34. — P. 10030–10034.
156. Jerome, C. A. Catalytic synthesis of polyribonucleic acid on prebiotic rock glasses / C. A. Jerome, H.-J. Kim, S. J. Mojzsis, S. A. Benner, E. Biondi // *Astrobiology*. — 2022. — Vol. 22, no. 6. — P. 629–636.
157. Johnston, W. RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension / W. Johnston, P. Unrau, M. Lawrence, M. Glasner, D. Bartel // *Science*. — 2001. — Vol. 292, no. 5520.
158. Joyce, G. F. RNA evolution and the origin of life / G. F. Joyce // *Nature*. — 1989. — Vol. 338. — P. 217–224.
159. Kim, Y. A model for the emergence of RNA from a prebiotically plausible mixture of ribonucleotides, arabinonucleotides, and 2'-deoxynucleotides / Y. Kim, Z. Liu, Q. Ye, L. Li, K. Lee, J. Heo, D. Kim, J. W. Szostak // *Journal of the American Chemical Society*. — 2020. — Vol. 142, no. 5. — Pp. 2317–2326. doi: 10.1021/jacs.9b11239.
160. Koonin, E. V. Origin and evolution of the universal genetic code / E. V. Koonin, A. S. Novozhilov // *Annual Review of Genetics*. — Newton : Annual Reviews, 2017. — Vol. 51. — P. 45–62.
161. Lartigue, C. Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast / C. Lartigue, S. Vashee, M. A. Algire, R. Y. Chuang, G. A. Bender // *Science*. — 2009. — Vol. 325, no. 5948. — P. 1693–1696.
162. Lincoln, T. A. Self-sustained replication of an RNA enzyme / T. A. Lincoln, G. F. Joyce // *Science*. — 2009. — Vol. 323 (5918). Pp. 1229–32. doi: 10.1126/science.1167856.
163. Lizardi, P. M. Exponential amplification of recombinant-RNA hybridization probes / P. M. Lizardi, C. E. Guerra, H. Lomeli, I. Tussie-Luna, F. R. Kramer // *Bio/Technology*. — 1988. — Vol. 6. — P. 1197–1202.
164. Malyshev, D. A. A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet / D. A. Malyshev et al. // *Nature*. — 2014. — DOI: 10.1038/nature13314.
165. Mansy, S. S. Template-directed synthesis of a genetic polymer in a model

protocell / S. S. Mansy, J. P. Schrum, M. Krishnamurthy, S. Tobé, D. Treco, J. W. Szostak // *Nature*. — 2008. — Vol. 454. — P. 122–125.

166. Mariner, R. Synthesis of adenosine triphosphate under possible primitive earth conditions / R. Mariner, C. Ponnamperna, C. Sagan // *Nature*. — 1963. — Vol. 199. — P. 222.

167. Matthew, W. Four new DNA letters double life's alphabet / W. Matthew // *Nature*. — 2019. — Vol. 566. — P. 436.

168. Matthew, W. P. Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions / W. P. Matthew, B. Gerland, J. D. Sutherland // *Nature*. — 2009. — Vol. 459. — P. 239–242.

169. Meinert, C. Ribose and related sugars from ultraviolet irradiation of interstellar ice analogs / C. Meinert et al. // *Science*. — 2016. — Vol. 352. — P. 208–212.

170. Mendes, P. Adenine as an organocatalyst for the ring-opening polymerization of lactide: scope, mechanism and access to adenine-functionalized polylactide / P. Mendes // *Reaction Chemistry & Engineering*. — 2025.

171. Mereyala, H. Synthesis of methyl 3-deoxy-D-ribofuranoside by regioselective reductive opening of methyl 2,3-anhydro-D-ribofuranoside / H. Mereyala, R. Bantu // *Indian Journal of Chemistry*. — 2003. — Vol. 42B. — P. 3071–3074.

172. Mills, D. R. Nucleotide sequence of microvariant RNA: another small replicating molecule / D. R. Mills, F. R. Kramer, C. Dobkin, T. Nishihara, S. Spiegelman // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. — 1975. — Vol. 72. — P. 4252–4256.

173. Mo, R. ATP-responsive DNA-graphene hybrid nanoaggregates for anticancer drug delivery / R. Mo, T. Jiang, W. Sun, Z. Gu // *Biomaterials*. — 2015. — Vol. 50. — P. 67–74.

174. Morowitz, H. J. Beginnings of cellular life: metabolism recapitulates biogenesis / H. J. Morowitz. — New Haven : Yale University Press, 1993. — 208 p.

175. Munishkin, A. V. An in vivo recombinant RNA capable of autocatalytic synthesis by Q β replicase / A. V. Munishkin, L. A. Voronin, A. B. Chetverin // *Nature*. — 1988. — Vol. 333. — P. 473–475.

176. Munishkin, A. V. Efficient templates for Q β replicase are formed by recombination from heterologous sequences / A. V. Munishkin, L. A. Voronin, V. I. Ugarov, L. A. Bondareva, H. V. Chetverina, A. B. Chetverin // *Journal of Molecular Biology*. — 1991. — Vol. 221. — P. 463–472.

177. Oro, J. Synthesis of adenine from ammonium cyanide / J. Oro, A. Kimball // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 1960. — Vol. 2. — P. 407–412.

178. Oro, J. Synthesis of purines under possible primitive earth conditions. I. Adenine from hydrogen cyanide / J. Oro, A. Kimball // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. — 1961. — Vol. 94. — P. 217–227.

179. Park, D. Morphology Control of Ni(II)-NTA-End-Functionalized Block Copolymer and Bio-Conjugation through Metal-Ligand Complex / D. Park, C. Lee, M. Chae, M. A. Kadir, J. E. Choi, J. K. Song, H. J. Paik // *Polymers*. — 2017. — Vol. 9, № 4. — Art. 144. — P. 1–14. — DOI: 10.3390/polym9040144.

180. Parks, J. J. Mechanical control of spin states in spin-1 molecules and the underscreened Kondo effect / J. J. Parks et al. // *Science*. — 2010. — Vol. 328, no. 5984. — P. 1370–1373.

181. Patel, B. H. Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyano-sulfidic protometabolism / B. H. Patel, C. Percivalle, D. J. Ritson, C. D. Duffy, J. D. Sutherland // *Nature Chemistry*. — 2015. — Vol. 7, no. 4. — P. 301–307.

182. Priano, C. Evolution of the RNA coliphages: the role of secondary structures during RNA replication / C. Priano, F. R. Kramer, D. R. Mills // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. — 1987. — Vol. 52. — P. 321–330.

183. Ren, L. Functionalized graphene oxide for anti-VEGF siRNA delivery: preparation, characterization and evaluation in vitro and in vivo / L. Ren, Y. Zhang, C. Cui, Y. Bi, X. Ge // *RSC Advances*. — 2017. — Vol. 7. — P. 20553–20566.
184. Rosenberg, R. A. Spin-polarized electron induced asymmetric reactions in chiral molecules / R. A. Rosenberg // *Electronic and Magnetic Properties of Chiral Molecules and Supramolecular Architectures*. — 2010. — Vol. 298.
185. Saiki, R. K. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia / R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim // *Science*. — 1985. — Vol. 230. — P. 1350–1354.
186. Saladino, R. Formamide and the origin of life / R. Saladino, C. Crestini, S. Pino, G. Costanzo, E. Di Mauro // *Physics of Life Reviews*. — 2012. — Vol. 9, no. 1. — P. 84–104.
187. Saladino, R. Genetics first or metabolism first? The formamide clue / R. Saladino, G. Botta, S. Pino, G. Costanzo, E. Di Mauro // *Chemical Society Reviews*. — 2012. — Vol. 41. — P. 5526–5565.
188. Saladino, R. Meteorite-catalyzed syntheses of nucleosides and of other prebiotic compounds from formamide under proton irradiation / R. Saladino et al. (E. Carota, G. Botta, M. Kapralov, G. N. Timoshenko, A. Y. Rozanov, E. Krasavin, E. Di Mauro) // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. — 2015. — Vol. 112, no. 13. — P. 2746–2755.
189. Saladino, R. Proton irradiation: a key to the challenge of N-glycosidic bond formation in a prebiotic context / R. Saladino, B. M. Bizzarri, L. Botta, J. Šponer, J. E. Šponer, T. Georgelin, M. Jaber, B. Rigaud, M. Kapralov, G. N. Timoshenko, A. Rozanov, E. Krasavin, A. M. Timperio, E. D. Mauro // *Scientific Reports*. — 2017. — Vol. 5. — P. 1–8.
190. Schaffner, W. Nanovariant RNAs: nucleotide sequence and interaction with bacteriophage Q β replicase / W. Schaffner, K. J. Ruegg, C. Weissmann // *Journal of Molecular Biology*. — 1977. — Vol. 117. — P. 877–907.
191. Szczepanski, J. T. A cross-chiral RNA polymerase ribozyme / J. T. Szczepanski, G. F. Joyce // *Nature*. — 2014. — Vol. 515, no. 7527. Pp. 440–2. doi: 10.1038/nature13900
192. Šponer, J. E. Nonenzymatic, template-free polymerization of 3',5'-cyclic guanosine monophosphate on mineral surfaces / J. E. Šponer, J. Šponer, J. Vyravsky, O. Sedo, Z. Zdrahal, G. Costanzo, E. Di Mauro, S. Wunnavva, D. Braun, R. Matyasek, A. Kovaric // *ChemSystemsChem*. — 2021. — Vol. 3, no. 6. — [без указания страниц].
193. Tachibana, M. Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases / M. Tachibana, P. Amato, M. Sparman, J. Woodward, D. M. Sanchis, H. Ma, N. M. Gutierrez, R. Tippner-Hedges, E. Kang, H. S. Lee, C. Ramsey, K. Masterson, D. Battaglia, D. Lee, D. Wu, J. Jensen, P. Patton, S. Gokhale, R. Stouffer, Sh. Mitalipov // *Nature*. — 2013. — Vol. 493, no. 7434. Pp. 627–31. doi: 10.1038/nature11647.
194. Temin, H. M. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus / H. M. Temin, S. Mizutani // *Nature*. — 1970. — Vol. 226, no. 5252. — P. 1211–1213.
195. Toppozini, L. Adenosine monophosphate forms ordered arrays in multilamellar lipid matrices: insights into assembly of nucleic acid for primitive life / L. Toppozini, H. Dies, D. W. Deamer, M. C. Rheinstadter // *PLOS ONE*. — 2013. — Vol. 8, no. 5. — P. 1–8.
196. Valba, O. V. Alignment of RNA molecules: binding energy and statistical properties of random sequences / O. V. Valba, S. K. Nechaev, M. V. Tamm // *Journal of Experimental and Theoretical Physics*. — 2012. — Vol. 114, no. 2. — P. 354–364.
197. Valba, O. V. Spontaneous symmetry breaking and phase coexistence in

two-color networks / O. V. Valba, M. V. Tamm, S. K. Nechaev // *Physical Review Letters*. — 2012. — Vol. 109, no. 1. — Art. no. 018102.

198. Vester, F. Optische Aktivität und die Paritätsverletzung im β -Zerfall / F. Vester, T. L. V. Ulbricht, H. Krauch // *Naturwissenschaften*. — 1959. — Vol. 46, no. 2. — P. 68–69.

199. Walker, G. T. Strand displacement amplification—an isothermal, in vitro DNA amplification technique / G. T. Walker, M. C. Little, J. G. Nadeau, D. D. Shank // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. — 1992, no. 2. — Vol. 89. — P. 392–396.

200. Wasungu, L. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes / L. Wasungu, D. Hoekstra // *Journal of Controlled Release*. — 2006. — Vol. 116. — P. 255–264.

201. Weber, A. L. The triose model: glyceraldehyde as a source of energy and monomers for prebiotic condensation reactions / A. L. Weber // *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. — 1987. — Vol. 17. — P. 107–119.

202. Weissmann, C. The role of nucleic acids in the biosynthesis of proteins / C. Weissmann // *FEBS Letters*. — 1974. — Vol. 40, no. 1. — P. 10–18.

203. Wochner, A. Ribozyme-catalyzed transcription of an active ribozyme / A. Wochner, J. Attwater, A. Coulson, P. Holliger // *Science*. — 2011. — Vol. 332, no. 6026. — P. 209–212.

204. Woese, C. R. On the evolution of cells / C. R. Woese // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. — 2002. — Vol. 99. — P. 8742–8747.

205. Woese, C. R. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms / C. R. Woese, G. E. Fox // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. — 1977. — Vol. 74. — P. 5088–5090.

206. Wu, D. Y. The Ligation Amplification Reaction (LAR): Amplification of Specific DNA Sequences Using Sequential Rounds of Template-Dependent Ligation / D. Y. Wu, R. B. Wallace // *Genomics*. — 1989. — Vol. 4. — P. 560–569.

207. Wu, H. Evolution of the genetic triplet code via two types of doublet codons / H. Wu, S. Bagby, J. M. H. Elsen // *Journal of Molecular Evolution*. — 2005. — Vol. 61, no. 1. — P. 54–64.

208. Wächtershäuser, G. Before enzymes and templates: theory of surface metabolism / G. Wächtershäuser // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. — 1988. — Vol. 52, no. 4. — P. 452–484.

209. Yang, Z. Amplification, mutation, and sequencing of a six-letter synthetic genetic system / Z. Yang, F. Chen, J. B. Alvarado, S. A. Benner // *Journal of the American Chemical Society*. — 2011. — № 133 (38). — Pp. 15105–12. doi: 10.1021/ja204910n

210. Zhang, Y. A semisynthetic organism engineered for the stable expansion of the genetic alphabet / Y. Zhang, B. M. Lamb, A. W. Feldman, A. X. Zhou, T. Laverne, L. Li, E. Floyd, F. E. Romesberg // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. — 2017. — Vol. 114. — P. 1317–1322.

211. Zhang, Y. A semi-synthetic organism that stores and retrieves increased genetic information / Y. Zhang et al. // *Nature*. — 2017. — Vol. 551. — P. 644–647.

212. Zhu, T. F. A robust pathway for protocell growth and division under plausible prebiotic conditions / T. F. Zhu, J. W. Szostak // *Journal of the American Chemical Society*. — 2009. — Vol. 131. — P. 5705–5713.

213. Zuckerman, J. E. Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA / J. E. Zuckerman, I. Gritli, A. Tolcher, J. D. Heidel, D. Lim // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. — 2014. — Vol. 111. — P. 11449–11454.

214. Zugenmaier, P. Structural investigations on cellulose tricarbanilate conformation and liquid crystalline behavior / P. Zugenmaier, U. Vogt // *Die Makromolekulare Chemie*. — 1983. — Bd. 194. — S. 1749–1760.