

УДК 611.013.9

РОЛЬ КОЛЛЕКТИВНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ДВИЖЕНИЙ И МЕХАНОГЕОМЕТРИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ В РАЗМЕТКЕ ОСЕВЫХ ЗАЧАТКОВ У ЗАРОДЫШЕЙ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ¹

© 2007 г. Л. В. Белоусов, Е. Г. Корвин-Павловская, Н. Н. Лучинская, Е. С. Корникова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

119892 Москва, ГСП-2, Ленинские горы

E-mail: morphogenesis@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.08.06 г.

Исследовали роль коллективных клеточных движений в стабильной разметке маргинальной зоны у зародышей шпорцевой лягушки на осевые зачатки (хорду, сомиты и нервную ткань). Для этого на стадиях поздней бластулы–средней гастрюлы производили следующие операции: 1) изоляцию маргинальной зоны; 2) добавление к ней фрагментов вентральной эктодермы; 3) разрезы изолированных маргинальных зон по вентральной (а) или дорсальной (б) средней линии; 4) ретрансплантацию супрабластопоральной области без поворота и с поворотом на 90°; 5) П-образную сепаровку супрабластопоральной области в переднем или заднем направлениях. Обнаружено, что в опытах 1, 4 и 5 подавлялись латеромедиальные конвергентные движения клеток и дифференцировка осевых зачатков в супрабластопоральной области. В опытах 4 и 5 клеточные потоки направлялись в вентральном направлении, и полностью перестраивалась вся архитектура зародыша. Осевые зачатки располагались в основном в боковых губах бластопора. В опыте 3 конвергентные движения клеток восстанавливались, причем в (а) – в презумптивном направлении, а в (б) – перпендикулярно последнему. Осевые зачатки были вытянуты перпендикулярно направлениям конвергенции и, как правило, изогнуты. В последних случаях сомиты возникали на выпуклых (растянутых), а нервная ткань – на вогнутых (сжатых) сторонах. Анализ полученных данных показывает, что, по крайней мере, до стадии средней гастрюлы в маргинальной зоне отсутствует стабильная разметка. Она устанавливается путем самоорганизации, в которой важную роль играют кооперативные клеточные движения и создаваемые ими механогеометрические условия.

Ключевые слова: *Xenopus laevis*, самоорганизация, гастрюляция, осевые зачатки, клеточные движения, механические напряжения.

Согласно картам презумптивных зачатков (Gilbert, 2003), маргинальная зона (МЗ), кольцом опоясывающая бластопор (расположена между пунктирными контурами; см. рис. 1, а), “размечена”, по крайней мере, на зачатки хорды, сомитов и боковой пластинки (последняя, по новейшим данным, еще более детализирована: Kumano, Smith, 2002), а спереди от хордального зачатка локализован материал нервной пластинки. В настоящее время классические морфологические карты можно дополнить картами экспрессии целого ряда генов, необходимых для дифференцировки тех или иных зачатков (Smith et al., 1991; Cho et al., 1991; Smith et al., 1995; Onichtchouk et al., 1996; Bouwmeester et al., 1996; Schroeder et al., 1999 и др). Часть генов экспрессируется локально, а часть – довольно широко, совпадая или нет с картами презумптивных зачатков для данной стадии. В любом случае, однако, остается неясным, како-

вы факторы разметки, когда она становится необратимой и на чем основана ее структурная устойчивость, т.е. практически стопроцентная для нормального развития воспроизводимость и идеальная симметричность относительно сагиттальной плоскости.

Высказано мнение, что основными факторами разметки являются градиенты концентрации секретруемых факторов, убывающие по мере удаления от шпемановского и ньюкуповского центров (см. например: Christian, Moon, 1993; Heasman, 1997). Действительно, в опытах на агрегатах клеток ранней гастрюлы показано, что по мере удаления от источника диффузии одного из индукционных факторов – активина – закономерно изменяется экспрессия ряда генов (Gurdon et al., 1994), а при изменении концентраций активина возникают различные зачатки – хорда, нервная ткань, мышцы, пронефрос и сердце (Arizumi, Asashima, 2001). Вместе с тем ни рисунок экспрессии генов в опытах Гердона, ни последовательность возникающих зачатков при убывающих

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 05-04-48681).

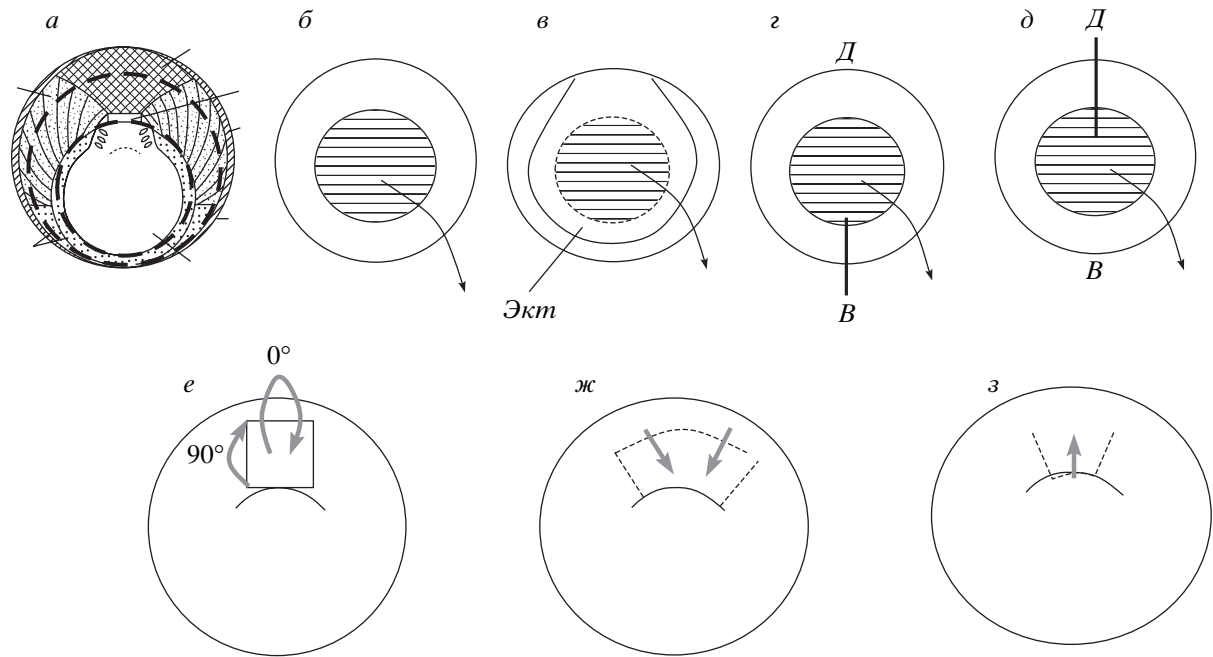


Рис. 1. Разметка маргинальной зоны (МЗ) зародышей амфибий (а) и схемы экспериментов (б–з). Зародыши показаны с вегетативного полюса. (↻): б–д – удаление энтодермы желточной пробки (заштрихована); (→): е – направление поворотов, ж, з – сепаровки материала супрабластопоральной области. Экт (в) – лоскут вентральной эктодермы, наложенный на эксплантат, Д–В (з, д) – дорсовентральная ось.

концентрациях активина в экспериментах Аризуми и Асашимы не были вполне идентичны соответствующим разметкам в нормальном развитии. Кроме того, используемые концентрации активина были значительно выше физиологических, а результаты описанных опытов сильно зависели от количества клеток в агрегате и носили пороговый характер, требующий межклеточных взаимодействий (Green et al., 1994).

Важно подчеркнуть, что интересующая нас дифференцировочная разметка (отражаемая на картах презумптивных зачатков) значительно тоньше и подробнее, нежели регистрируемая в процессе гаструляции разметка по признакам экспрессии генов. Например, экспрессирующий в супрабластопоральной области (СБО) ген *gooseoid* метит плюрипотентные клетки (Niehrs et al., 1993), впоследствии дающие начало различным закладкам. Кроме того, этот ген контролирует коллективные гаструляционные движения, вовлекая в дифференцировку также и не экспрессирующие его клетки. В связи с этим авторы, ссылаясь на нашу предыдущую работу (Belousov et al., 1988), прямо ставят вопрос об участии морфогенетических движений в установлении терминальной дифференцировки клеток. На это же указывают опубликованные позже работы (Sokol, 1994; Yamada, 1994). Кроме того, важным доводом против предварительной (наступающей до клеточных движений) спецификации клеток

является их существенное перемешивание в ходе движений (Dale, Slack, 1987; Shih, Keller, 1992). Ясно, что в этих условиях более ранняя детерминация была бы неэффективной.

Фундаментальным, но нередко игнорируемым свойством разметки зародыша является ее структурная устойчивость, т.е. способность к точному восстановлению после значительных нарушений во взаиморасположении целых зачатков и отдельных клеток (Саксен, Тойвонен, 1963), а также расширение спектра дифференцировок при увеличении объема образца (Lopashov, 1935). Эти явления трудно объяснимы с позиций концентрационных градиентов и повышают вероятность поздней спецификации клеток, которая должна быть тесно связана с их коллективными взаимодействиями.

Задача нашего исследования состояла в изучении роли коллективных клеточных движений и связанных с ними механогеометрических факторов (полей механических напряжений) в разметке маргинальной зоны зародыша и становлении архитектуры зародыша в целом. С этой целью были использованы различные приемы модуляции полей механических напряжений и, соответственно, изменений направления клеточных потоков. Особое внимание уделяли проявлениям самоорганизации в ходе развития.

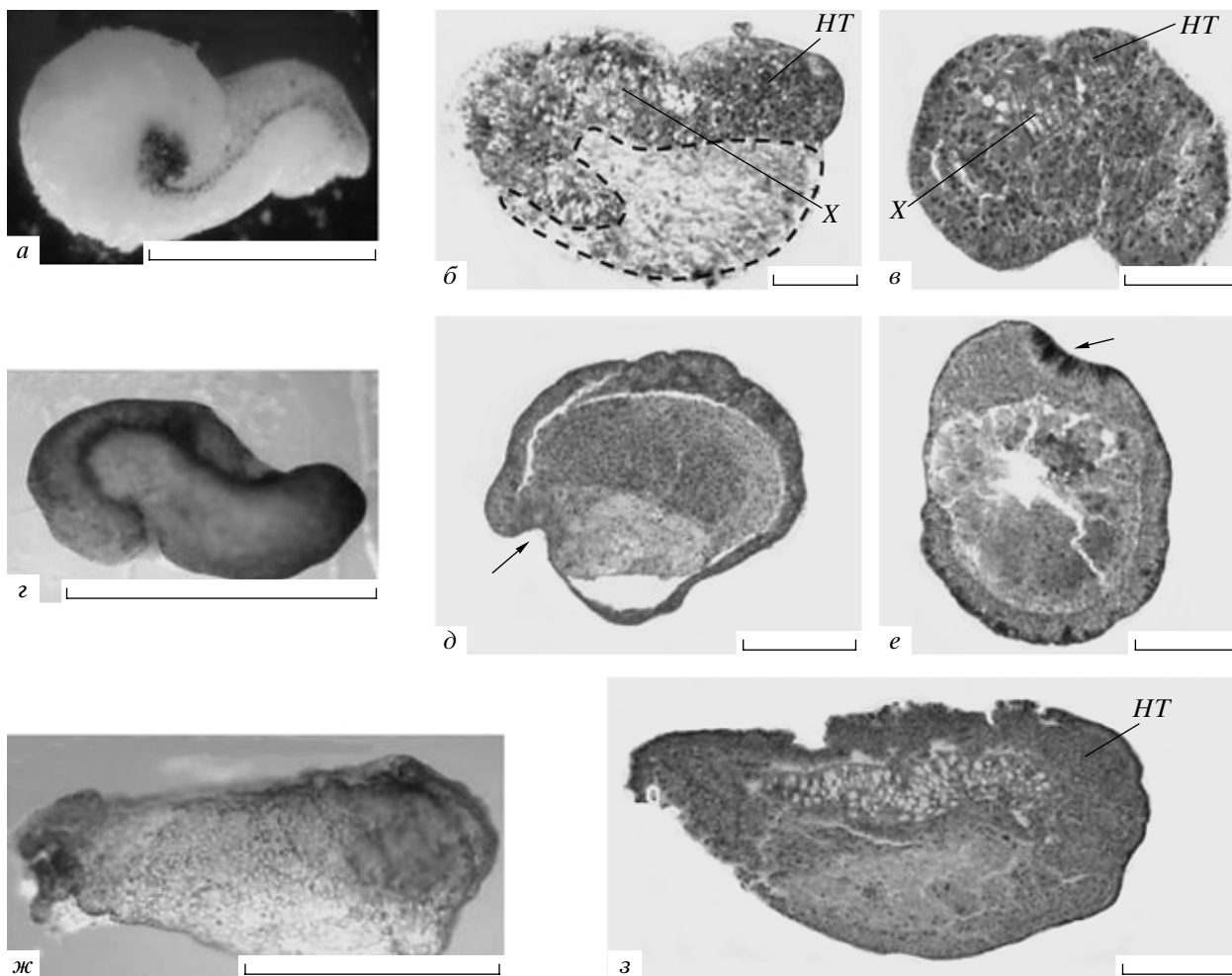


Рис. 2. Дифференцировка изолированных МЗ (а–в), фрагментов вентральной эктодермы (г–е) и изолированной МЗ, сращенной с лоскутом вентральной эктодермы (ж, з). Операции проведены на ст. 10, материал фиксирован через 18–24 ч. (→) – впячивания.

HT – нервная ткань, X – хорда. Пунктирная кривая (б) ограничивает область, занятую недифференцированными клетками. Масштаб: а, г, ж, з – 1 мм, б, в, д, е – 200 мкм.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали зародыши шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis* Daudin), полученные методом гормональной стимуляции производителей. Микрохирургические операции проводили на стадиях 9–12 (поздняя бластула – поздняя гастрюла) по Ньюкупу и Фаберу (Nieuwkoop, Faber, 1956) в следующих вариантах.

1. На стадии 10+ эксплантировали МЗ, т.е. экваториальную область зародышей *X. laevis*, лежащую анимальнее закладки бластопора. Материал желточной пробки удаляли (рис. 1, б, стрелка). Отдельно эксплантировали оставшийся в зародыше анимальный (эктодермальный) материал.

2. Накрывали МЗ с анимальной стороны немедленно после ее эксплантации лоскутом вентральной эктодермы (рис. 1, в, *Экт*).

3. Разрезали МЗ немедленно после ее изоляции либо по вентральной (серия а), либо по дорсальной (серия б) средней линии (рис. 1, г, д).

4. Вырезали СБО (3–4 клеточных слоя) и немедленно (через несколько секунд) ретрансплантировали ее в то же положение на тот же самый или другой зародыш той же стадии без поворота или с поворотом трансплантата на 90° (рис. 1, е).

5. Проводили П-образную сепаровку СБО в направлении либо на бластопор (серия а), либо от бластопора (серия б) (рис. 1, ж, з). Во избежание немедленного зарастания раны такие сепаровки повторяли трижды в течение первых двух часов.

Культивирование зародышей и эксплантатов. Образцы инкубировали до 24 ч при комнатной температуре в пластиковых чашках на агарозных субстратах в растворе MMR, mM (100 NaCl, 2 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, pH 7.4) с

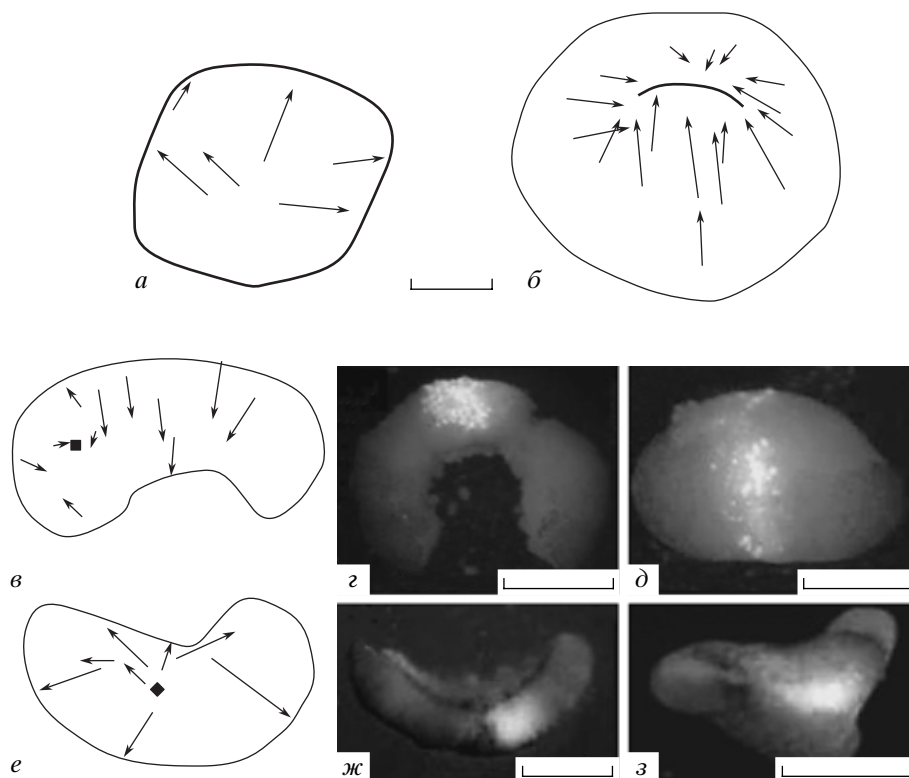


Рис. 3. Движения материала экспериментальных образцов (*а, в–з*) в сравнении с нормальной гастрულიей (*б*) на основе наблюдений над угольными (*а–в, е*) и ФД-метками (*з, д, ж, з*). Стрелки соединяют начальные и конечные положения угольных меток за 3-часовой период после эксплантации (*а, в, е*) и за тот же период нормальной гастрულიи (*б*).

а – опыт 1; *в–д* – опыт 3; *а, з* – ФД-метка в потомстве дорсомедиальных бластомеров сразу после вентрального разреза, *д* – тот же образец через 3 ч, метка концентрируется вдоль дорсомедиальной оси; *е–з* – опыт 3; *б, ж* – ФД-метка в потомстве вентромедиальных бластомеров через 30 мин после дорсального разреза, *з* – тот же образец через 15 ч, метка растягивается вдоль его длинной оси. Масштаб: *а–в, е* – 400 мкм, *з, д, ж, з* – 1 мм.

добавлением гентамицина. Через 40 мин после завершения операций раствор разбавляли вдвое. Для маркировки клеточных движений использовали два метода.

1. На образцы, закрепленные в агарозных лунках, наносили взвесь угольных частиц. При помощи фотокамеры Canon с использованием программы Adobe Photoshop 7.0 производили съемку образцов каждые 15 или 20 мин в течение первых 3 ч инкубации. Результаты представляли в виде треков движений надежно “узнаваемых” угольных меток.

2. Инъектировали флуоресцеин-декстран (ФД) либо в зиготы *Xenopus laevis* до начала дробления, либо в два дорсо- или вентроэкваториальных бластомера на стадии 32 бластомеров (10 нг на бластомер). Из зародышей, развившихся из меченых зигот, на стадии 10 или 11 вырезали участок СБО и трансплантировали в ту же область немеченого зародыша той же стадии (опыт 4). После инъекции в дорсоэкваториальные бластомеры либо оставляли зародыш интактным, либо вырезали МЗ на стадиях 10 или 11 и осуществляли вентромедиальный разрез (опыт 3, *а*). После инъекции в

вентроэкваториальные бластомеры на стадиях 10 или 11 вырезали МЗ и осуществляли дорсомедиальный разрез (опыт 3, *б*). Наблюдали и фотографировали изменение положения и формы меток в течение 24 ч после операций при ультрафиолетовом излучении с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Olympus SZX9 с флуоресцентным блоком U-RFL-T.

Гистологическая обработка. Образцы фиксировали в жидкости Буэна, проводили через смеси этанола с бутанолом и заливали в парафин. Срезы толщиной 7–8 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха. Фотосъемку проводили на цифровой приставке к микроскопу Opton.

Морфометрия. С помощью компьютерной программы Plana (Пущинский научный центр) на четырех центральных срезах образцов из опыта 1 (10 образцов) и опыта 3 (16 образцов) измеряли процентные отношения площадей, занимаемых недифференцированными клетками, не вошедшими ни в одну из осевых структур (ограничены пунктиром на рис. 2, *б*), к полным площадям образцов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Развитие изолированных МЗ (рис. 2). Отверстие удаленной желточной пробки в течение нескольких минут заполнялось клетками внутренних слоев МЗ. Образцы, изолированные на стадиях 9–11, постепенно сжимались в радиальных направлениях и в целом вытягивались перпендикулярно плоскости МЗ, хотя нередко имели изогнутую форму (рис. 2, а). Основная часть площади центральных срезов через эксплантаты приходилась на недифференцированную энтодерму (рис. 2, б). Осевые структуры (хорда, сомиты и нервная пластинка) отличались крайне переменным расположением (рис. 2, в): ни один из просмотренных 18 образцов не повторял структуры другого. В частности, хорда была представлена отдельными островками или имела многочисленные изгибы (рис. 2, б, в). Следовательно, дальний порядок в расположении осевых органов отсутствовал. Наблюдения за движением угольных меток показали, что клетки внешней (вегетативной) поверхности МЗ двигались в расходящихся направлениях от ее центра к краям, стремясь закрыть раневую поверхность (рис. 3, а). Характерные для нормального морфогенеза МЗ латеромедиальные конвергентные движения клеток (рис. 3, б) полностью отсутствовали. Структуры, развивающиеся из МЗ, изолированных на стадии 12, были дифференцированы значительно полнее, и расположение внутренних зачатков приближалось к нормальному.

Эксплантированный на стадиях 10–11 эктодермальный материал также образовывал весьма вариабельные структуры (рис. 2, г–е), не содержащие, однако, осевых структур.

Развитие МЗ после ее накрывания “с изнанки” лоскутом вентральной эктодермы существенно приближалось к нормальному. В частности, прослеживались морфологические признаки и переднезадней полярности (рис. 2, ж, з).

Развитие МЗ после вентро- и дорсомедиальных разрезов (опыт 3, серии а, б). При обоих типах операций на стадиях 10–11 кольцевые образцы в течение нескольких секунд после разреза “раскрывались” до дуг примерно в 270° , а затем в течение 20–40 мин полностью распрямлялись. Позже поведение образцов а и б становилось различным. В образцах а (вентромедиальные разрезы) уже в первые 3 ч после эксплантации клетки начинали двигаться по параллельным траекториям в сторону презумптивной дорсальной губы (рис. 3, в) и конвергировать к дорсомедиальной линии (рис. 3: ср. г и д). Соответственно, образец сжимался в направлении конвергенции и вытягивался вдоль презумптивной переднезадней оси. Позже образцы резко изгибались (рис. 4, а).

В серии 3, б клетки двигались к краям эксплантатов (рис. 3, е), и в том же направлении (вдоль длинной оси) вытягивались ФД-метки, указывая на конвергенцию клеток перпендикулярно длинной оси образца (рис. 3, ср. ж и з). Таким образом, конвергенция клеток и, соответственно, вытяжение эксплантатов в сериях а и б проходили во вза-

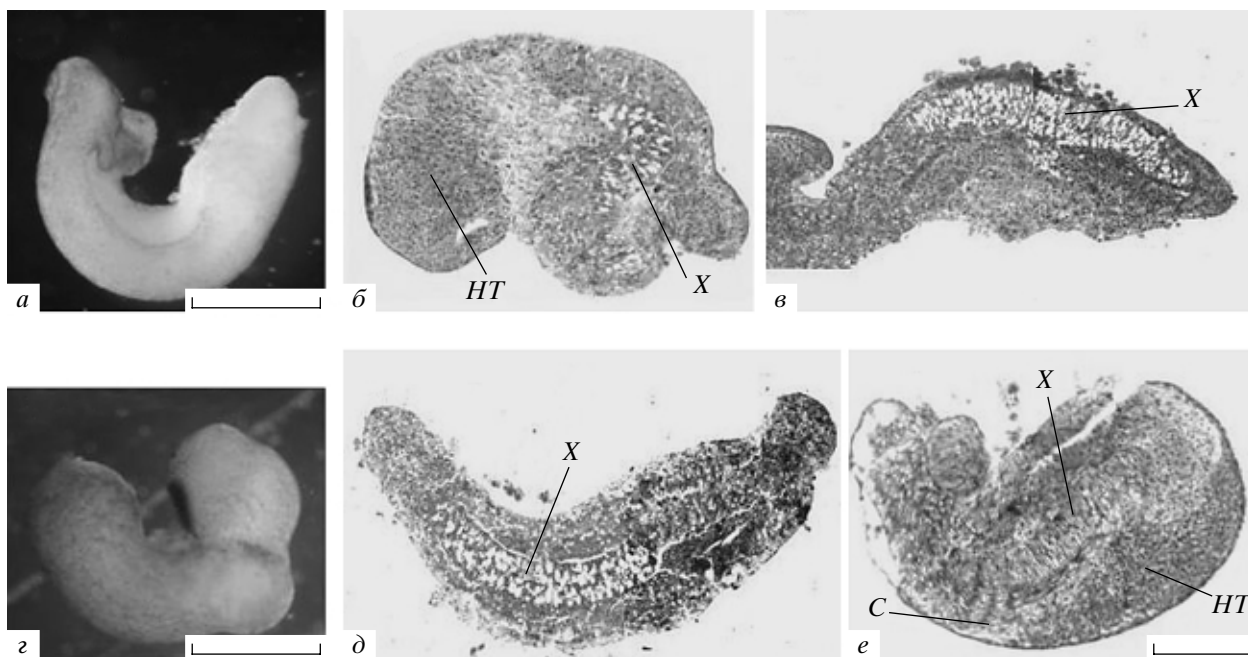


Рис. 4. Результаты опытов 3, а (а–в) и 3, б (г, д) через 20–24 ч инкубации. Образец е развился из вентральной половины МЗ. С – сомиты, остальные обозначения см. на рис. 2. Масштаб: а, г – 1 мм, б, в, д, е – 200 мкм.

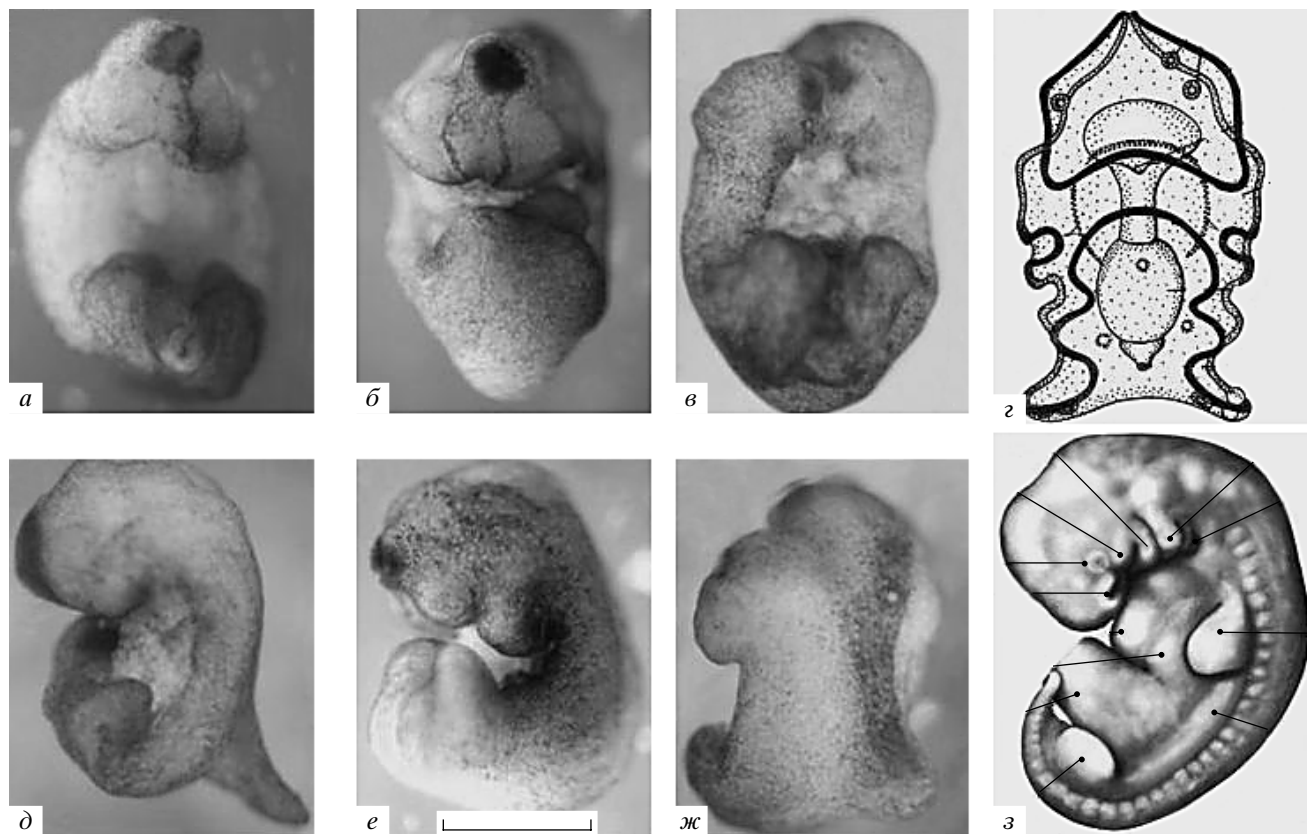


Рис. 5. Результаты ретрансплантации супрабластопоральной области (СБО) без поворота (а) и с поворотом на 90° (б, е) и сепаровки СБО в направлении на бластопор (в, ж) и от бластопора (д) через 20–24 ч после операций в сравнении с личинкой (бипинарией) иглокожих (z) и зародышем позвоночного (z). а–z – фронтальные, д–z – сагиттальные проекции. Масштаб: 1 мм.

имно-перпендикулярных направлениях: образцы а вытягивались вдоль, а б – поперек продольной оси нормального зародыша. Отметим, что конвергенция в образцах б протекала в несколько раз медленнее, чем у а (рис. 3). Однако через 24 ч после операции гистологическая структура образцов обеих серий существенно не различалась. Если в образцах опыта 1 недифференцированные клетки занимали в среднем более половины площадей ($54 \pm 14\%$), то в образцах опыта 3 всего $5 \pm 6\%$ площадей ($p = 0.003$), причем у шести образцов вообще все клетки вовлекались в осевые дифференцировки. Как правило, в опыте 3 наблюдали мощные и неразрывные, хотя и изогнутые, хорды, простирающиеся вдоль всего образца, и более локальные, примыкающие к хордам массивы нейральной ткани и мезодермальных сомитов (рис. 4, б и в, д и е). Мощные хорды возникали и в тех нескольких случаях, когда эксплантировали одну только ventральную половину МЗ (рис. 4, е). Обычно все три типа осевых закладок располагались в одной плоскости, что резко отличалось от их нормального расположения, при котором линии, соединяющие в поперечной плоскости хорду с сомитами и с нервной трубкой, взаим-

но-перпендикулярны. Морфологические признаки переднезадней полярности в образцах а и б не проявлялись.

Развитие зародышей после операций на СБО (опыты 4, 5). Как целостная структура данных зародышей, так и дифференцировка их СБО имели много общих черт (рис. 5, а–в, д–ж). Во всех случаях замыкание бластопора останавливалось, он оставался открытым и вытягивался в дорсовентральном направлении. Его боковые губы удлинялись и, как правило, изгибались в парасагиттальной плоскости. Зародыши вытягивались в дорсовентральном направлении, т.е. перпендикулярно презумптивной переднезадней оси, и сильно изгибались в сагиттальной плоскости. При взгляде со стороны бластопора они явственно напоминали личинки иглокожих (рис. 5: ср. а – в и z), а при взгляде сбоку – зародыши высших позвоночных (рис. 5: ср. д – ж и z). Некоторые зародыши имели хвосты (рис. 5, д, ж), заполненные плотной массой недифференцированных клеток. Однако дорсальная губа бластопора экспериментальных образцов соответствовала головному концу зародышей высших позвоночных, а ventральная – их заднему концу, т.е. угловое несо-

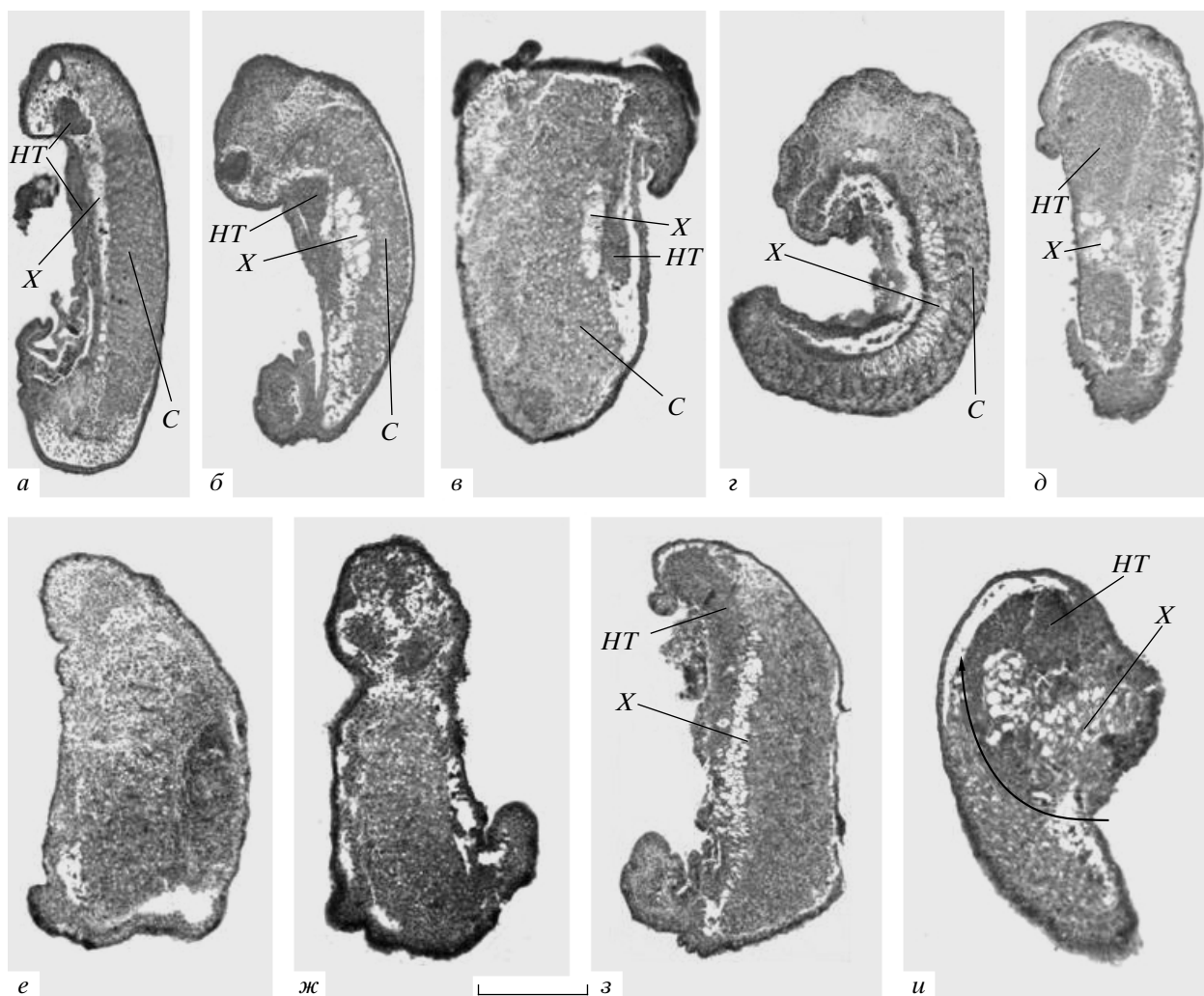


Рис. 6. Осевые структуры на парасагитальных срезах через боковые губы незамкнутого бластопора, 20–24 ч после операций. *a–в* – ретрансплантация СБО без поворота (*б* и *в* – противоположные боковые губы одного зародыша); *г, д* – ретрансплантация СБО после поворота на 90° ; *e–з* – результаты сепаровки СБО в направлении на бластопор, *и* – в направлении от бластопора (по линии изогнутой стрелки). Обозначения см. на рис. 4. Масштаб: 200 мкм.

падение морфологических осей достигало примерно 90° .

Как показали наблюдения над ФД-меткой (на рисунках не представлены), во всех сериях опытов в боковые губы незамкнутого бластопора “стекала” часть клеточного материала СБО, причем меченый материал СБО перемешивался с немеченым материалом боковых губ. Именно в последних осевые зачатки были наиболее полно развиты. При этом варибельность структуры боковых губ у зародышей одной и той же серии опытов и даже противоположных губ одного и того же зародыша могла превышать различия между образцами, относящимися к разным сериям опытов (рис. 6: ср. *a, б* и *в*; *г* и *д*). С другой стороны, полнота дифференцировки боковых губ четко коррелировала с их формой и степенью натянутости: в сильно изогнутых и натянутых об-

разцах дифференцировки были значительно более полными и четко локализованными. Наименее дифференцированными были боковые губы бластопора зародышей серии *a* (П-образная сепаровка по направлению к бластопору) (рис. 6, *e–з*). Образцы серии *б* отличались от них большим развитием неправильно изогнутых хордальных зачатков (рис. 6, *и*).

Сами ретрансплантированные или отсепарованные СБО имели крайне варибельную структуру. Они содержали обширные скопления нейральной ткани и неправильные островки хордальной ткани (рис. 7, *a–e*). Переднезадняя полярность и билатеральная симметрия в них отсутствовали (рис. 7, *б, в*). Это коррелировало с полным подавлением, сразу же после ретрансплантации или сепаровки СБО, нормальных ла-

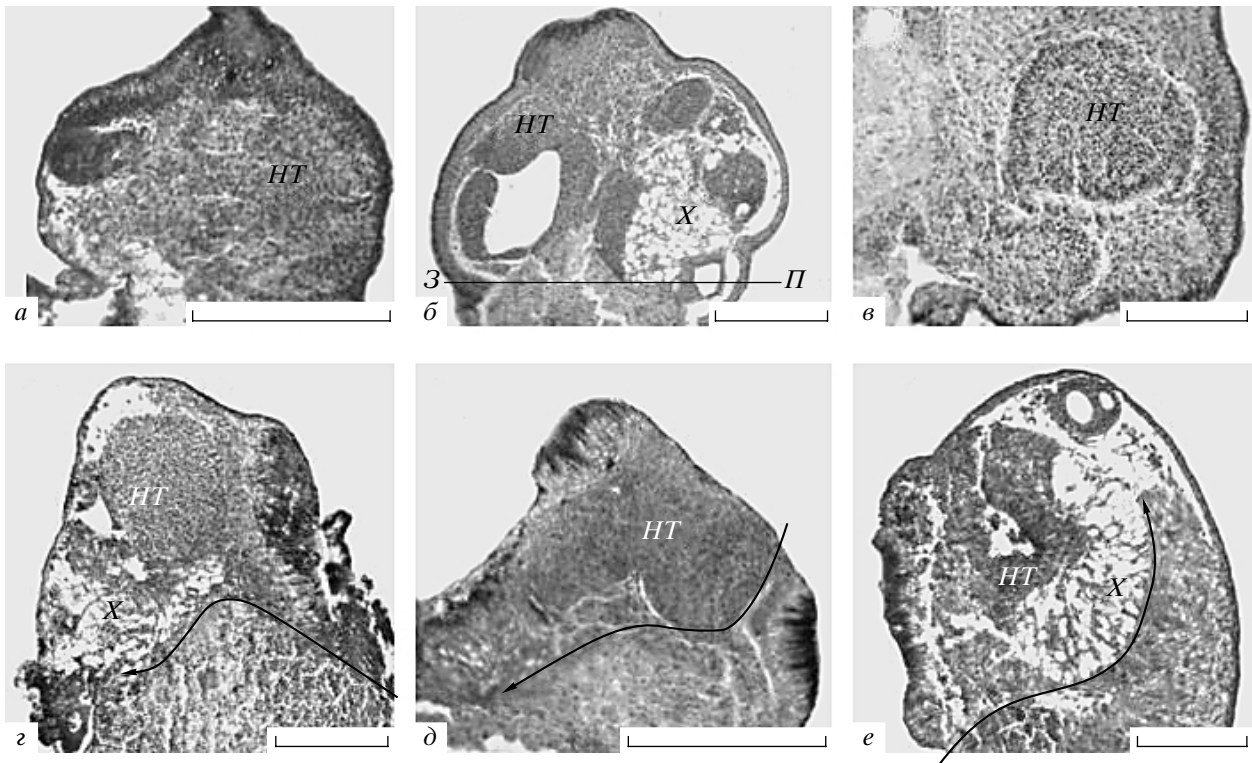


Рис. 7. Вариабельность структур СБО после их ретрансплантаций и сепаровок (20–24 ч после операций на ст. 10–10+). *a* – ретрансплантация СБО без поворота; *б, в* – с поворотом на 90°; *г, д* – сепаровки в направлении на бластопор (серия 5, *a*), *e* – от бластопора (серия 5, *б*). Изогнутые стрелки показывают направления сепаровок. Зародыши-реципиенты или отсепарованные зародыши представлены в сагиттальной (*a, в – e*) и во фронтальной (*б*) плоскостях. Соответственно, повернутый на 90° трансплантат представлен на *б* в сагитальном сечении (*З–П* – его заднепередняя ось), на *в* – в поперечной плоскости. Масштаб: *в* – 100, *a, б, г–e* – 200 мкм. Обозначения см. на рис. 2.

теромедиальных конвергентных движений клеток (наблюдения над угольными и ФД-метками).

Механогеометрические корреляции осевых дифференцировок. Просмотр всего экспериментального материала (несколько десятков различных образцов) позволил обнаружить следующие, не имеющие исключений, корреляции между механогеометрией данной области и локализацией в ней определенных осевых дифференцировок (хорды, нейральной ткани и сомитов).

а) Хорошо выраженная сплошная и прямолинейная хорда формируется только в областях с отчетливым анизотропным растяжением и вытянута вдоль направления растяжения. При этом в отсутствие эктодермы хорды образуют сильный и, как правило, одиночный изгиб. Но уже добавления лоскута вентральной эктодермы достаточно для выпрямления хорды (ср.: рис. 2, *б, в* и *з*). В областях с релаксированными натяжениями хорда или не возникает вовсе, или является аморфной (рис. 6, *д–з*).

б) В изогнутых образцах, независимо от типа опытов, направления изгибов и присутствия хорды, нейральная ткань локализуется на вогнутой (относительно сжатой), а мезодермальная (со-

митные серии) – на выпуклой (относительно растянутой) сторонах соответственно (рис. 6, *a, б, г; 7, д*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Отсутствие стабильной разметки СБО до стадии средней гастролы. Совокупность представленных выше данных говорит о том, что, по крайней мере, до стадии средней гастролы (ст. 11) в СБО и других отделах МЗ сколько-нибудь стабильная разметка на презумптивные зачатки отсутствует. Действительно, в изолированных МЗ (опыт 1) осевые зачатки расположены совершенно беспорядочно, а большая часть ткани имеет паренхимную структуру. В МЗ, разрезанных по дорсальной средней линии (опыт 3, *б*), осевые зачатки ориентируются вдоль оси эксплантата, т.е. перпендикулярно своему презумптивному положению, а в МЗ, разрезанных по вентральной средней линии (опыт 3, *a*), – поперек его оси, т.е. в презумптивном направлении. Таким образом, на одном и том же клеточном материале, но при разных граничных условиях дифференцировка и стабильность взаиморасположения осевых зачатков могут быть совершенно различными. При

этом, хотя дифференцировка в сериях а и б значительно полнее и стабильнее, нежели в опыте 1, типичный для нормы дальний порядок все же не достигается. В частности, хорда и сопутствующие ей другие осевые закладки всегда резко изогнуты.

Объяснить неполную дифференцировку эксплантатов опыта 1 только вымыванием из них через раневую поверхность индукционных факторов невозможно, так как такое вымывание в еще большей степени должно было бы происходить в эксплантатах серий а и б опыта 2, имеющих еще одну поверхность разреза. Мы объясняем различия между результатами опытов 1 и 2 следующим образом.

Согласно гипотезе гипертонического восстановления механических напряжений (Belousov et al., 2006), клетки механически напряженного тора должны конвергировать к его меридианам, сжимая тор (см.: Kraus, 2006). При этом различные меридианы тора конкурируют между собой за клеточный материал, что приводит к неустойчивости и создает предпосылки для доминирования (в качестве клеточного аттрактора) лишь одного из них.

МЗ интактного зародыша представляет собой именно такой тор, где в норме в качестве клеточного аттрактора доминирует дорсомедиальный меридиан. Однако, как аргументируется (Belousov et al., 2006), для его полноценного функционирования необходим контакт с примыкающей анимальной эктодермой, отсутствующей в изолированных МЗ. В отсутствие эктодермы дорсомедиальный аттрактор ослабляется, и поэтому в образцах опыта 1 более или менее равноправно конкурируют все меридианы, что и объясняет слабое развитие осевых органов на дорсальной стороне и их вариабельное расположение. Но разрез по вентральной средней линии (опыт 3, а), освобождая края эксплантата, устраняет механическую конкуренцию между меридианами, позволяя более эффективно проявиться даже слабым начальным преимуществам дорсомедиального меридиана как центра стягивания клеточного материала. При разрезе по дорсальной средней линии (опыт 3, б) происходит сначала то же самое, т.е. клеточный материал движется к дорсомедиальному меридиану, однако последний теперь разделен на две части, находящиеся на противоположных краях эксплантата. К этим краям и движется клеточный материал, создавая продольные натяжения, способствующие (Belousov et al., 2000) конвергенции клеток к длинной оси эксплантатов. Напомним, что в данном случае конвергируют клетки вентральных областей МЗ, в норме этого не делающие. Вероятно, это и объясняет медленность конвергенции в образцах опыта б по сравнению с а. В любом случае именно направление конвергенции определяет вытяжение осевых органов серии

б вдоль длинной оси эксплантатов, т.е. перпендикулярно к образцам серии а. Таким образом, достаточно глубокие различия в степени дифференцировки и расположении осевых зачатков в опытах 1, 3, а и б сводятся только к разным механическими краевыми условиями, поскольку клеточный материал во всех этих сериях один и тот же.

На лабильность “предразметки” указывают и результаты манипуляций с СБО (опыты 4, 5). Во-первых, после ретрансплантации СБО с поворотом на 90° или после сепаровки СБО (особенно в направлении на бластопор, опыт 5, а) расположение нейральных и хордальных тканей утрачивает какой бы то ни было дальний порядок, включая переднезаднюю полярность или двустороннюю симметрию (рис. 6, 7). Мы связываем это с тем, что СБО, являющаяся в норме “узлом натяжений” всего зародыша, в данных опытах подвергается сильной релаксации. Во-вторых, как показали опыты с ФД-меткой, весьма полный комплекс осевых органов возникает в боковых губах бластопора из перемешанного местного и СБО-материала (напомним в связи с этим обсуждавшиеся во введении данные: Niehrs et al., 1993). В-третьих, порядок взаиморасположения осевых зачатков в боковых губах в парасагиттальной проекции (ближе всего к желточной пробке – нейральные ткани, затем идет хорда и, наконец, в той же плоскости – сомиты) совершенно не соответствует картам расположения этих зачатков, согласно которым ближе всего к желточной пробке расположен зачаток хорды, за ним идет нейральный зачаток, а сомитная закладка расположена вентральнее и в другой плоскости.

Связь разметки МЗ с коллективными клеточными движениями и механическими напряжениями. Легко видеть, что полнота и порядочность разметки МЗ четко коррелируют с наличием и ориентацией клеточных движений и, прежде всего, с конвергенцией клеток к некоторой оси. Действительно, неполная дифференцировка и отсутствие дальнего порядка в эксплантатах МЗ (опыт 1) коррелируют с полным отсутствием конвергентных движений и заменой их дивергентными (рис. 3: ср. а и б). Напротив, при наличии конвергенции (но независимо от ее ориентации) в опытах 3, а и б на том же клеточном материале возникают хорошо развитые и четко ориентированные осевые дифференцировки. Возникновение последних в боковых губах бластопора связано с тем, что в опытах 4, 5 именно эти губы становятся областями конвергентных клеточных движений (обнаруживаемых по ФД-метке).

Наши данные позволяют допустить прямую связь между механическими напряжениями сжатия–растяжения, устанавливающимися в ходе

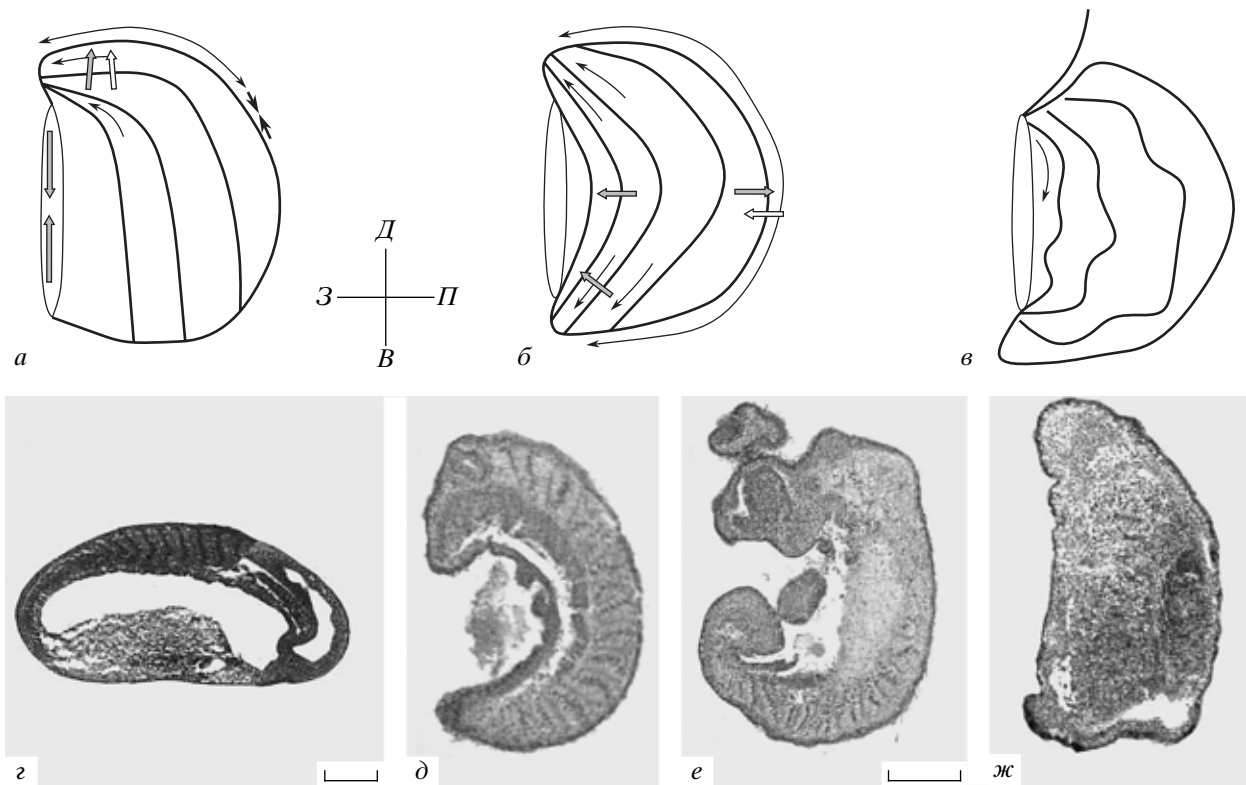


Рис. 8. Схемы полей механических натяжений и клеточных движений (*а–в*) и соответствующие морфологии (*г–ж*) при нормальном развитии (*а, г*), при операциях, порождающих фенотип *spina bifida* (*б, д, е*) и при сильной релаксации СБО в опытах 5 (*в, ж*).

г – сагиттальный срез нормального зародыша на ст. 20; *д, е* – парасагиттальный и центральный (сагиттальный) срезы зародыша, соответствующего *б*; *ж* – срез через боковую губу зародыша, соответствующего *в*. (—) – главные натяжения; (↔) – зоны преимущественных растяжений поверхности; (⇒⇒) – направления конвергентных клеточных движений; (↗) – движения клеток вверх по градиентам натяжений (тензотаксис); (→←) – зона сжатия, соответствующая будущей головной области. З–П, Д–В – расположение заднепередней и дорсовентральной осей. Масштаб: 200 мкм.

морфогенетических клеточных движений, и типом осевых дифференцировок. Более чем на 20 изогнутых образцах, относящихся к различным типам наших опытов, а также на двух образцах, заимствованных из старых работ по эмбриональной индукции в эксплантатах (Саксен, Тойвонен, 1963; рис. XXVI, XXVIII) соблюдается следующая закономерность: в вогнутом (относительно сжатом) слое эксплантата располагаются нейральные производные, а в выпуклом (относительно растянутом) – мезодермальные сомиты. Недавние работы по механозависимой экспрессии генов в развитии дрозофилы (Brouzes, Farge, 2004) указывают на прямую корреляцию между паттернами механических напряжений и клеточными дифференцировками.

Гастрюляция находится под непрерывным контролем механических напряжений. Как было показано, даже после немедленной аутотрансплантации СБО (опыт 4) или после сепаровки СБО в направлении blastopore (опыт 5, *а*) нормальная гастрюляция останавливается и заменя-

ется развитием по типу так называемой *spina bifida*. Общее между обоими типами воздействий то, что они вызывают релаксацию механических напряжений в области дорсальной губы blastopore, которая в норме в течение всей гастрюляции является главным узлом натяжений всего зародыша. Благодаря механически напряженному состоянию она обеспечивает движение к ней клеток по механизму тензотаксиса (Белоусов и др., 1999), а также конвергенцию клеток к дорсомедиальной оси (Belousov et al., 2006). В этом смысле дорсальная губа blastopore является не только химическим индуктором, но и механическим “организатором” (согласно терминологии Шпемана) клеточных движений. Между тем даже кратковременная релаксация СБО необратимо лишает ее этой роли, и доминирующим узлом натяжений становится вентральная губа. Это вызывает перераспределение линий натяжения вдоль всего тела зародыша (рис. 8: ср. *а* и *б, в*). Поскольку конвергенция клеток идет перпендикулярно основным линиям натяжений (Belousov et al., 2006), она теперь лока-

лизована в боковых губах бластопора, что и задает фенотип *spina bifida*. Кроме того, возможна конвергенция клеток к медиальной оси, противоположной бластопору (справа на рис. 8, б, в), поскольку она тоже растягивается. Таким образом, клеточные движения при гастрюляции оперативно контролируются механическими напряжениями, даже кратковременное перераспределение которых необратимо модифицирует ход развития.

Самоорганизация в развитии Xenopus laevis. Хотя в настоящее время прямо не отрицается, что развивающийся зародыш – это сильно нелинейная самоорганизующаяся система (Романовский и др., 1984; Черданцев, 2003), методология теории самоорганизации еще очень редко используется в исследовательской практике. Зародыш на практике часто рассматривается как инертная линейная система, лишенная внутренней динамики и слепо (по принципу “on-off”) подчиняющаяся влиянию специфических факторов. В значительной мере такое положение связано с недостаточной осведомленностью об эмпирически проверяемых критериях, позволяющих разграничить поведение линейных (инертных) и нелинейных (самоорганизующихся) систем.

Главным критерием самоорганизации является способность системы к автономному самосложнению (понижению порядка симметрии). Но иногда этот критерий оказывается чересчур общим и трудно привязываемым к определенной структуре или стадии развития. Укажем поэтому на другие критерии, достаточные для отнесения данной системы к категории самоорганизующихся.

1. Возрастание вариабельности (вплоть до хаотичности) при выключении некоторых (как правило, делокализованных и малоспецифических) параметров.

2. Возрастание дальнего порядка при увеличении размеров системы.

3. Ограниченное число дискретных ответов на неспецифические возмущения.

Рассмотрим, в какой мере представленные выше данные отвечают этим критериям.

1. Высокая вариабельность и утрата дальнего порядка в расположении осевых зачатков является правилом для опыта 1 и нередко отмечается в боковых губах бластопора в сериях 4 и 5 (особенно серия 4, а). Заметим, что существенная вариабельность, иногда имитирующая гастрюляцию и нейруляцию (рис. 2, д, е), но никогда не приводящая к образованию полноценных осевых структур, характерна для эксплантатов эктодермы ранней-средней гастрюлы, оставшихся за вычетом МЗ.

2. При увеличении общих размеров системы за счет совмещения двух порознь вариабельных

компонентов – МЗ и эктодермы – дальний порядок существенно возрастает, и организация зародыша приближается к нормальной (рис. 2, ж, з). Один из аспектов такого порядка – приобретение хордой прямолинейности. Как видно из результатов опытов 1 и 3, а, б, прямолинейность не является имманентным свойством хордального зачатка. Это понятно, поскольку строящая хорду конвергентная интеркаляция клеток сама по себе должна усиливать любой случайный изгиб зачатка. С другой стороны, если закладка хорды накрывается фрагментом эктодермы любого происхождения (как дорсальной, так и вентральной), между ними устанавливается связь “+, +”, способствующая растяжению обоих зачатков (Belousov et al., 2006) и элиминирующая случайные изгибы хорды.

3. Как показано выше, остановка гастрюляции в результате манипуляций с СБО отнюдь не останавливает ход развития, но преобразует весь зародыш в совершенно необычные для данного вида дискретные фенотипы, удивительно напоминающие узловые стадии развития таксономически удаленных форм (личинки иглокожих, зародыши высших позвоночных). При этом заднедорсальная область экспериментальных фенотипов соответствует головной области зародышей позвоночных, т.е. гомология между морфологическими осями фенотипов и их прототипов отсутствует. Это указывает на весьма высокую структурную устойчивость (канализованность, креодичность) форм как таковых, независимо от их материального состава и даже архитектоники. Такая устойчивость может поддерживаться положительными обратными связями в полях натяжений, приводящими, в частности, к усилению начальной кривизны и к трансформации пассивного растяжения в активное (Belousov et al., 2006). Роль натяжений подтверждается тем, что их сильная релаксация в опытах серии 5, а приводит к увеличению вариабельности вплоть до потери способности к типичным дифференцировкам.

Выполнение критериев 1–3 позволяет говорить о ведущей роли самоорганизации в развитии *Xenopus*. Исходя из этого можно предложить следующую схему механозависимой самоорганизации морфогенеза осевых зачатков. Исходным возмущением, запускающим морфогенез, является зарождение анизотропных натяжений вдоль любого направления *aa*. Морфогенез начинается с интеркаляции клеток перпендикулярно *aa* и, следовательно, с активного вытяжения хорды в направлении *aa*. Если хорда не имеет контактов с эктодермой, то ее прямолинейная форма неустойчива и она изгибается. Тогда с выпуклой стороны изгиба возникает зона растяжения, где формируются мезодермальные сомиты, а с вогнутой – зона сжатия, где формируется нервная ткань. Если же (как в норме) хорда контактирует

с активно растягивающейся эктодермой, стабилизирующей ее прямолинейность, то основная зона сжатия локализуется спереди от растущей хорды, где и формируется наиболее мощный массив нервной (переднемозговой) ткани. Другие, более узкие зоны сжатия в направлении, перпендикулярном линии *aa*, возникают в эктодерме, расположенной над хордой сбоку от этой линии, поскольку растяжение эктодермы вдоль *aa* также осуществляется путем интеркаляции. В этих зонах формируется туловищный отдел нервной системы (заметим, что точно по линии *aa*, где интеркаляции и, следовательно, сжатия нет, нейральные дифференцировки отсутствуют, а возникает notoplate). Наряду с этим хорда растягивает прилежащую осевую мезодерму, способствуя формированию там сомитов. С этой точки зрения основная роль индукционных факторов должна состоять не в прямом обеспечении разметки осевых зачатков, а в сенсбилизации синтетического аппарата клеток (включая экспрессию тканеспецифичных генов) к относительно слабым механическим воздействиям. Как раз такую делокализованную сенсбилизацию можно обозначить как компетентность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белоусов Л.В., Лучинская Н.Н., Зарайский А.Г. Тензотаксис – коллективное движение эмбриональных клеток вверх по градиентам механических натяжений // Онтогенез. 1999. Т. 30. № 3. С. 220–228.
- Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернавский Д.С. Математическая биофизика. М.: Наука, 1984. 304 с.
- Саксен Л., Тойвонен С. Первичная эмбриональная индукция. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1963. С. 235–237.
- Черданцев В.Г. Морфогенез и эволюция. М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2003. 360 с.
- Arizumi T., Asashima M. *In vitro* induction systems for analyses of amphibian organogenesis and body patterning // Int. J. Devel. Biol. 2001. V. 45. P. 273–279.
- Belousov L.V., Lakirev A.V., Naumidi I.I. The role of external tensions in differentiation of *Xenopus laevis* embryonic tissues // Cell Dif. Devel. 1988. V. 25. P. 165–176.
- Belousov L.V., Luchinskaia N.N., Stein A.A. Tension-dependent collective cell movements in the early gastrula ectoderm of *Xenopus laevis* embryos // Devel. Genes Evolution. 2000. V. 210. P. 92–104.
- Belousov L.V., Luchinskaia N.N., Ermakov A.S., Glagoleva N.S. Gastrulation in amphibian embryos, regarded as a succession of biomechanical feedback events // Int. J. Devel. Biol. 2006. V. 50. P. 113–122.
- Bouwmeester T., Kim S., Sasai Y. et al. Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer // Nature. 1996. V. 382. № 6592. P. 595–601.
- Brouzes E., Farge E. Interplay of mechanical deformations and patterned gene expression in developing embryos // Curr. Opin. Genet. Devel. 2004. V. 14. P. 367–374.
- Cho K.W., Blumberg B., Steinbeisser H., De Robertis E.M. Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene goosecoid // Cell. 1991. V. 67. № 6. P. 1111–1120.
- Christian J.L., Moon R.T. Interaction between *Xwnt-8* and Spemann organizer signaling pathways generate dorsoventral pattern in the embryonic mesoderm of *Xenopus* // Genes Devel. 1993. V. 7. P. 13–28.
- Dale L., Slack J.M.W. Fate map for the 32-cell stage of *Xenopus laevis* // Development. 1987. V. 99. P. 527–551.
- Gilbert S.F. Developmental biology. Sunderland: Sinauer Ass., Inc., 2003. 838 p.
- Green J.B.A., Smith J.C., Gerhart J.C. Slow emergence of a multithreshold response to activin requires cell-contact-dependent sharpening but not prepattern // Development. 1994. V. 120. P. 2271–2278.
- Gurdon J.B., Harger P., Mitchell A., Lemaire P. Activin signaling and response to a morphogen gradient // Nature. 1994. V. 311. P. 487–492.
- Heasman J. Patterning the *Xenopus* blastula // Development. 1997. V. 124. P. 4179–4191.
- Kraus Y.A. Morphomechanical programming of morphogenesis in Cnidarian embryos // Int. J. Devel. Biol. 2006. V. 50. P. 267–275.
- Kumano G., Smith W.C. Revisions to the *Xenopus* gastrula fate map: implications for mesoderm induction and patterning // Devel. Dynamics. 2002. V. 225. P. 409–421.
- Lemaire P., Garrett N., Gurdon J.B. Expression cloning of Siamois, a *Xenopus* homeobox gene expressed in dorsal-vegetal cells of blastulae and able to induce a complete secondary axis // Cell. 1995. V. 81. № 1. P. 85–94.
- Lopashov G.V. Die Entwicklungleistungen des Gastrulaektodermis in Abhängigkeit von Veränderungen der Masse // Biol. Zbl. 1935. Bd. 55. S. 606–615.
- Niehrs C., Keller R., Ken W. et al. The homeobox gene *goosecoid* controls cell migration in *Xenopus* embryos // Cell. 1993. V. 72. P. 491–503.
- Nieuwkoop P., Faber J. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1956. 243 p.
- Onichtchouk D., Gawantka V., Dosch R. et al. The *Xvent-2* homeobox gene is part of the BMP-4 signalling pathway controlling [correction of controlling] dorsoventral patterning of *Xenopus* mesoderm // Development. 1996. V. 122. № 10. P. 3045–3053.
- Schroeder K.E., Condic M.L., Eisenberg L.M., Yost H.J. Spatially regulated translation in embryos: asymmetric expression of maternal *Wnt-11* along the dorsal-ventral axis in *Xenopus* // Devel. Biol. 1999. V. 214. № 2. P. 288–297.
- Shih J., Keller R. Patterns of cell motility in the organizer and dorsal mesoderm of *Xenopus laevis* // Development. 1992. V. 116. P. 915–930.
- Smith J.C., Price B.M., Green J.B. et al. Expression of a *Xenopus* homolog of *Brachyury* (T) is an immediate-early response to mesoderm induction // Cell. 1991. V. 67. № 1. P. 79–87.

Smith W.C., McKendry R., Ribisi S.J., Harland R.M. A nodal-related gene defines a physical and functional domain within the Spemann organizer // *Ibid.* 1995. V. 82. № 1. P. 37–46.

Sokol S.I. The pregastrula establishment of gene expression pattern in *Xenopus* embryos: requirements for local cell in-

teractions and for protein synthesis // *Devel. Biol.* 1994. V. 166 P. 782–788.

Yamada T. Caudalization by the amphibian organizer: *brachyuri*, convergent extension and retinoic acid // *Development.* 1994. V. 120. P. 3051–3062.

Role of Cooperative Cell Movements and Mechano-Geometric Constrains in Patterning of Axial Rudiments in *Xenopus laevis* Embryos

L. V. Belousov, E. G. Korvin-Pavlovskaya, N. N. Luchinskaya, and E. S. Kornikova

Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119892 Russia

E-mail: morphogenesis@yandex.ru

Abstract—The role of cooperative cell movements has been explored in establishment of regular segregation of the marginal zone of *Xenopus laevis* embryos into the main axial rudiments: notochord, somites and neural tissue. For this purpose, the following operations were performed at the late blastula–early gastrula stages: (1) isolation of marginal zones, (2) addition of the ventral zone fragments to the marginal zones, (3) dissection of isolated marginal zones along either ventral (a) or dorsal (b) midlines, (4) immediate retransplantation of excised fragments of the suprablastoporal area to the same places without rotation or after 90° rotation, (5) П-shaped separation of the suprablastoporal area either anteriorly or posteriorly. In experiments 1, 4, and 5, lateromedial convergent cell movements and differentiation of the axial rudiments were suppressed. In experiments 4 and 5, cell movements were reoriented ventrally, the entire embryo architecture was extensively reconstructed, and the axial rudiments were relocated to the blastopore lateral lips. In experiment 3, convergent cell movements were restored and oriented either towards the presumptive embryo midline (a), or in the perpendicular direction (b). In both cases, well developed axial rudiments elongated perpendicularly to cell convergences were formed. If the areas of axial rudiment formation were curved, mesodermal somites and neural tissue were always located on the convex (stretched) and concave (compressed) sides, respectively. We conclude that no stable prepatterning of the marginal zone takes place until at least the midgastrula stage. This prepatterning requires cooperative cell movements and associated mechano-geometric constrains.

Key words: *Xenopus laevis*, self-organization, gastrulation, axial rudiments, cell movements, mechanical tensions.