

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 591.39:576.356.31

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СИНХРОНИЗАЦИИ ЦИКЛОВ КЛЕТОЧНОЙ РЕПРОДУКЦИИ У РАННИХ ЗАРОДЫШЕЙ КОСТИСТОЙ РЫБЫ *Danio rerio* (Teleostei)

© 2007 г. В. И. Ефремов, Г. М. Глуздикова, Е.В. Мухачёв

Санкт-Петербургский государственный университет

199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

E-mail: sme@SE16567.spb.edu

Поступила в редакцию 28.03.06 г.

Окончательный вариант получен 13.11.06 г.

Для изучения роли синхронности клеточной пролиферации в эмбриональном развитии предпринята попытка создать модельную систему на основе искусственной синхронизации митотических циклов с помощью обратимого блокирования митозов у зародышей *Danio rerio*. Дехорионизированные и интактные зародыши на стадиях 512-клеточной бластулы и 75%-ной эпиболии обрабатывали нокодазолом в разных концентрациях с последующей отмывкой через разные сроки экспозиции. Показаны преимущества работы на дехорионизированных зародышах, у которых полноценный блок митозов удается получать с помощью низких доз митостатика (0.5–1.0 мкг/мл). Снятие блока митозов во всех сериях экспериментов начинается спустя некоторое время после начала отмывки от ингибитора. Эта инерция зависит как от избранной концентрации нокодазола, так и от длительности обработки. Значительное ускорение выведения митостатика наблюдается лишь при пятикратной (и более) смене промывочной среды, содержащей диметилсульфоксид. В результате проведенного исследования установлены условия получения у зародышей *Danio rerio* на стадиях гастрюлы и раннего органогенеза парасинхронной клеточной популяции с пиком митозов, достигающим 17.2%.

Ключевые слова: *Danio rerio*, пролиферация, клеточный цикл, композиция клеточных популяций, нокодазол, блок митозов, К-митозы, синхронизация.

Хорошо известно, что в раннем развитии позвоночных на стадии средней бластулы резко изменяется физиологическое состояние всей клеточной системы развивающегося зародыша (Нейфах, 1959, 1961). Эта трансформация получила название “перехода на стадии средней бластулы” (midblastula transition, MBT), (Newport, Kirschner, 1982). Такой переход предопределяет начало важнейших морфогенетических преобразований в эмбрионе, поскольку в это время клетки приобретают двигательную активность. Вместе с тем происходящим во время MBT изменениям предшествует, а иногда их сопровождает, быстрая перестройка организации пролиферации, затрагивающая распределение клеток зародыша по положению в митотическом цикле. Начинается десинхронизация клеточных делений (Дондуа, 1983; Фое, 1989). Поскольку эти события сопряжены во времени, возникает вопрос, возможен ли морфогенез в синхронной популяции клеток зародыша или факторы, инициирующие и контролирующие морфогенез, одновременно вызывают и согласованные изменения пролиферации в реагирующей системе. Одним из подходов к решению этих вопросов может служить экспери-

ментальное изменение композиции асинхронных клеточных совокупностей зародышей. Опыты в этом направлении проводились на стадиях гастрюляции и раннего органогенеза на курином зародыше (Эль Али, 1993). Полученные результаты показали большую перспективность такого подхода для решения разных задач в рамках обозначенной проблемы.

Принципы и техника экспериментальной синхронизации детально разработаны применительно к культурам клеток *in vitro* (Адамс, 1983). Предпринимались попытки синхронизации клеток, главным образом с помощью субоптимальных температур, и у зародышей рыб на стадии бластулы (Нейфах, Ротт, 1958), и у куриных зародышей в ходе гастрюляции (Emanuelsson, 1961). Однако, по-видимому, из-за неспецифичности альтерирующего воздействия подобные работы не нашли своего продолжения. Для синхронизации культур клеток нередко используют метод обратимого блокирования разных внутриклеточных событий с помощью обработки химическими ингибиторами (цитостатиками). Для блокирования клеток в митозе чаще других митостатиков применяют колцемид или нокодазол, подавляю-

щие сборку микротрубочек веретена деления (Rieder, Palazzo, 1992).

Цель нашего исследования – разработка экспериментальной модели синхронизации митотических циклов цитостатиками, позволяющей видоизменять и контролировать композицию клеточных популяций эмбрионов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследования служили зародыши *Danio rerio*. Половозрелых особей (самцов и самок раздельно) содержали при постоянной температуре +24°C и световом режиме: свет – 13 ч, темнота – 11 ч. За 12 ч до нереста по одной самке с двумя–тремя самцами отсаживали в отдельные садки и поднимали температуру до +28°. Развивающиеся яйца нужных стадий (от 512 клеток до 75%-ного обрастания) отбирали из нерестовых садков непосредственно перед началом эксперимента. При определении стадий развития руководствовались таблицами Киммела с соавторами (Kimmel et al., 1995).

Для ингибирования митозов использовали растворы синтетического антитубулинового агента – нокодазола (“Sigma”, США) в концентрациях 0.5; 1.0; 2.0; 3.0; 5.0 и 10.0 мкг/мл. Нокодазол препятствует сборке микротрубочек в результате связывания с тубулиновыми димерами. Подавление формирования веретена приводит к аномальному поведению хромосом, т.е. к К-митозу. Выбор нокодазола был продиктован в первую очередь его относительно малой токсичностью (De Brabander et al., 1976; Kato, Tsunoda, 1992) и высокой специфичностью в отношении микротрубочек митотического веретена (Atés, Sentein, 1981). Было показано (Baumann, Sander, 1984; Strahle, Jesuthasan, 1993; Solnica-Krezel, Driever, 1994), что колcemид и нокодазол способны проникать в ткани зародышей костистых рыб через хорион яйца и плотно расположенные клетки перидермы, однако вопрос о скорости удаления этих антиметаболитов из яйца при отмывке по существу не исследовался. Учитывая это обстоятельство, были поставлены две серии опытов. В первой экспериментальным манипуляциям подвергали зародыши, развивающиеся в яйцевых оболочках; во второй проводили ферментативную дехорионизацию. Материал инкубировали в пластиковых чашках Петри (5 мл) в среде с проназой XXIII (“Sigma”, США) с активностью 4 ед/мг в концентрациях 2, 4, 10 и 20 мг/мл на двойном растворе Гольтфрета. Время, за которое зародыши освобождаются от оболочек, зависит от концентрации проназы. Из всех протестированных предпочтение было отдано раствору с концентрацией 4 мг/мл, в котором при температуре 26–28°C от оболочек за 6–8 мин освобождалось до 70–80% зародышей. Для оценки возможного влияния ферментативной обработки на эмбриогенез проводили прижизненные наблюдения за развитием дехори-

онизированных и интактных зародышей, а также их гистологический анализ. В качестве критериев сравнения служили: скорость эпиболии и сегментации, формирование глазного бокала, образование железы выплывания, начало сокращений сердца, образование форменных элементов крови, начало локомоции зародышей и ее интенсивность, пространственно-временной паттерн пигментации. Ни по одному из вышеперечисленных параметров зародыши из двух сравниваемых групп не отличались. После освобождения зародышей от оболочек производили пятикратную отмывку двойным раствором Гольтфрета. Зародыши в оболочках и дехорионизированный материал делили на две группы (опытную и контрольную).

В обеих сериях экспериментов зародыши инкубировали в растворах митостатика 30 или 60 мин. По окончании экспозиции производили пятикратную (или более) отмывку от нокодазола либо фильтрованной аквариумной водой (серия I), либо раствором Гольтфрета на 0.05%-ном ДМСО с интервалами в 5 мин (серия II). Как было установлено (Katow, 1983), ДМСО в разведениях 0.1–0.01% не влияет на развитие ранних зародышей *Danio rerio*. После 5-кратной смены зародыши инкубировали в этой среде до конца эксперимента.

Материал фиксировали жидкостью Буэна (по 5–10 зародышей на стадию), заливали в парафин и готовили серийные срезы толщиной 6 мкм. На препаратах, окрашенных гематоксилином Бёмера, Майера и триоксигематеином (для контрастного окрашивания митотического веретена), подсчитывали митозы, а также атипические митотические фигуры и пикнозы. Для оценки возможного влияния нокодазола на прохождение клетками митотического цикла определяли относительное число профаз. Подсчет производили на каждом втором срезе преимущественно в области зародышевого щитка на ранних стадиях или в нейральном зачатке на стадиях после завершения эпиболии. Полученные значения выражали в процентах от общего количества клеток. Данные были подвергнуты компьютерному анализу с использованием пакета программ вариационной статистики “Microcal Origin 6”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Серия I. Эксперименты с зародышами в яйцевых оболочках. В первом эксперименте этой серии (рис. 1) воздействию нокодазола подвергали зародыши на стадии 512 клеток по завершении 10-го клеточного цикла, т.е. первого цикла, характеризующегося асинхронностью клеточных делений (Kane, Kimmel, 1993).

Первые блокированные митозы при 30-минутной обработке раствором нокодазола в разведении 1 мкг/мл отмечены в этом опыте только через 40 мин после его начала, т.е. через 10 мин после начала отмывки. При этом, однако, полного блока не происходит, поскольку на протяжении всего

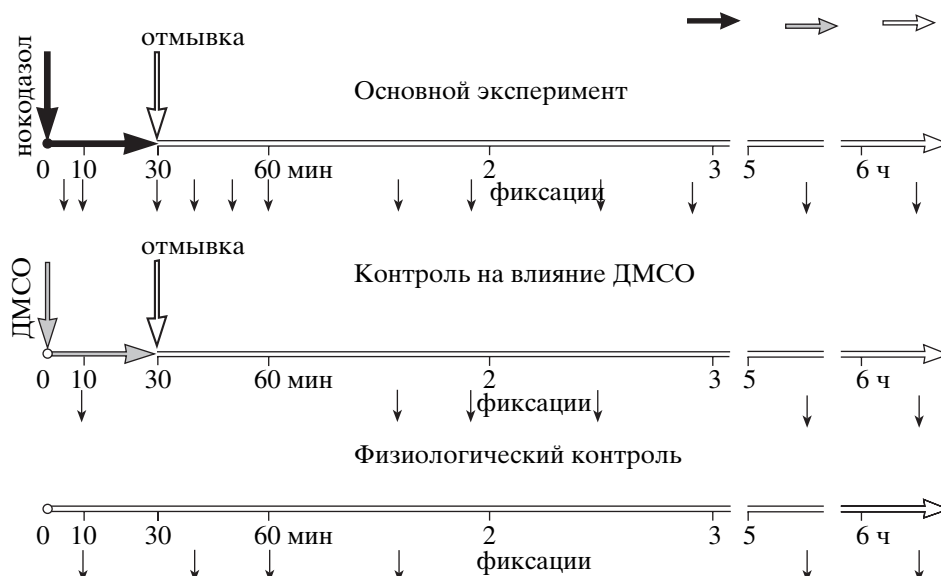


Рис. 1. Схема эксперимента 1, серия I (стадия 512 клеток, обработка нокодазолом в концентрации 1 мкг/мл в течение 30 мин). Момент погружения в раствор: нокодазола (→), ДМСО (⇒); (⇒) – начало отмывки; (→) – время фиксации материала.

эксперимента наряду с блокированными встречаются и митозы с веретеном (табл. 1). Длительная задержка появления блокированных метафаз, по-видимому, обусловлена низкой концентрацией поступившего в зародыш митостатика. Чистое время ингибирования клеточного цикла (время от момента появления первых блокированных митозов до последней регистрации их в эксперименте) составляет 1 ч 10 мин, что на 40 мин больше пребывания зародышей в растворе нокодазола (табл. 1). Таким образом, в данном случае имеет место своеобразная “инерция блока”.

В других экспериментах этой серии обработке подвергали зародыши на стадиях зародышевого щитка (6 ч после оплодотворения). Эта стадия была выбрана потому, что композиция слоя внутренних клеток бластодермы в это время характеризуется полной асинхронностью, что позволяет с большей достоверностью регистрировать наведенную синхронизацию клеток.

Во втором эксперименте использовали раствор нокодазола в концентрации 10 мкг/мл. Отмывку в

аквариумной воде с добавкой ДМСО проводили через 1 ч после начала экспозиции. Блокированные метафазы в этом опыте отмечены через 10 мин после помещения материала в активную среду; с этого же момента в бластодерме не обнаруживали нормальные митозы (кроме профаз). Очевидно, концентрация нокодазола в этом случае достаточна для остановки движения клеток по циклу. Час-тые фиксации зародышей на протяжении опыта дали возможность определить динамику нарастания количества блокированных митозов, ее описывает типичная кумулята (рис. 2, а). Судя по продолжающемуся после начала отмывки нарастанию количества К-митозов, в этом случае также имеет место “инерция блока”. Через 3–3.5 ч кривая выходит на плато, доля К-митозов при этом достигает почти 100%. Важно отметить, что в течение всего эксперимента (4 ч) не обнаружено никаких признаков выхода клеток из блокированного состояния.

Угол наклона кривой К-митозов, по-видимому, отражает истинную скорость движения клеток по митотическому циклу, на которую не влияет предпринятая обработка митостатиком. Об этом свидетельствует и динамика доли профаз у зародышей изученных стадий, практически совпадающая в контроле и опыте (рис. 2, б).

Нокодазол при концентрации в среде 10 мкг/мл сохраняется в зародыше, окруженном оболочками, несмотря на отмывку. Присутствие митостатика в клетках зародыша в течение длительного времени обуславливает невозможность деконденсации хроматина. Обратимость митостатического блока в этих условиях не достигается, но обнаруживается пикнотическое перерождение клеток, приводящее

Таблица 1. Присутствие блокированных митозов в разные сроки после культивирования интактных зародышей в растворе нокодазола (1 мкг/мл) в течение 30 мин

Сроки эксперимента, мин	Митозы		Интерфазные ядра
	К	нормальные	
30	–	+	+
40	+	+	+
110	+	+	+
165	–	+	+
345	–	+	+

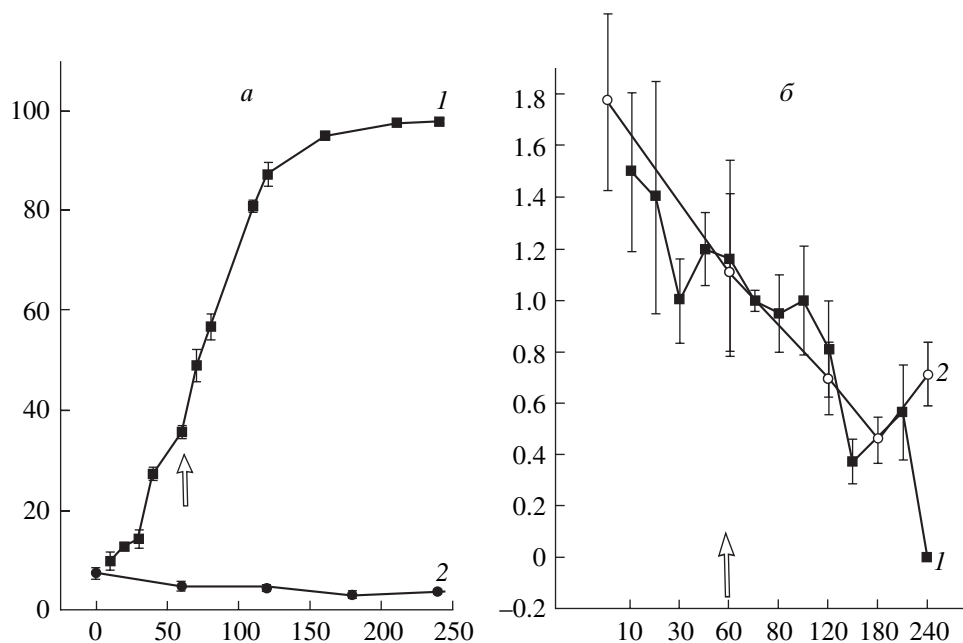


Рис. 2. Накопление К-метафаз (1) и изменение митотического индекса (физиологический контроль) (2) у зародышей на стадии зародышевого щитка, обработанных в течение 1 ч 10 мкг/мл нокодазола (а). Изменение доли профаз у экспериментальных (1) и контрольных (2) зародышей (б).

По оси абсцисс – продолжительность эксперимента, мин; по оси ординат – индекс К-митозов и митотический индекс (а) или индекс профаз (б), %.

Здесь и далее: ($\Rightarrow$) – начало отмытки от митостатика; вертикальные линии – ошибка среднего.

их к гибели, о чем свидетельствуют повсеместные очаги некрозов. Существенную роль при этом играет, по-видимому, не только высокая концентрация митостатика, но и длительность экспозиции.

Третий эксперимент аналогичен второму, но наблюдения за опытными и контрольными зародышами, а также выборочные фиксации проводили в течение 2 сут. К тому времени, когда у контрольных эмбрионов полностью завершилась эпибolia, обработанные зародыши демонстрировали лишь 75% обрастания, в дальнейшем полного покрытия желтка бластодермой так и не происходило, и, хотя перибласт замыкался по всей поверхности, развитие прекращалось и эмбрионы гибли. Эти наблюдения хорошо согласуются с результатами работ (Strahle, Jesuthasan, 1993; Solnica-Krezel, Driever, 1994), в которых описаны задержка начала и замедление (а иногда и полное подавление) процесса эпибологии у эмбрионов *Danio rerio* после обработки нокодазолом. При обработке колцемидом в высоких концентрациях зародышей *Danio rerio* более ранних стадий (Baumann, Sander, 1984) были получены аналогичные результаты. У ранних куриных зародышей, обработанных нокодазолом или колцемидом, также наблюдалось торможение разрастания бластодермы над желтком (Mareel et al., 1984; Эль Али, 1993).

Поскольку, как выяснилось, условия во втором и третьем экспериментах не обеспечивают возможность снятия митотического блока и, более

того, вызывают массовые пикнозы и гибель эмбрионов, был поставлен четвертый опыт с обработкой зародышей тех же стадий нокодазолом в концентрациях 3 и 5 мкг/мл в течение 30 мин. Эмбрионы после обработки митостатиком выдерживали 3 ч в растворах ДМСО, а затем переносили в фильтрованную аквариумную воду. За развитием наблюдали до момента вылупления или гибели зародыша.

Наращение количества митозов (в начале эксперимента это в основном К-митозы) начинается с достоверно разного исходного уровня (рис. 3). Прирост К-митозов в обоих экспериментах продолжается и после начала отмытки. По прошествии 1 или 2 ч происходит резкое падение количества митозов в обоих случаях. Таким образом, “инерция блока” зависит от концентрации митостатика и в данном случае в отличие от эксперимента с 10 мкг/мл не превышает 1.5 ч. Видно, что в условиях данного эксперимента накопление К-митозов не достигает 100% и это прежде всего связано с тем, что фактическая экспозиция с нокодазолом здесь оказалась существенно короче средней величины генерационного времени (2 ч 30 мин) (Ефремов, Мухачёв, неопубл. данные). Отмеченное падение доли митотических фигур в клеточных совокупностях зародышей изученных стадий есть следствие перехода клеток из заблокированного состояния в интерфазное. Клетки после снятия ингибирующего влияния проходят очень корот-

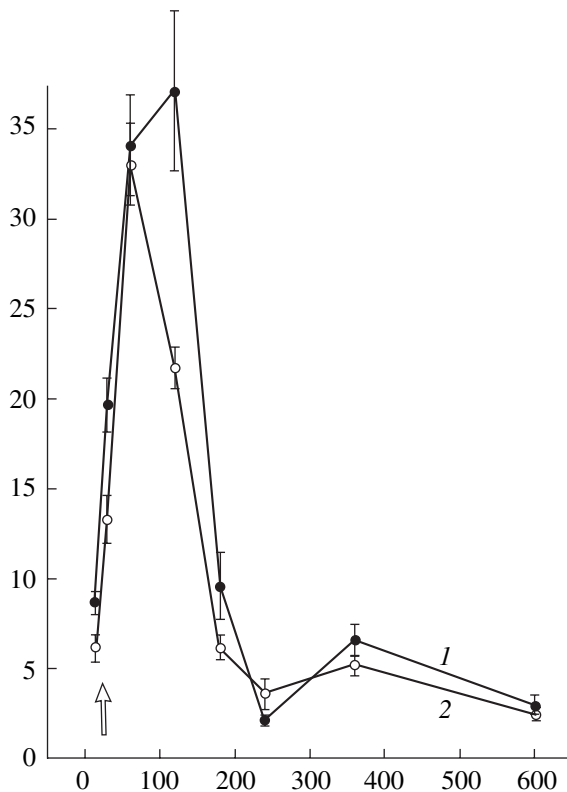


Рис. 3. Изменение индекса митозов в эксперименте 4, серия I (стадия зародышевого щитка, обработка в течение 0.5 ч нокадазолом в концентрации: 5.0 (1) и 3.0 (2) мкг/мл). По оси абсцисс – продолжительность эксперимента, мин; по оси ординат – доля митозов.

кую промежуточную фазу так называемых “рыхлых” митозов (Эль Али, 1993).

Второй, менее выраженный пик (уже нормальных митозов), по-видимому, вполне реален в случае с концентрацией 5 мкг/мл (различия достоверны). Сходное затухание колебательного процесса клеточных делений в первом же цикле после снятия блока было показано в подобных экспериментах на курином эмбрионе (Эль Али, 1993). Создается впечатление, что у эмбрионов существует механизм быстрой десинхронизации митотических циклов в клеточных системах, включающий на ранних стадиях развития незадолго до или во время MBT, в ходе так называемых метахронных митотических циклов (Satoh, 1977; Ротт, 1987).

Через 3 ч в клеточных популяциях зародышей появляются пикнозы, число которых нарастает к концу эксперимента, но в этих опытах некротический процесс никогда не принимает таких масштабов, как при длительной экспозиции с нокадазолом.

Серия II. Эксперименты с дехорионизированными зародышами. В ходе первого опыта из этой серии (2 мкг/мл нокадазола; 1 ч; рис. 4) мы не наблюдали ни нормальных митозов (кроме профаз), ни переходных фигур. Более того, с течением времени компактизация хроматина К-митозов

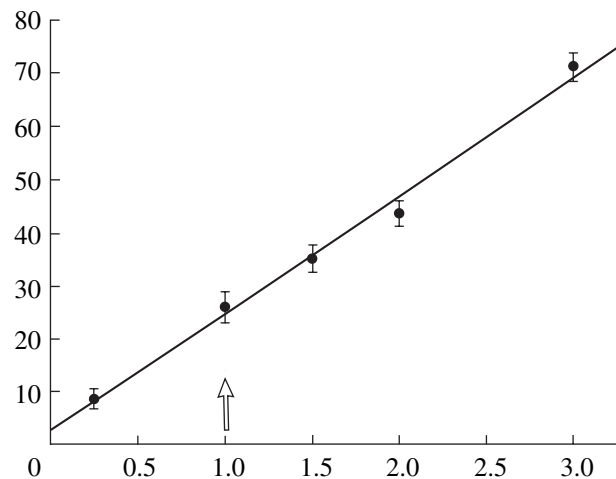


Рис. 4. Изменение доли К-митозов в эксперименте 1, серия II (стадия 75%-ной эпиболии, обработка 1 ч 2 мкг/мл нокадазола).

Здесь и на рис. 7: по оси абсцисс – продолжительность эксперимента, ч; по оси ординат – доля К-митозов, %.

усиливается. Снятия блока в этих условиях не происходило, но через 3 ч эксперимента в тканях зародыша обнаруживаются пикнотические клетки (рис. 5). Причиной этого может быть не только чрезмерная концентрация митостатика, но и неадекватное время обработки. Длительная задержка появления первых блокированных метафаз, характерная для опытов с зародышами в оболочках, в этом и в последующих экспериментах не наблюдалась. Это свидетельствует о том, что хорион в большей мере, чем перидерма, является барьером для прохождения нокадазола. Определенное по уравнению линейной регрессии ($y = 2.5 + 22.2x$) прироста блокированных митозов (рис. 4) среднее время удвоения клеточных популяций нейральной области перед началом сомитогенеза равно 4.5 ч.

Следующие эксперименты были призваны уточнить, какой фактор (концентрация митостатика или длительность обработки) более значим и какие условия необходимы для достижения обратимости митотического блока. Концентрация нокадазола в экспериментах была снижена в четыре и два раза (0.5 и 1.0 мкг/мл) соответственно. Время экспозиции также было сокращено в два раза и составило 30 мин. Динамика накопления К-митозов в этих экспериментах оказалась одинаковой. График (рис. 6) отражает изменение процента К-митозов в опыте с концентрацией нокадазола 0.5 мкг/мл. Первые блокированные митозы зарегистрированы уже через 5 мин после помещения зародышей в активный раствор, однако затем в течение как минимум 25 мин доля блокированных митозов не изменялась. В последующем уже после 5-кратной отмывки доля К-митозов прогрессивно увеличивалась, достигая 33%

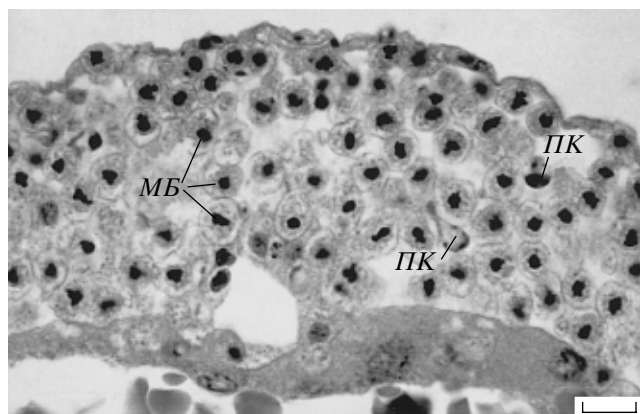


Рис. 5. Фрагмент парасагитального среза через зародыш. Эксперимент 1, серия II, 3 ч после начала эксперимента. Подавляющее большинство клеток находится в состоянии митотического блока (МБ), видны отдельные пикнотические клетки (ПК). Окраска три-оксигематеином. Масштаб: 10 мкм.

через 2 ч после начала эксперимента. Задержку накопления К-митозов (лаг-период) сразу после добавления митостатиков (например, колхицина или колцемида) в культурах клеток (Puck, Steffen, 1963; Cleaver, 1967; Адамс, 1983) объясняют тем, что часть клеток при добавлении препарата уже находится в митозе; эти клетки не блокируются, заканчивают митоз и входят в интерфазу. Иногда такая ситуация бывает сопряжена с недостаточной концентрацией выбранного митостатика (Taylor, 1965). Поскольку ничего похожего в опытах на интактных зародышах, развивающихся в воде, мы не наблюдали, то можно думать, что обнаруженный лаг-период связан с реакцией “привыкания” клеточной системы зародыша к новой физиологической среде, какой является раствор Гольтфретера. Подобные факты хорошо известны в экспериментальной эмбриологии (Дондуа, Фёдорова, 1964).

Совпадение линий регрессии накопления К-митозов в двух последних опытах позволяет предположить, что количество митостатика в изученном диапазоне концентраций практически не сказывается на характере движения клеток в митотическом цикле и после стабилизации системы не нарушает интенсивность переходов клеток из фазы в фазу, о чем свидетельствует и профазный контроль (табл. 2).

Через 1 сут в обоих опытах этой серии сформировались живые, демонстрирующие спорадические изгибания тела, формы, отдаленно напоминающие зародыши перед вылуплением, с разной степенью недоразвитости некоторых систем органов (прежде всего, головных структур и сети кровеносных сосудов желточного мешка). Наличие несоответствующего стадии развития большого желточного мешка у всех таких “личинки” указывает на

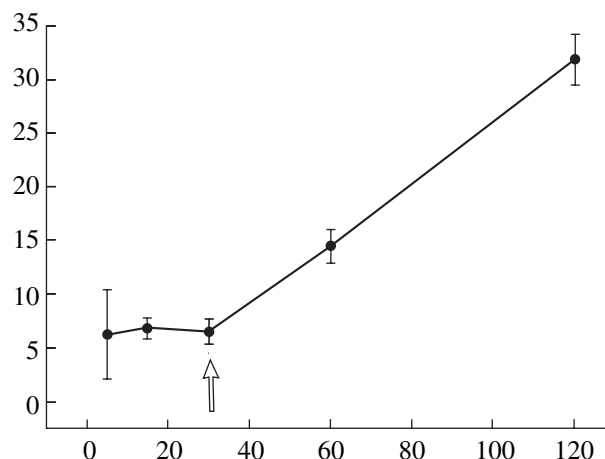


Рис. 6. Изменение доли К-митозов в эксперименте 2, серия II (стадия 75%-ной эпиболии, обработка 0.5 ч 0.5 мкг/мл нокодазола). По оси абсцисс – продолжительность эксперимента, мин.

отсутствие или затрудненность ассимиляции желтка. Гистологическое изучение показало, что в тканях зародышей имеются только нормальные митотические фигуры; К-митозов и “рыхлых” митозов здесь не обнаружено. Таким образом, при этих экспериментальных условиях удается добиться снятия митотического блока, однако продолжительная его инерция, превышающая среднюю длительность клеточного цикла, затрудняет контроль синхронизации, получаемой таким способом.

Следующий этап работы состоял в подборе условий, позволяющих, с одной стороны, блокировать митотический цикл, а с другой – максимально быстро снимать состояние блока у дехорионизированных зародышей. Как показали предыдущие опыты, только дехорионизации недостаточно для эффективного удаления нокодазола из клеток зародыша. Освобождению от митостатика могла бы способствовать отмывка раствором Гольтфретера с ДМСО. В следующем эксперименте после полу-

Таблица 2. Доля профаз у контрольных и экспериментальных зародышей, обработанных нокодазолом в разных концентрациях в течение 0.5 ч, %

Время эксперимента, ч	Относительная доля профаз при концентрации, мкг/мл		
	0.5	1.0	контроль
0.0	1.00 ± 0.15	1.07 ± 0.08	0.94 ± 0.14
0.5	1.00 ± 0.08	0.99 ± 0.08	0.90 ± 0.11
1.5	0.97 ± 0.07	1.02 ± 0.03	1.05 ± 0.10
2.0	0.91 ± 0.05	0.87 ± 0.08	0.87 ± 0.07

Примечание. Тест с использованием критерия One-Way ANOVA при уровне значимости 0.05 показал отсутствие достоверных различий значений между контролем и вариантами экспериментов.

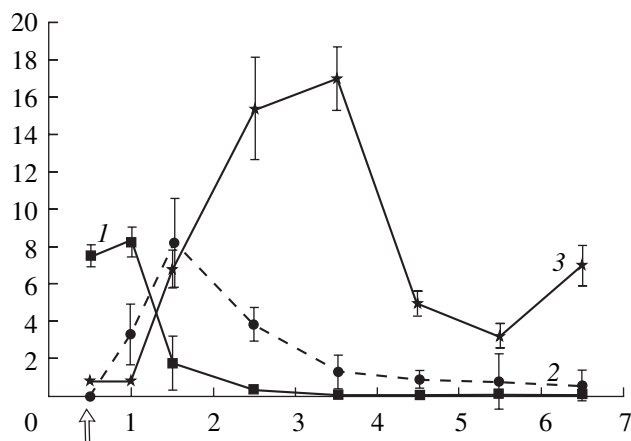


Рис. 7. Изменение доли К-митозов (1), “рыхлых” (2) и нормальных (3) митозов в эксперименте 3, серия II (стадия 75%-ной эпиболии, обработка 0.5 ч 1 мкг/мл нокодазола). Отмывку от митостатика проводили в растворе Гольтфретера с 0.05%-ным ДМСО.

часовой обработки нокодазолом (1.0 мкг/мл) зародыши переносили в двойной раствор Гольтфретера с ДМСО. При такой схеме опыта уже через 0.5 ч после начала отмывки клетки выходят из митотического блока, о чем можно судить по появлению так называемых “рыхлых” К-метафаз (рис. 7, 2). Еще через 30 мин появляются нормальные митотические фигуры (рис. 7, 3). Через 3.5 ч после начала эксперимента митотический индекс составляет 17.2%, что в несколько раз превосходит таковой в контроле. Большинство из делящихся клеток являются потомками клеток, которые побывали в состоянии митотического блока. Таким образом, “заблокированные” клетки ранних зародышей при понижении (в результате эффективной отмывки) концентраций митостатика ниже критических способны продолжить приостановленный митоз, перейти в следующий митотический цикл и завершить его очередным митозом. Падение митотического индекса на отрезке времени от 3.5 до 5.5 ч развития объясняется переходом “синхронизированной популяции клеток” в интерфазу. Судя по графику К-митозов (рис. 7, 1) “инерция блока” в данных условиях не превышает 30 мин (время появления первых “рыхлых” митозов после начала отмывки), т.е. существенно короче митотического цикла.

Сопоставление результатов экспериментов на интактных и дехорионизированных зародышах показало, что яйцевые оболочки *Danio rerio* препятствуют диффузии нокодазола в зародыш и обратно. Для преодоления этой преграды с целью получения полноценного блокирования митозов приходится прибегать к относительно высоким концентрациям митостатика (не менее 3 мкг/мл), что, по-видимому, нежелательно, поскольку такие дозы сравнительно быстро вызывают дегенеративные процессы и в конце концов гибель зародышей (Solnica-Krezel, Driever, 1994). Причиной

дегенеративных изменений в развивающихся тканях может быть наблюдаемая нами гиперконденсация хромосом. Первые признаки снятия блока митоза во всех сериях экспериментов обнаруживаются спустя некоторое время после начала отмывки от ингибитора. Инерция блока зависит не только от избранной концентрации нокодазола, но и от длительности обработки — от факторов, важных для достижения полноценного обратимого ингибирования митозов и играющих большую роль в последующей судьбе клеток, перенесших состояние блока. Ускоренного выведения митостатика можно добиться лишь при многократной смене среды, содержащей ДМСО. При соблюдении перечисленных условий удастся получить отчетливый пик доли нормальных митозов как свидетельство возникновения волнового характера пролиферации. Вопросы о том, как долго сохраняется наведенное парасинхронное состояние клеточной популяции и какова кинетика “вторичной” десинхронизации, подлежат специальному анализу. Таким образом, полученная модель отвечает следующим требованиям:

1. Быстрое поступление и быстрое выведение митостатика из системы.
 2. Возможность регулирования эффективности блока за счет дозы или времени воздействия митостатика.
 3. Обратимость блокировки митотических циклов после снятия ингибирующего воздействия.
 4. Возможность использования адекватных методов анализа пролиферации, митотического цикла и других параметров кинетики клеточных популяций.
 5. Получение в эксперименте однородного материала в необходимом для анализа количестве.
- Предстоит выяснить, связаны ли отклонения от нормального развития, наблюдаемые в наших экспериментах, с изменением режима пролиферации или они являются ответом на деструкцию микротрубочек цитоскелета.

Авторы выражают благодарность профессору А.К. Дондуа за ценные замечания при подготовке рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. М.: Мир, 1983. 263 с.
- Дондуа А. К. Клеточные циклы в раннем развитии животных // Клеточное размножение и процессы дифференцировки. М.: Наука, 1983. С. 6–75.
- Дондуа А.К., Фёдорова Ж.Е. Митотические циклы в период формирования нервной трубки и сомитов у куриного эмбриона в условиях культуры // Исследования клеточных циклов и метаболизма нуклеиновых кислот при дифференциации клеток. Л.; М.: Наука, 1964. С. 83–89.
- Нейфах А.А. Использование метода радиационной инактивации ядер для исследования их функции в ран-

- нем развитии рыб // Журн. общ. биологии. 1959. Т. 20. № 3. С. 202–213.
- Нейфах А.А. Сравнительное радиационное исследование морфогенетической функции ядер в развитии животных // Там же. 1961. Т. 22. № 1. С. 42–57.
- Нейфах А.А., Ротм Н.Н. Синхронизация клеточных делений у ранних зародышей вьюна *Misgurnus fossilis* L. путем воздействия пониженной температуры // Докл. АН СССР. 1958. Т. 119. № 2. С. 432–434.
- Ротм Н.Н. Клеточные циклы в раннем эмбриогенезе животных. М.: Наука, 1987. 207 с.
- Эль Али М.Ш. Влияние колхамина на сегментацию параксиальной мезодермы куриного эмбриона: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: СПбГУ, 1993. 19 с.
- Atés Y., Sentein P. Action of nocodazole on segmentation mitoses of *Triturus helveticus* Raz. Electron microscopy // Biol. Cells. 1981. V. 40. P. 175–180.
- Baumann M., Sander K. Bipartite axiation follows incomplete epiboly in zebrafish embryos treated with chemical teratogens // J. Exp. Zool. 1984. V. 230. P. 363–376.
- Cleaver J.E. Thymidine metabolism and cell kinetics. Amsterdam: North Holland Publ. Co., 1967. 427 p.
- De Brabander M.J., Van de Veire R.M.L., Aerts F.E.M. et al. The effects of methyl [5-(2-thienylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate, (R 17934; NSC 238159), a new synthetic antitumoral drug interfering with microtubules, on mammalian cells culture *in vitro* // Cancer Res. 1976. V. 36. P. 905–916.
- Emanuelsson H. Mitotic activity in chick embryos at the primitive streak stage // Acta Physiol. Scand. 1961. V. 52. P. 211–233.
- Foe V.E. Mitotic domains reveal early commitment of cells of *Drosophila* embryos // Development. 1989. V. 107. P. 1–22.
- Kane D. A., Kimmel C.B. The zebrafish midblastula transition // Devel. Biol. 1993. V. 119. P. 447–456.
- Kato Y., Tsunoda Y. Synchronous division of mouse two-cell embryos with nocodazole *in vitro* // J. Reprod. Fertil. 1992. V. 95. P. 39–43.
- Kimmel C. B., Ballard W.W., Kimmel S.R. Stages of embryonic development of the zebrafish // Devel. Dynamics. 1995. V. 203. P. 253–310.
- Mareel M., Bellairs R., De Bruyne G., Van Peteghem M.C. Effect of microtubule inhibitors on the expansion of hypoblast and margin of overgrowth of chick blastoderms // J. Embryol. Exp. Morph. 1984. V. 81. P. 273–286.
- Newport J., Kirschner M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage // Cell. 1982. V. 30. № 3. P. 675–686.
- Puck T.T., Steffen J. Life cycle analysis of mammalian cells. I. A method for localizing metabolic events within cell cycle and its application to the action of colcemide and sublethal doses of X-irradiation // Biophys. J. 1963. V. 3. P. 379–389.
- Rieder C.L., Palazzo R.E. Colcemid and mitotic cycle // J. Cell Sci. 1992. V. 102. P. 387–392.
- Satoh N. “Metachronous” cleavage and initiation of gastrulation in amphibian embryos // Devel. Growth Differ. 1977. V. 19. № 2. P. 111–117.
- Solnica-Krezel L., Driever W. Microtubule arrays function during epiboly // Development. 1994. V. 120. P. 2443–2455.
- Strahle U., Jesuthasan S. Ultraviolet irradiation impairs epiboly in zebrafish embryos: evidence for a microtubule-dependent mechanism of epiboly // Devel. Biol. 1993. V. 119. P. 909–919.
- Taylor E.W. The mechanism of colchicines inhibition of mitosis. I. Kinetics of inhibition and the binding of H³-colchicine // J. Cell Biol. 1965. V. 25. № 1. Pt. 2. P. 145–160.

Development of the Model of Cell Cycle Synchronization in Early Embryos of *Danio rerio* (Teleostei)

© 2007 г. V. I. Efremov, G. M. Gluzdikova, and E. V. Mukhachev

St-Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St-Petersburg, 199034 Russia

E-mail: sme@SEI6567.spb.edu

Received March 28, 2006, in final form, November 13, 2006

Abstract—An attempt was undertaken to develop a model system based on artificial cell cycle synchronization by means of reversible mitosis blocking in zebrafish embryos for studying the role of cell cycle synchrony in embryogenesis. Dechorionized and intact embryos at the stages of 512-cell blastula and 75% epiboly were treated with nocodazole and then washed within several times of exposure. When working on dechorionized embryos, we succeeded to obtain complete block mitosis in the presence of low nocodazole concentrations: 0.5–1.0 µg/ml. Block of mitosis was relieved in all experimental series within a certain time after the beginning of washing. This inertia depended on both nocodazole concentration and duration of treatment. The nocodazole elimination was significantly accelerated only after five (or more) changes of washing medium containing DMSO. As a result, the conditions were established for obtaining a parasynchronous cell population in the zebrafish gastrulas with a peak of mitosis up to 17.2%.

Key words: *Danio rerio*, proliferation, cell cycle, composition of cell population, nocodazole, K-mitoses, synchronization.