

УДК 611.013.9

МЕХАНОЗАВИСИМЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ДВИЖЕНИЯ В ОСЕВЫХ ЗАЧАТКАХ ГАСТРУЛ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ¹

© 2009 г. Т. Г. Трошина, Л. В. Белоусов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

119992 Москва, ГСП-2, Ленинские горы

E-mail: morphogenesis@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.03.08 г.

Окончательный вариант получен 16.10.08 г.

Двойные эксплантаты (“сэндвичи”) супрабластопоральной области ранних-средних гаструл шпорцевой лягушки и целые зародыши тех же стадий развития растягивали с помощью двух игл перпендикулярно направлению естественного удлинения осевых зачатков. Прослеживали изменения формы и гистологической структуры зародышей, а также расположение потомства одного из дорсальных бластомеров, меченных на стадии 16 клеток флуоресцеин-декстраном. Значительная доля растянутых эксплантатов реориентировалась в направлении искусственного растяжения. Динамика расположения меченных флуоресцеин-декстраном клеток и форма эксплантатов показывают, что эта реакция носит активный характер и основана на конвергентной интеркаляции клеток, стимулированной растяжением. В растянутых гастролах наблюдали прекращение гастрюляции, растяжение blastopore в дорсовентральном направлении и “стекание” меченых клеток в вентральном направлении по боковым губам blastopore, также сопряженное с конвергентной интеркаляцией и тензотаксисом. Полученные результаты обсуждаются в свете гипотезы гипертрофии механических напряжений.

Ключевые слова: гастрюляция, конвергентная интеркаляция, механические напряжения, *Xenopus*.

Морфогенетические движения, протекающие в ходе гастрюляции и формирования осевых зачатков позвоночных, были подвергнуты в течение последнего времени подробному анализу, направленному на выявление экспрессии генов, роли различных сигнальных систем и взаимодействий клеток с компонентами внеклеточного матрикса (Niehrs et al., 1993; Onichtchouk et al., 1996; Sasai, de Robertis, 1997; Masazumi, Concha, 2001; Kwan, Kirschner, 2003; Unterseher et al., 2004; Davidson et al., 2004). Обширные данные, полученные в этих исследованиях, не позволяют, однако, дать окончательные ответы на вопрос о факторах пространственно-временной координации морфогенетических движений. В частности, несмотря на большое количество работ по региональной экспрессии генов в пределах осевых зачатков, включая центральную нервную систему (Novoselov et al., 2003), первичные факторы их переднезадней разметки остаются неясными. Есть основания полагать, что существенную роль в такой координации играют механические напряжения, которые возникают в результате предшествующих морфогенетических движений и влияют на последующие (Belousov et al., 2006). В частности, можно предполагать, что активное удли-

нение осевых зачатков в направлении продольной оси зародыша определяется предшествующим пассивным растяжением супрабластопоральной области (СБО) в результате инволюционных движений гастрюляции. Цель работы – проверка этого предположения и в более широком плане – исследование активных интеркаляционных реакций эмбриональных зачатков на внешние натяжения. Подобные реакции могут ожидать в свете гипотезы гипертрофии (ГВ) механических напряжений в эмбриональных тканях в ответ на внешние механические воздействия (Belousov, Grabovsky, 2006).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование зародышей и введение флуоресцентной метки. Использовали зародыши шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* Daudin, полученные с помощью гормональной стимуляции производителей и искусственного оплодотворения. Третичные оболочки растворяли в 2.5%-ном растворе цистеина, желточные удаляли пинцетом. Яйцеклетки и зародыши культивировали в растворе MMR, mM: 100 NaCl, 2 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, pH 7.4. На стадии 16 бластомеров в один из дорсальных бластомеров зародыша

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

инъецировали по 10 нг флуоресцеин-декстрана (ФД) (40000 MW, “Molecular Probes”, Нидерланды). В дальнейшем флуоресценцию потомков ФД-меченного blastomera наблюдали в определенные моменты развития при УФ-облучении с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Olympus SZX9 с флуоресцентным блоком U-RFL-T (США).

Микрохирургические манипуляции. Зародыши культивировали до стадии 10 (Nieuwkoop, Faber, 1956), после чего выполняли следующие манипуляции.

1. Из двух зародышей, один из которых содержал ФД-метку, вырезали участки СБО размером примерно 300 × 300 мкм и совмещали в одинаковой ориентации внутренними поверхностями, изготавливая таким образом двойные эксплантаты (“сэндвичи”). Эксплантаты помещали на агарозный субстрат и фиксировали поблизости от их боковых краев двумя стеклянными иглами диаметром 70–80 мкм. В 1-й серии опытов эксплантаты оставляли в таком состоянии до момента фиксации (через 24 ч). Во 2-й серии через 15–20 мин эксплантат растягивали с помощью игл в поперечном направлении (т.е. перпендикулярно его переднезадней оси) на 15–20%. Через такой же промежуток времени эксплантат снова растягивали до той же степени и в том же направлении, после чего оставляли в растянутом состоянии в течение 5 ч. Затем одну из иглонок вынимали и продолжали инкубацию еще в течение 20–24 ч. Основное внимание обращали на направление переднезадней оси эксплантатов, вдоль которой происходило вытяжение осевых органов. Сохранение эксплантатом своей исходной оси вытяжения (перпендикулярной направлению искусственного растяжения) обозначали как вытяжение в презумптивном направлении, а вытяжение эксплантата в навязанном ему поперечном направлении – как вытяжение “по иглам”.

2. Целые эмбрионы на стадии 10, содержащие ФД-метку, фиксировали на агарозном субстрате стеклянными иглами, введенными в латеродорсальные области. В 1-й серии опытов зародыши оставляли в таком состоянии до момента фиксации (через 24 ч). Во 2-й серии расположенную между иглами дорсальную область зародыша растягивали в поперечном направлении на 10–15% от исходной длины, и зародыш оставляли в таком состоянии до момента фиксации (через 24 ч). В 3-й серии растяжение в том же направлении проводили в два приема, достигая 50% растяжения.

Морфометрия и статистика. Измерения дугообразных контуров (описание см. ниже) на оцифрованных изображениях целых зародышей с ФД-метками проводили с помощью компьютерной программы Plana (Пушинский научный центр РАН). Для оценки достоверности морфологических различий между группами зародышей ис-

Таблица 1. Статистика реакции эксплантатов СБО на введение игл

Введение игл	Доля эксплантатов, вытянутых по, %		Образцы аморфные или с боковой осью, %
	презумптивной оси	иглам	
Растяжение отсутствует (38)	50 (19)	8 (3)	42 (16)
Эксплантаты растянуты (117)	42 (49)	36 (42)	22 (26)

Примечания. Здесь и в табл. 2: в скобках – число образцов; группы зародышей, различающиеся по данному признаку с достоверностью не менее 99%, соединены сплошными двусторонними стрелками, а группы, различающиеся с достоверностью не менее 95%, – пунктирными стрелками.

Таблица 2. Статистика реакций целых зародышей на механические воздействия

Введение игл	Морфология и движение меченых клеток: зародыши растянуты по, %		Другие аномалии развития, %
	презумптивной оси (развитие нормальное)	вдоль боковых губ blastopora (меченые клетки стекают по боковым губам)	
Зародыши не растянуты (16)	69 (11)	19 (3)	6 (1)
Растяжение <10% (10)	0	90 (9)	10 (1)
Растяжение >25% (28)	32 (9)	46 (13)	11 (3)

пользовали “критерий знаков” (Ван дер Варден, 1960). Данные, содержащиеся в табл. 3, обработаны с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Гистологическая обработка. Эксплантаты и целые зародыши фиксировали в жидкости Буэна и проводили через ряд восходящих бутанольных спиртов; парафиновые срезы толщиной 7–8 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Реакции двойных эксплантатов СБО на растяжение (табл. 1; рис. 1, 2, вклейка). В серии 1 (иглы введены, растяжение отсутствует) половина образцов вытягивалась по презумптивной оси. Подавляющее большинство оставшихся образ-

Таблица 3. Результаты растяжения поперечного периметра зародышей при образовании вентральной складки и максимальной длины дорсовентральной миграции ФД-меченных клеток

Образец №	Δ_p , %	m/p , %		$m-d$, мм
		7 ч	24 ч	
1	8	17	20	0.43
2	8	20	37	0.55
3	7	31	37	1.05
4	9	–	30	–
5	6	16	34	0.45
6	18	–	47	–
7	8	24	27	0.76
8	4	0	0	–0.09
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	3	0	0	–0.07
12	3	0	0	–0.07
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0

Примечания. Δ_p – мера растяжения периметра; m/p – доля длины данного периметра, занятая потоком ФД-меченных клеток в данное время после растяжения зародыша; $m-d$ – разность между длиной потока ФД-меченных клеток и двойной длиной вентральной складки (подробнее см. в тексте).

цов утрачивало четкую морфологическую ось. Они были либо аморфными, либо сильно изогнутыми. Напротив, в серии 2 (эксплантаты растянуты) аморфных образцов было существенно меньше и большинство эксплантатов вытягивалось (примерно поровну) либо вдоль презумптивной оси, либо в направлении “по иглам”. При этом процент эксплантатов, вытянутых в направлении “по иглам”, с высокой достоверностью превышал таковой из серии 1.

Является ли растяжение “по иглам” чисто пассивным или же оно содержит в себе активную компоненту? О присутствии последней можно судить по следующим критериям. Во-первых, в растянутых “по иглам” эксплантатах область между наиболее удаленными друг от друга ФД-мечеными клетками продолжает сильно (почти на 100%) удлиняться уже после снятия растягивающей силы (рис. 1, ср.: А2 и А3, В2 и В3, В2 и В3). При этом между ФД-мечеными клетками встраиваются немеченые, что указывает на интеркаляцию клеток в направлении, перпендикулярном растяжению. Во-вторых, многие из образцов, подвергшихся растяжению, оказываются изогнутыми в этом же направлении (рис. 1, А3-В3), что однозначно указывает на присутствие в них внутреннего давления. Последнее как раз и может

быть создано интеркаляцией клеток. Кроме того, наблюдается захождение меченого материала латеральнее одной из игл (рис. 1, В3). Все это показывает, что растяжение образцов внешней силой вызывало в них активную реакцию конвергентной интеркаляции клеток, породившую внутреннее давление, что соответствует петле обратной связи между пассивным растяжением и активной генерацией внутреннего давления, ожидаемой исходя из модели ГВ (Belousov, Grabovsky, 2006).

Почему, однако, почти половина образцов серии 2 сохранила презумптивную ось вытяжения? В большинстве таких образцов не произошло равномерного растяжения всего эксплантата – вместо этого сильно растянулась лишь область, прилежащая к одной из игл (рис. 2, А2, В2, вклейка). В таком случае, исходя из модели ГВ, в преимущественно растянутой области должно возникнуть интеркаляционное давление (рис. 2, А2, В2), которое будет, напротив, латерально сжимать нерастянутую область, способствуя ее вытяжению в презумптивном направлении. ФД-метка могла при этом оказаться в различных областях зародыша и соответственно вытягиваться в разных направлениях (рис. 2, А3, В3). Таким образом, сильное неравномерное поперечное растяжение образца может не препятствовать, а напротив, способствовать сохранению презумптивного направления его вытяжения. Это подтверждается и в опытах по растяжению целых зародышей.

Реакции на поперечное растяжение целых зародышей стадии 10 (табл. 2, 3; рис. 3, вклейка). Как видно из данных табл. 2, подавляющее большинство нерастянутых зародышей развивались нормально, тогда как у значительного числа поперечно растянутых зародышей подавлялась нормальная латеромедиальная конвергенция клеток к дорсальной средней линии (и соответственно растяжение зародыша по презумптивной переднезадней оси). Взамен происходило “стекание” меченых клеток в вентральном направлении вдоль боковых губ blastopora, который вначале продолжал нормальным образом закрываться, но затем снова раскрывался, удлинялся в дорсовентральном направлении и оставался широко открытым (рис. 3). Стеkanie меченых клеток шло преимущественно по одной из боковых губ blastopora (рис. 3, А2, В2), но могло идти и по обеим (рис. 3, В2). Стекающие в вентральном направлении меченые клетки перемешивались с местными, немечеными, т.е. в боковых губах происходила интеркаляция клеток (рис. 3, А2, В2). Все эти процессы при слабом (менее чем 10%) поперечном растяжении дорсальной области зародыша были выражены сильнее, чем при 10%-ном и более растяжении (табл. 2). С чем можно связать такой, на первый взгляд, парадоксальный эффект?

Мы обратили внимание на то, что при латеральном растяжении зародышей в точке его периметра, примерно равноудаленной от обеих игл (обычно, но не всегда эта точка соответствует наиболее вентральной области бластопора), в большинстве случаев образуется более или менее глубокая поперечная эктодермальная складка (рис. 3, A2-B2). Очевидно, что ее образование приводит к растяжению примыкающей к ней поверхности зародыша на двойную глубину складки, которую обозначим как d . Если считать (в качестве первого приближения), что это растяжение (Δ_p) распределяется равномерно по всему поперечному периметру (p) зародыша, то $\Delta_p = d/p$. Морфометрические измерения показали, что Δ_p варьирует от нуля (отсутствие складки) до 18% (табл. 3). Мы сравнили эту величину с долей длины периметра, занятого потоком ФД-меченных клеток (m/p , %), принимая за длину m потока расстояние между крайними в дорсовентральном направлении ФД-мечеными клетками. Такие измерения мы проводили дважды – через 7 и 24 ч после фиксации зародышей в растянутом состоянии. Если периметр был растянут за счет образования складки на 8% и более, то уже на первом сроке (и тем более на втором) величина m/p для каждого индивидуального зародыша достоверно ($p > 99\%$) превышала Δ_p , а если периметр был растянут менее чем на 8%, то потоки клеток вообще отсутствовали. Превышение длины потока ФД-меченных клеток над двойной длиной складки может быть наглядно выражено и в абсолютных линейных единицах – соответствующие разности почти всегда положительны (табл. 3). Это означает, что растяжение периметра зародыша за счет образования складки оказывает пороговое воздействие на клеточные потоки, стимулируя их возникновение при переходе через 8%-ный барьер. При этом длина потоков существенно превышала растяжение, а потоки продолжались и после прекращения последнего (т.е. после завершения образования складки).

Мы предлагаем следующее объяснение образования складки и преимущественного влияния слабого растяжения. Существенно то, что при слабом растяжении вентральная поверхность зародыша заметно не растягивается, но деформируется, снижая свою исходную кривизну (распрямляясь) (рис. 3, A1, B1). При этом либо внешняя поверхность зародыша должна пассивно сжаться, либо одна из внутренних клеточных поверхностей растянуться, либо произойдет и то и другое. В любом случае, согласно модели ГВ, сжатая поверхность должна активно сократиться, а растянутая – активно расшириться, причем с “перехлестом”. Очевидно, что это и создаст складку. В дальнейшем именно растущая складка будет растягивать поверхность зародыша, причем преимущественно соседние с ней участки боковых губ

бластопора. Это породит следующие, в общем синергичные, ГВ-реакции – тензотаксис (движение клеток вверх по градиенту натяжений, т.е. к складке: Белоусов и др., 1999) и интеркаляцию клеток в боковых губах бластопора, связанную с удлинением губ. Существенное превышение клеточным потоком величины начального растяжения и удлинение потока после окончания роста складки указывают на активность данных реакций. Таким образом, деформация на иглах только запускает главный фактор растяжения тканей зародыша – растущую складку. Важно, что последняя действует в более естественном для морфогенеза ритме – более медленно и плавно, нежели искусственное растяжение. При этом если последнее оказалось более сильным (превысило 10%), то образование складки будет затруднено как раз из-за чрезмерного и резкого растяжения той поверхности, которая должна активно сокращаться, и описанный выше механизм не сможет быть задействован.

Гистологическая структура растянутых эксплантатов и целых зародышей. Двойные эксплантаты СБО, вытянувшиеся по презумптивной оси, имели хорошо выраженную полярность. В них присутствовали все осевые органы (нервная система, хорда и сомиты), причем зачатки хорд от обоих одиночных эксплантатов, как правило, развивались обособленно, не сливаясь в единую закладку (рис. 4, а). Напротив, строение эксплантатов, вытянувшихся “по иглам”, было весьма вариabельным. Двойных закладок хорд в них никогда не было. Иногда присутствовала единая хордальная закладка (рис. 4, б), тогда как в других образцах хорды не было, но присутствовала хорошо выраженная серия мезодермальных сомитов, вдоль которой и происходило вытяжение (рис. 4, в). Активность последнего подтверждается изгибом образца. При этом головной отдел нервной системы оказывается в стороне от зоны растяжения (рис. 4, в). Наконец, некоторые образцы были, как уже говорилось выше, резко изогнуты в направлении приложенного растяжения (рис. 4, г), что свидетельствует о сильном внутреннем давлении и тенденции к усилению кривизны (также вытекающей из модели ГВ). В таких образцах, судя по смещению основной массы нервной ткани к одному из полюсов эксплантата и присутствию на этом полюсе присоски, формируется новая переднезадняя полярность в навязанном направлении.

В умеренно растянутых целых зародышах мезодермальные сомиты всегда, а хорда – по большей части располагались в боковых губах вытянутого незамкнутого бластопора (рис. 5). Состав осевых органов в боковых губах часто был асимметричным и вариabельным (Ермаков, Белоусов, 1998). Все обнаруженные нами закладки хорды содержали ФД-меченные клетки дорсальной области, но обратное неверно: наблюдались ФД-ме-



Рис. 4. Продольные срезы растянутых на иглах двойных эксплантатов СВО, 24 ч инкубации, направление растяжения соответствует вертикальному: *а* – эксплантат растянулся по презумптивному направлению, *б–г* – эксплантаты растянулись “по иглам”. *Н* – скопления нервной ткани, *Пр* – присоска, *С* – мезодермальные сомиты, *Х* – хорда.

ченные потоки клеток, не формирующие хорду. Подчеркнем, однако, что эти потоки были прерывистыми (меченые клетки чередовались с немечеными, возникшими из местного материала боковой губы), тогда как закладка хорды – всегда

сплошной. Следовательно, при развитии хорды происходит нечто вроде “ассимиляторной” или планарной (Doniach et al., 1992) индукции местного клеточного материала, причем “затравка”, состоящая из дорсального материала, по-видимому, необходима. С другой стороны, серии мезодермальных сомитов могли возникать в боковых губах бластопора как с участием, так и без участия ФД-меченных клеток дорсальной области. Например, в образце с двумя симметричными и хорошо выраженными сериями сомитов, простирающихся вплоть до вентральной губы бластопора (рис. 5, *б*), вдоль одной из губ шел поток ФД-меченных клеток, а вдоль противоположной его не было. Следовательно, образование сомитов можно считать автономным свойством материала боковых губ бластопора (что соответствует картам презумптивных зачатков в нормальном развитии). В дорсальной области находятся скопления нервной ткани переднеголового характера (рис. 5, *а*).

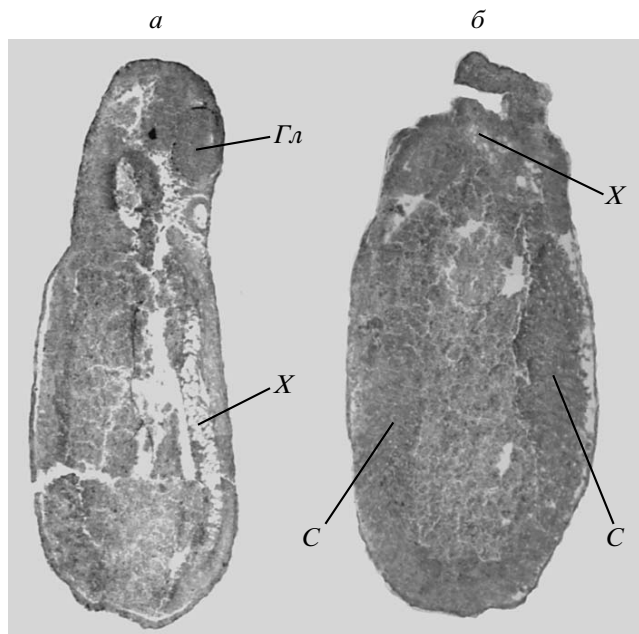


Рис. 5. Фронтальные срезы целых зародышей, слабо растянутых в поперечных направлениях на стадии ранней гастрюлы: *а* – видны скопления нервной ткани переднеголового характера, этот образец представлен на рис. 3 как В3; *б* – видны хорошо выраженные симметричные серии сомитов. *Гл* – зачаток глаза, остальные обозначения см. на рис. 4.

В работе мы впервые представили количественные оценки активного интеркаляционного ответа эмбриональных тканей на внешние механические воздействия. Показано, что эта реакция носит пороговый характер и может быть многоступенчатой. Наши результаты показывают также, что механоиндуцированная конвергентная интеркаляция клеток может быть фактором, определяющим ориентацию осевых зачатков не только в экспериментальных условиях, но и в нормальном развитии. С другой стороны, полученные данные ставят, но еще не решают вопрос об участии механозависимых клеточных движений в дифференцировке осевых зачатков. Для ре-

шения этой важной проблемы требуются дальнейшие исследования.

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. № 5. С. 346–352.
- Ван дер Варден Б.* Математическая статистика. М.: Иностран. лит-ра, 1960. 434 с.
- Ермаков А.С., Белоусов Л. В.* Морфогенетические и дифференцировочные последствия релаксации механических натяжений в бластуле шпорцевой лягушки // Онтогенез. 1998. Т. 29. № 6. С. 450–458.
- Beloussov L.V., Grabovsky V.I.* Morphomechanics: goals, basic experiments and models // Int. J. Devel. Biol. 2006. V. 50. P. 81–92.
- Beloussov L.V., Louchinskaia N.N., Ermakov A.S., Glagoleva N.S.* Gastrulation in amphibian embryos, regarded as a succession of biomechanical feedback events // Ibid. 2006. V. 50. P. 113–122.
- Davidson L.A., Keller R., DeSimone D.* Patterning and tissue movements in a novel explant preparation of the marginal zone of *Xenopus laevis* // Gene Exp. Patterns. 2004. V. 4. P. 457–466.
- Doniach T., Phillips C.R., Gerhart J.C.* Planar induction of anteroposterior pattern in the developing central nervous system of *Xenopus laevis* // Science. 1992. V. 257. P. 542–545.
- Kwan K.M., Kirschner M.W.* Xbra functions as a switch between cell migration and convergent extension in the *Xenopus* gastrula // Development. 2003. V. 130. P.1961–1972.
- Masazumi T., Concha L.* Calcium waves orchestrate Vertebrate gastrulation cell movements // Curr. Biol. 2001. V. 11. P. R470–R471.
- Niehrs C., Keller R., Ken W. et al.* The homeobox gene *gooseoid* 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, 1956. 243 p.
- Novoselov V.V., Alexandrova E.M., Ermakova G.V., Zarskiy A.G.* Expression zones of three novel genes about the developing anterior neural plate of *Xenopus* embryo // Gene Exp. Patterns. 2003. V. 3. P. 225–230.
- 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. P. 3045–3053.
- Sasai Y., De Robertis E.M.* Ectodermal patterning in Vertebrate embryos // Devel. Biol. 1997. V. 4. P. 116–126.
- Unterseher F., Hefele J.A., Giehl K. et al.* Paraxial protocadherin coordinates cell polarity during convergent extension via Rho A and JNK // EMBO J. 2004. V. 23. P. 3259–3269.

Mechanodependent Cell Movements in the Axial Rudiments of *Xenopus* Gastrulae

T. G. Troshina and L. V. Beloussov

Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

e-mail: morphogenesis@yandex.ru

Abstract—Sandwich explants of the suprablastoporal area of *Xenopus* early–mid gastrula and same stages of entire embryos were stretched with two needles perpendicular to the direction of natural elongation of the axial rudiments. The changes in the embryonic shape and histological structure were monitored as well as the arrangement of descendants of one of dorsal blastomers labeled with fluorescein-dextran at the 16-cell stage. A substantial fraction of stretched explants reoriented along the applied stretch direction. The arrangement dynamics of fluorescein-dextran-labeled cells and explant shape demonstrate that this is an active response based on convergent intercalation of cells induced by stretching. Stretched gastrulae demonstrated arrested gastrulation, dorsoventral extension of the blastopore, and ventral flow of labeled cells towards the lateral lips of the blastopore, which was also mediated by convergent intercalation and tensotaxis. The obtained data are discussed in terms of the hypothesis of mechanical stress hyper-restoration.

Key words: gastrulation, convergent intercalation, mechanical stress, *Xenopus*.