

УДК 611.013.9

ИЗМЕНЕНИЯ ТОПОЛОГИИ И ГЕОМЕТРИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИЕВ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ ПРИ РЕЛАКСАЦИИ МЕХАНИЧЕСКИХ НАТЯЖЕНИЙ¹

© 2010 г. А. Ю. Евстифеева, С. В. Кремнёв, Л. В. Белоусов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

119992 Москва, ГСП-2, Ленинские горы

E-mail: morphogenesis@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.12.09 г.

Окончательный вариант получен 24.12.09 г.

Статистически оценивали изменения связности клеточных вершин, вершинные углы и апикальные индексы клеток вентральной эпизктодермы гаструл шпорцевой лягушки в течение первых 4 ч после релаксации механических натяжений. Если в нерелаксированном эпителии подавляющее большинство клеток имеет вершины связности 3, вершинные углы, близкие к 120° , и апикальные индексы порядка 1 (изодиаметрические клетки), то после релаксации число клеток со связностью более 3, число вершинных углов, существенно отклоняющихся от 120° , и процент столбчатых клеток с высоким апикальным индексом возрастают. Вершины связности выше 3 имеют тенденцию собираться в сомкнутые группы, образуя гладкие линии клеточных стенок. Длина и кривизна стенок клеток с вершинами связности 4 достоверно превышает те же показатели в клетках с вершинами связности 3. Отмеченные изменения топологии и геометрии клеток соответствуют перестройкам, наблюдаемым в нормальном морфогенезе. Они рассматриваются в терминах модели гипервосстановления механических натяжений в релаксированных эпителиальных пластах.

Ключевые слова: эпителий, гастрала, *Xenopus*, вершинные углы, степень вершины, апикальный индекс, топология, геометрия, морфогенез, механическое напряжение.

Значение топологических перестроек клеточных сетей (изменения связности клеточных вершин и контактов “клетка-клетка”) для морфогенеза и клеточных дифференцировок отмечали некоторые авторы при изучении разных объектов (Исаева, Преснов, 1990; Савостьянов, 2005; Arnolds et al., 1983). С другой стороны, за последнее время получено много данных о регуляции морфогенетических процессов механическими напряжениями эмбриональной ткани или подстилающего ее субстрата (Brouzes, Farge, 2004; McBeath et al., 2004; Engler et al., 2006; Dumais, 2007; Belousov, 2008; Ramasubramanian, Taber, 2008; Wozniak, Chen, 2009). В нашей работе предпринята попытка объединить два эти подхода и исследовать влияние релаксации механических напряжений на топологическую структуру клеточной сети. Работа выполнена на одной из широко используемых в биологии развития экспериментальных моделей — двойном эксплантате (сэндвиче) вентральной эктодермы гастралы шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, который релаксировал после вырезания из целого зародыша. Наружные слои эктодермы (эпизктодер-

ма) интактного зародыша представляют собой плотный эпителий, который можно рассматривать как плоскую решетку (клеточную сеть), сложенную в основном из гексагональных клеток. Относительная простота и однородность строения такой клеточной сети делают возможным оценивать ее состояние количественно, используя следующие показатели:

- 1) связность клеточных вершин (число клеточных стенок, выходящих из данной вершины);
- 2) величины углов при вершинах клеток;
- 3) количество смежных вершин со связностью >3 , лежащих на одной сглаженной линии из клеточных стенок;
- 4) среднюю длину и кривизну стенок в клетках с вершинами разной связности;
- 5) средние величины апикальных индексов (AI) клеток эпизктодермы (отношение высоты клетки к ширине ее апикальной зоны).

Измерения показали, что уже через несколько минут после релаксации натяжений начинаются активные планарные сокращения отдельных клеточных стенок и целых апикальных поверхностей клеток, что проявляется в возрастании доли вершин со

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

связностью >3 и, несколько позже, в существенном возрастании значений AI . Клетки с высокими значениями AI (колбовидные) затем утрачивают контакты с соседями и погружаются внутрь клеточного пласта. Этот процесс является примером одного из видов клеточной дифференцировки – эпителиально-мезенхимной трансформации. Кроме того, вершины высокой связности проявляют тенденцию собираться в сомкнутые группы, образуя сглаженные линии клеточных стенок, что имитирует процесс дедаминации. Таким образом, поведение механически релаксированного клеточного пласта можно рассматривать как упрощенную модель клеточной дифференцировки и некоторых морфогенетических процессов. Наблюдаемые явления обсуждаются в терминах модели гипервосстановления механических напряжений (Belousov, 2008). Согласно этой модели, клеточные структуры, подвергнутые растяжению или, наоборот, релаксации/сжатию внешними силами, должны активно и, как правило, с “перехлестом” восстанавливать предшествующие значения механических напряжений. Применительно к клеточным стенкам эта реакция должна состоять в стимуляции экзоцитозного встраивания субъединиц клеточной мембраны при ее растяжении и, напротив, эндоцитозном поглощении субъединиц при релаксации/сжатии. Такие реакции действительно описаны на ряде объектов (Raucher, Sheetz, 1999; Truschel et al., 2002).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Получение и инкубация эксплантатов. Участки вентральной эктодермы (крыши бластоцеля) зародышей *X. laevis* стадии 10–10.5 (Nieuwkoop, Faber, 1956) вырезали и сращивали попарно, внутренними сторонами друг к другу. Полученные образцы (эксплантаты) помещали в чашки Петри с агаровым покрытием и инкубировали от 5, 15, 30, 60, 120 и 240 мин в среде 1 × MMR при комнатной температуре 24–27°C, прикалывая образцы иглами к агару без растяжения. Затем эксплантаты фиксировали для проведения конфокальной микроскопии и гистологической обработки с последующей морфометрией. Фиксировали также интактные зародыши соответствующих стадий развития.

Конфокальная микроскопия. Образцы фиксировали в растворе 3.7%-ного формальдегида и 0.25%-ного глутаральдегида, приготовленном на фосфатном буфере (PBS), промывали в PBS и помещали в буфер PBS-T (0.5%-ный Тритон X-100 на 1 × PBS). Окрасивание проводили смесью фаллоидина и TRITC (0.005 мг/мл в PBS-T) в темноте в течение 45 мин, после чего образцы отмывали в течение 2 ч в буфере

PBS в темноте и помещали в заливочную среду (80%-ный глицерин на PBS).

Получение и обработка изображений поверхностей. Внешние поверхности эксплантатов, не прикасавшиеся к агару, и поверхности интактных зародышей фотографировали. Чтобы получить более четкие клеточные границы, фотографии преобразовывали в негативные черно-белые изображения в программе Paint.Net и затем обводили контуром по 60 клеток. У обведенных клеток измеряли углы при вершинах с помощью специально написанной в среде Delphi программы. Кроме того, подсчитывали долю вершин разной связности и долю вершин связности >3 , собранных в смежные группы по 2 и более вершин в каждой. Для каждого срока обработали по 500–1500 клеток.

Средние длины и кривизну стенок клеток с вершинами связности 3 и 4 измеряли на выборках, состоящих не менее чем из 100 клеток, изображений интактных зародышей и 5-минутных эксплантатов с помощью программы ImageJ. Кривизну стенок определяли как отношение их реальных длин к длине хорд, соединяющих концы данных стенок.

Сканирующая электронная микроскопия, изготовление полутонких срезов и подсчет апикальных индексов. Образцы фиксировали в 2.5%-ном глутаральдегиде на 0.2%-ном какодилатном буфере, обрабатывали 0.5% OsO₄ и заливали в эпон 812. Для сканирующей электронной микроскопии изготавливали поперечные сколы образцов, для оптической микроскопии – полутонкие поперечные срезы, окрашенные 1%-ным толудиловым синим. На 50–100 клетках каждого срока, выбранных на поперечных срезах случайным образом, с помощью программы ImageJ измеряли длины апикальных поверхностей клеток и AI : отношения наибольшей высоты данной клетки к ее апикальной длине.

Статистическую обработку данных проводили в программе STATISTICA 6.0, раздел Basic Statistics. Данные считали достоверными, если они удовлетворяли критериям Стьюдента и Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика связности клеточных вершин. На эксплантатах разных сроков, а также у интактного зародыша стадии 10–10.5 были подсчитаны доли вершин разной связности. Хотя у всех образцов преобладала доля вершин связности 3, уже через 5 мин после вырезания эксплантата было отмечено достоверное возрастание доли вершин более высокой связности по сравнению с интактными образцами (рис. 1). В период 2–4 ч наблюдали вторую волну возрастания связности (различия по связности 4 между эксплантатами 2 и 4 ч статистически досто-

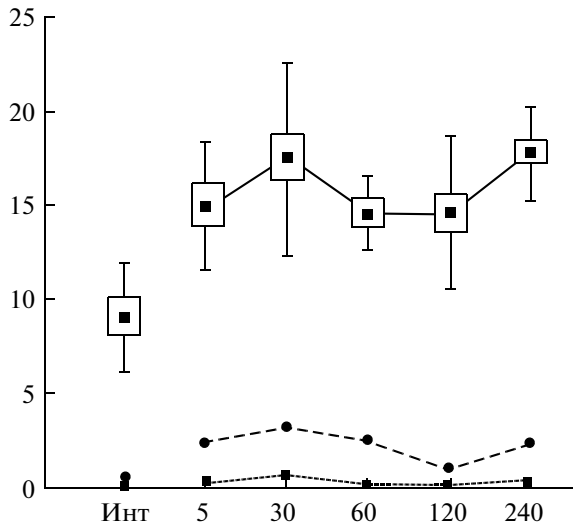


Рис. 1. Доля вершин связности >3 (по оси ординат, %) в эксплантатах разных сроков (по оси абсцисс, мин после эксплантации) по сравнению с эпизкотодермой интактных зародышей (Инт). (\square) — вершины связности 4 (указаны средние значения, стандартная ошибка и стандартное отклонение); ($- \bullet - -$), ($\cdots \blacksquare \cdots$) — вершины связности 5 и 6 соответственно (указаны только средние значения).

верны). Доли вершин более высокой связности, хотя и были существенно меньше, но подчинялись той же динамике.

Динамика смежных вершин высокой связности и сглаженных клеточных границ. В релаксированных эксплантатах, начиная с 5 мин после изоляции, достоверно увеличивается доля клеточных вершин, связанных в смежные группы по две и более (рис. 2, а). Доля групп, содержащих более чем две

смежные вершины, начинает возрастать лишь через 30 мин после изоляции, когда увеличение числа групп по две вершины замедляется (ср. рис. 2, а и б). Это свидетельствует о переходе, по крайней мере в период 30–60 мин после изоляции эксплантата, части двухвершинных групп в группы с большим числом вершин. Как видно на рис. 3, а–г, эти группы соединены сглаженными линиями клеточных стенок.

Длина и кривизна клеточных стенок при вершинах разной связности. Сравнивали показатели при вершинах связности 3 и 4 на интактных зародышах разных сроков инкубации и на 5-минутных эксплантатах. Обнаружено, что во всех случаях средние длины и кривизны стенок при вершинах связности 4 и более превышают таковые при вершинах связности 3 (достоверность различий по Вилкоксоу — $p < 0.003$; по Стьюденту — $p < 0.0004$). Средняя разность длин достигала 18%. На рис. 3, д–ж показаны характерные S-образные изгибы клеточных стенок.

Динамика углов при клеточных вершинах. В образце интактной эпизкотодермы полигон распределения величин углов при клеточных вершинах имеет четкий максимум в районе 120° (коэффициент эксцесса 1.8), что указывает на преобладание правильных гексагональных клеток (рис. 4). Уже через 5 мин после изоляции существенно возрастает доля углов, больших и меньших 120° (коэффициент эксцесса 0.2), что свидетельствует о деформации гексагональной решетки. Затем полигоны распределений постепенно возвращаются к исходному значению (на рис. 4 показан только полигон 4-часового эксплантата, у которого коэффициент эксцесса равен 1.7).

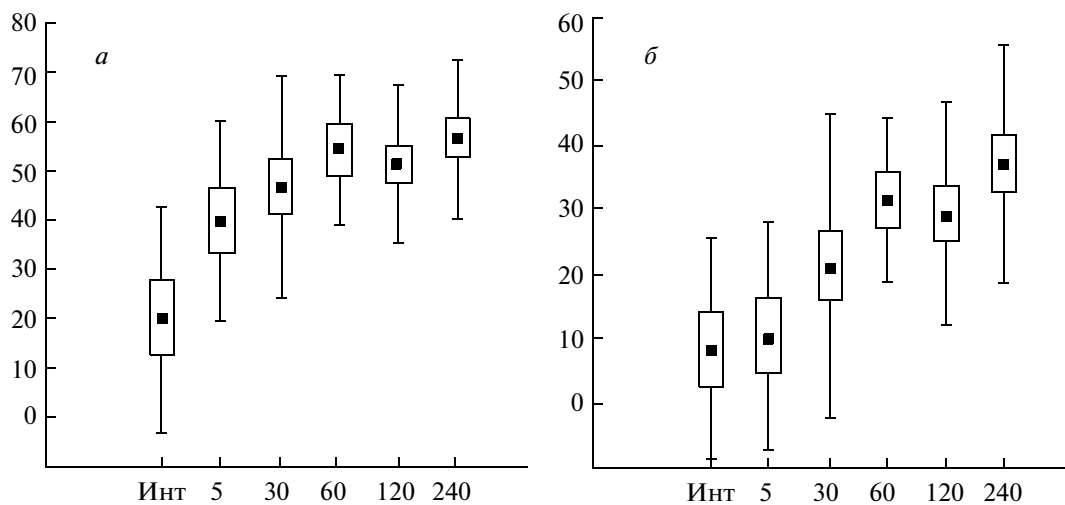


Рис. 2. Доля смежных вершин со связностью 4 по отношению к общему числу вершин данной связности на разных сроках после эксплантации и в интактном зародыше: а — общая доля; б — доля вершин, соединенных в группы более чем по две. (\blacksquare) — средние значения, (\square) — стандартная ошибка, (\perp) — стандартное отклонение, ост. обозначения см. на рис. 1.

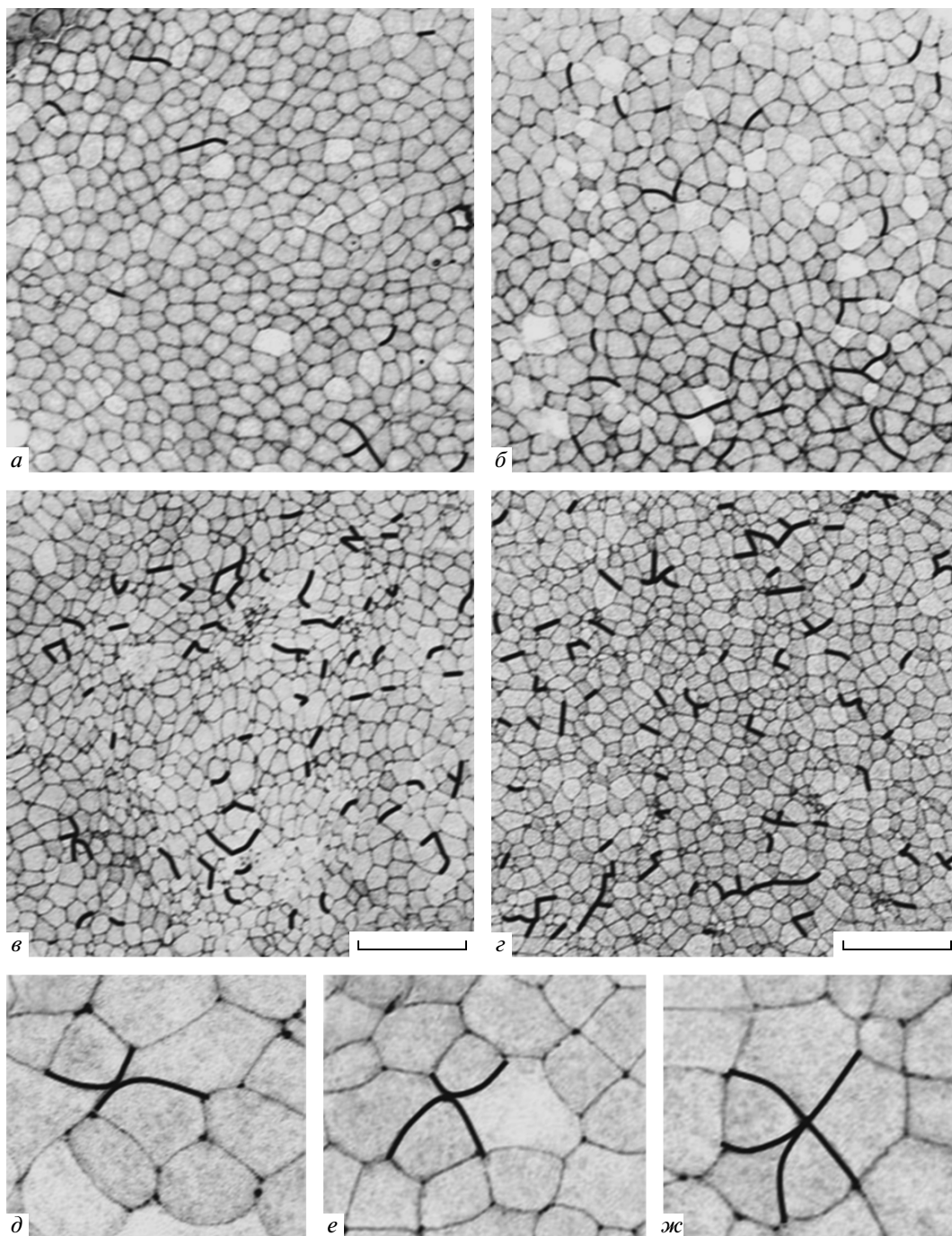


Рис. 3. Сглаженные линии клеточных стенок (выделены жирным), соединяющие смежные вершины связности 4 (*a* – образец интактной ткани на стадии 10–10.5; *б–г* – эксплантаты через 5, 60 и 240 мин соответственно) и примеры изогнутых клеточных стенок (выделены жирным) при вершинах связности 4 (*д, е*) и 5 (*ж*).

Изменения значений AI в релаксированных эксплантатах по сравнению с интактными зародышами тех же сроков развития. На рис. 5, *a–в* видно, что в эпителии эксплантата средние значения AI уже через 5–15 мин после вырезания начинают возрастать и к 60–120 мин с высокой достоверностью превышают начальные. Между тем в интактных образцах в

те же сроки протекает обратный процесс – AI уменьшается, т.е. клетки расплываются. Оба типа изменений AI коррелируют с изменениями тангенциальных натяжений – их релаксацией в эксплантате и возрастанием в интактном зародыше вследствие начала гаструляции. В эксплантатах 30 и особенно 60 мин выделяется существенная фракция клеток с

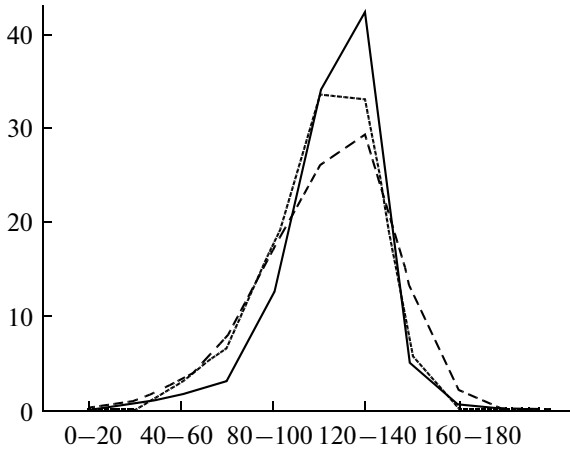


Рис. 4. Полигоны распределения величин углов при клеточных вершинах, ранжированные в группы по 20° , в эпизктерме интактного зародыша (—) и эксплантатов 5 мин и 4 ч инкубации соответственно (---), (···). По оси абсцисс — угловые градусы, по оси ординат — %.

$AI > 6$ (вплоть до $AI \approx 12$), отделенная заметным “провалом” от клеток с низкими AI . (рис. 5, з, д). Это фракция колбовидных клеток (рис. 6), которые впо-

следствии отрываются от поверхности эксплантата и погружаются внутрь клеточного пласта (рис. 6, в), в связи с чем к 4 ч инкубации их доля убывает (рис. 5, е).

Колебания относительных величин механических напряжений на поверхности эксплантатов по сравнению с поверхностью интактных зародышей тех же сроков развития. Приводимые в этом разделе оценки исходят из того, что механические напряжения на поверхности эксплантатов и интактных зародышей линейно зависят от деформаций, т.е. от растяжения или сжатия апикальных клеточных поверхностей (допущение упругости). Применительно к данному типу эмбриональной ткани допущение упругости оправдано для не слишком больших отрезков времени Δt , прошедших вслед за последней существенной ($\geq 0\%$) деформацией ткани: на более длительных сроках напряжение, как правило, релаксирует. Согласно данным Глаголевой с соавт. (2003), $\Delta t \approx 30$ мин. В эксплантатах в течение рассматриваемого отрезка времени Δt не превышает указанного порога.

На полутонких (перпендикулярных поверхности) срезах через эксплантаты и интактные зароды-

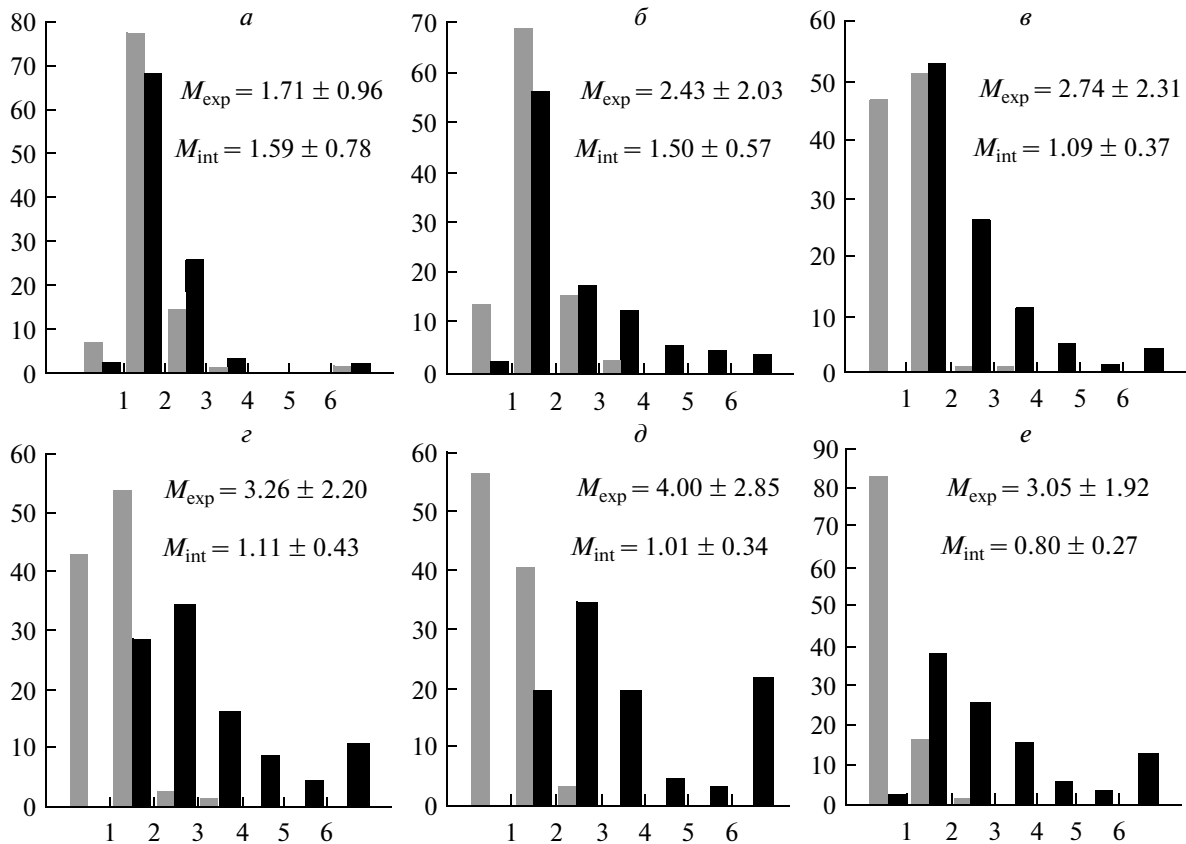


Рис. 5. Гистограммы апикальных индексов AI в эпизктерме эксплантатов (■) и интактных зародышей разных стадий развития (▣): а–е — 5, 15, 30, 60, 120, 240 мин инкубации соответственно. По оси абсцисс — значения AI , по оси ординат — %. M_{exp} и M_{int} — средние значения AI в эксплантатах и интактных зародышах указанных сроков соответственно.

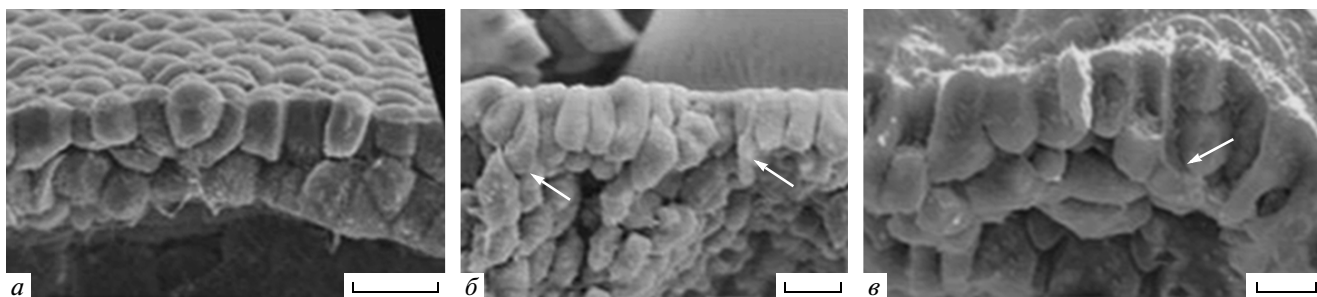


Рис. 6. Поперечные сколы интактного клеточного пласта (а) и эксплантатов через 30 (б) и 240 мин (в) после изоляции, сканирующая электронная микроскопия. (←) – колбовидные клетки с высокими значениями AI , которые постепенно погружаются в глубину пласта. Масштаб: а – 50, б – 30, в – 20 мкм.

ши каждого срока (от 5 до 240 мин) выделяли группы по 100 клеток, приходящиеся на несколько параллельных срезов. Измеряли суммарные длины L этих групп и длины апикальных поверхностей d (апикальные длины) всех клеток (рис. 7). Изменения механических напряжений в данных клеточных группах при переходе от каждого предыдущего к последующему сроку делили на две группы – внешнюю и внутреннюю ($\Delta\delta_{ext}$ и $\Delta\delta_{int}$). $\Delta\delta_{ext}$ считали в соответствии с допущением упругости, пропорциональным $\Delta L/L_0$, где ΔL – изменение общей длины группы клеток (ее растяжение считаем положительным, а сокращение – отрицательным), а L_0 – начальная длина (рис. 7, а). $\Delta\delta_{int}$ считали пропорциональным уменьшению длин (сокращению) апикальных длин d клеток, входящих в данную группу (при условии фиксации ее границ). Нетрудно убедиться, что $\Delta\delta_{int}$ пропорциональна сумме отклонений апикальных длин d индивидуальных клеток от среднего арифметического ($M = L/N$) апикальных длин всех клеток либо в положительную, либо в отрицательную сторону (оба значения равны по определению), т.е.

$$\Delta\delta_{int} = \sum_{i=1}^N (M - d_i) > 0.$$

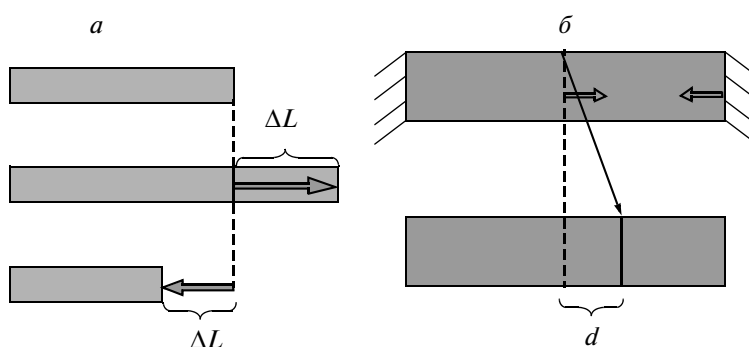


Рис. 7. Напряжения, возникающие в клеточном пласте с подвижными (а) и фиксированными (б) границами. Объяснения см. в тексте.

Для пояснения рассмотрим два последовательных состояния группы из двух клеток (рис. 7, б). Пусть в исходном состоянии обе клетки имеют одинаковую длину, равную M . Тогда внутренние напряжения равны нулю. Если же поверхность одной из клеток сократилась на ΔL до значения d_1 , то, исходя из допущения упругости и считая общую длину клеточной группы постоянной, внутреннее напряжение (равномерно распределенное по всей длине клеточной группы) возрастет как раз пропорционально $|M - d_1|$.

$\Delta\delta_{ext}$ и $\Delta\delta_{int}$ в интактных зародышах и эксплантатах выражали в процентах от суммарной длины выборок. Было обнаружено, что в интактном зародыше максимальные перепады по отдельности S_1 и S_2 деформаций не превышают 20% (рис. 8, а), а их сумма – 40% (рис. 8, б).

Между тем в эксплантатах эти величины по отдельности испытывают резкие колебания, достигающие 80 (рис. 8, в), а в сумме – до 60% (рис. 8, г). В течение первых 40 мин после изоляции сильно (на 80%) возрастают $\Delta\delta_{int}$ и несколько медленнее, причем почти на такую же величину, падает $\Delta\delta_{ext}$ (общая длина пласта уменьшается). В дальнейшем суммарное механическое напряжение в клеточной группе

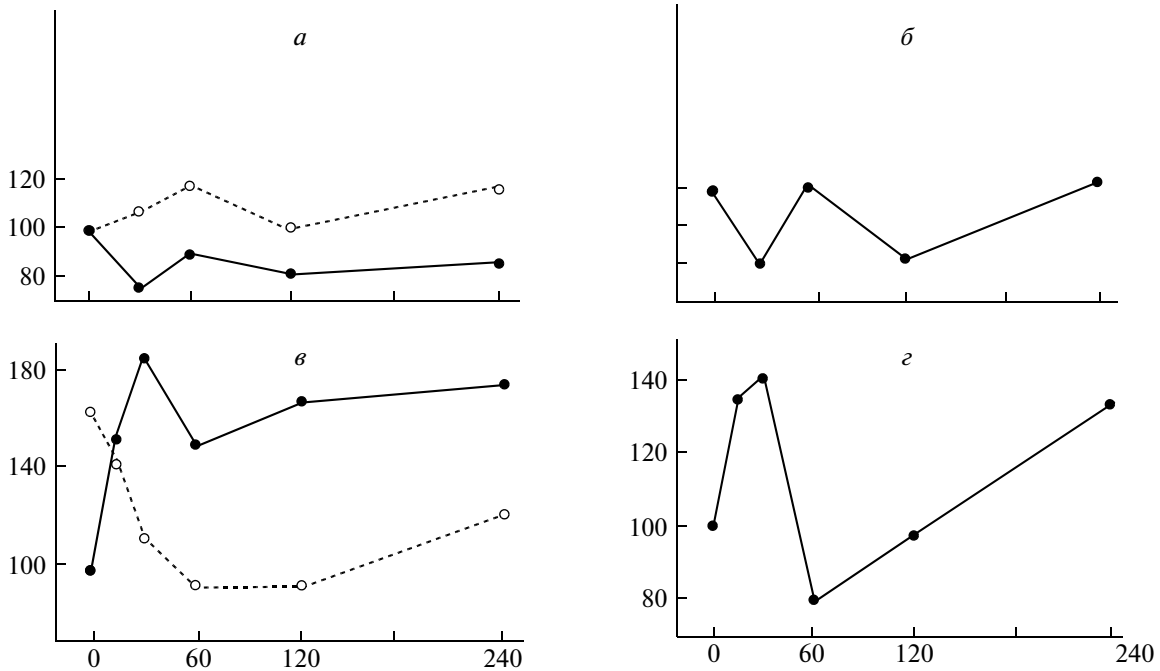


Рис. 8. Колебания механических напряжений (по оси ординат, %) в интактных зародышах (*a, б*) и эксплантатах (*в, г*) в зависимости от времени (по оси абсцисс, мин). *a, в* – δ_{ext} (---), δ_{int} (—); *б, г* – сумма δ_{ext} и δ_{int} .

возрастает исключительно за счет внешнего растяжения (связанного, как показывают гистологические данные, с образованием полостей внутри эксплантатов). В результате $\Delta\delta_{\text{ext}} + \Delta\delta_{\text{int}}$ в 4-часовом эксплантате существенно (на 40%) превышает исходное. Таким образом, произошло гипертоническое восстановление тангенциального натяжения поверхности, релаксированного после вырезания эксплантата. С другой стороны, в интактном зародыше суммарные напряжения все время незначительно колебались вокруг исходных значений.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изложенные выше данные демонстрируют несколько реакций клеточного пласта на релаксацию. Все они направлены на восстановление (как было показано, с “перехлестом”) релаксированных тангенциальных натяжений, но отличаются по своей топологии и по характерным временам. К первой, наиболее ранней реакции относится увеличение связности клеточных вершин и изменение гистограммы распределения углов при вершинах. Оба эти изменения отражают один и тот же процесс и свидетельствуют о том, что он протекает в плотно упакованной популяции клеток. Действительно, возрастание связности однозначно свидетельствует о сокращении до нуля существенной доли клеточных стенок (рис. 9, *a*: ребро *KL* редуцируется до точки *O*), что при сохранении плотной упаковки клеток как

раз и должно приводить к расхождению значений вершинных углов в обе стороны от 120° (рис. 9, *a*: углы *RSO* и *SOQ*). Такая редукция клеточных стенок (образование клеточных “розеток”) означает начало изменений контактов “клетка-клетка”, что имеет важное морфогенетическое значение, являясь предпосылкой клеточной интеркаляции. Образование клеточных “розеток” отмечено в первичной полоске куриного зародыша (Wagstaff et al., 2008) и в бластомере зародышей дрозофилы (Blankenship et al., 2006). Наши данные позволяют предположить, что релаксация механических напряжений существенна для запуска этого процесса.

Было также показано, что вершины высокой связности имеют тенденцию собираться в смежные группы, соединенные выровненными клеточными стенками. Эта тенденция тоже представляет морфогенетический интерес, так как может служить моделью деламинации. Обе тенденции могут быть объяснены на основе модели гипертонического восстановления механических напряжений.

Сокращение до нуля некоторой доли клеточных ребер можно рассматривать как непосредственный ответ на релаксацию, направленный к восстановлению натяжений. Однако, с точки зрения модели гипертонического восстановления, перестройки клеточной сети не должны на этом останавливаться. Действительно, при сокращении до нуля ребра *KL* (его схождения в точку *O*), все четыре ребра *a, b, c, d* растягиваются соответственно до a_1, b_1, c_1, d_1 (рис. 9, *a*). Согласно мо-

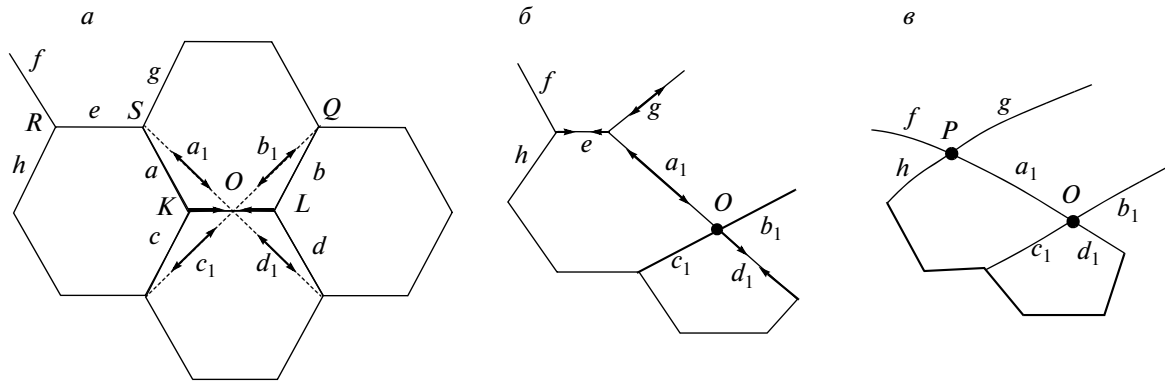


Рис. 9. Предполагаемая схема образования сглаженных линий клеточных стенок, образованных смежными вершинами связности 4. (←→) — растяжение—сжатие ребер, ост. объяснения см. в тексте.

дели гипервосстановления, вслед за пассивным растяжением должно наступить активное (встраивание новых субъединиц мембраны, скорее всего, путем экзоцитоза). Как раз на это указывает описанное выше превышение длины и кривизны стенок при вершинах связности 4 и выше над таковым при вершинах связности 3 (рис. 3, *д—ж*): структурам, находящимся под внутренним давлением, свойственно изгибаться. Вместе с тем строго равномерное растяжение всех четырех стенок представляет собой маловероятный (“негрубый”) вариант, более вероятно хотя бы небольшое преобладание растяжения одного из ребер (например, $a \rightarrow a_1$) — тогда эта стенка будет сжимать стенку *e* и растягивать стенку *g* (рис. 9, *б*). Согласно той же модели, стенка *e* должна сократиться до нуля, что приведет к соединению стенок *g c f i* и *h* в точке *P* (рис. 9, *в*). В результате возникнут две смежные вершины *O* и *P* связности 4 и сглаженная, слабо изогнутая линия клеточных стенок *fad*. Предлагаемая схема допускает дальнейшее развитие этого процесса, а также образование вершин более высокой связности (например, в результате сокращения до нуля стенки *d*, находящейся под давлением *a*, вершина *O* приобретет связность 5).

Более медленная реакция возрастания *AI*, т.е. радиальное удлинение и уменьшение апикальных поперечников ряда клеток практически до нуля, также направлена на восстановление релаксированных натяжений. С другой стороны, эту реакцию можно рассматривать как клеточную дифференцировку — эпителиально-мезенхимную трансформацию. Мы видим, что такой малоспецифический фактор, как релаксация механических напряжений, запускает целую связку топологических перестроек клеточных сетей. Это еще раз подчеркивает механозависимость морфогенеза и процессов клеточной дифференцировки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Глаголева Н.С., Белоусов Л.В., Штейн А.А., Лучинская Н.Н. Количественное исследование региональных и стадийспецифичных реакций эмбриональных тканей шпорцевой лягушки на механическую нагрузку // *Онтогенез*. 2003. Т. 34. № 4. С. 292—300.

Исаева В.В., Преснов Е.В. Топологическое строение морфогенетических полей. М.: Наука, 1990. 256 с.

Савостьянов Г.А. Основы структурной гистологии. Пространственная организация эпителиев. СПб.: Наука, 2005. 376 с.

Arnolds W.J.A., van den Biggelaar J.A.M., Verdonk N.H. Spatial aspects of cell interactions // *W. Roux. Arch. Devel. Biol.* 1983. V. 192. P. 75—85.

Belousov L. V. Mechanically based generative laws of morphogenesis // *Phys. Biol.* 2008. № 5. P. 15009—15028.

Blankenship J. T., Backovic S. T., Sanny J. S.P. et al. Multicellular rosette formation links planar cell polarity to tissue morphogenesis // *Devel. Cell.* 2006. V. 11. P. 459—470.

Brouzes E., Farge E. Interplay of mechanical deformations and patterned gene expression in developing embryos // *Curr. Opin. Genet. Devel.* 2004. V. 14. № 4. P. 367—374.

Dumais J. Can mechanics control pattern formation in plants? // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2007. № 10. P. 58—62.

Engler A.J., Shamik H., Sweeney L., Discher D.E. Matrix elasticity directs stem lineage specification // *Cell.* 2006. V. 126. № 4. P. 677—689.

McBeath M., Pirone D.M., Nelson C.M. et al. Cell shape, cytoskeletal tension and RhoA regulate stem cell lineage commitment // *Devel. Cell.* 2004. V. 6. P. 483—495.

Nieuwkoop P.D., Faber J. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1956. 243 p.

Ramasubramanian A., Taber L.A. Computational modeling of morphogenesis regulated by mechanical feedback // *Bio-mech. Mod. Mechanobiol.* 2008. V. 7. № 2. P. 77—91.

- Raucher D., Sheetz M.P.* Membrane expansion increases endocytosis rate during mitosis // *J. Cell Biol.* 1999. V. 144. P. 497–506.
- Truschel S.T., Wang E., Ruiz W.G. et al.* Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells // *Mol. Biol. Cell.* 2002. V. 13. P. 830—846.
- Wagstaff L.J., Bellet G., Mogensen M.M., Münsterberg A.* Multicellular rosette formation during cell ingression in the avian primitive streak // *Devel. Dyn.* 2008. V. 237. P. 91–96.
- Wozniak M.A., Chen C.S.* Mechanotransduction in development: a growing role for contractility // *Nat. Mol. Cell Biol.* 2009. V. 10. № 1. P. 34–43.

Changes in Topology and Geometry of the Embryonic Epithelium of *Xenopus* during Relaxation of Mechanical Tension

A. Yu. Evstifeeva, S. V. Kremnev, L. V. Belousov

Lomonosov State University, Leninskie gory, GSP-2, Moscow, 119992 Russia

e-mail: morphogenesis@yandex.ru

Abstract—The paper presents the results of statistical evaluation of the changes of cellular apex connections, apical angles, and apical indices of ventral cells of the epiectodermal gastrula of *Xenopus* during the first four hours after the relaxation of mechanical tension. In the unrelaxed epithelium, an overwhelming majority of cells have three apical connections, apical angles close to 120°, and apical indices around one (isodiametric cells); after relaxation, the number of cells with more than three connections, the number of apical angles deviating substantially from 120°, and the percentage of columnar cells with high apical index increase. Apices with more than three connections tend to gather in enclosed groups, forming a smooth line of cell walls. The length and curvature of cell walls with four apical connections significantly exceeds those same indicators for cells with three apical connections. The observed changes in topology and geometry of cells correspond to reconstructions observed during normal morphogenesis. They are considered in terms of the hyper-restoration model of mechanical tension in relaxed epithelial layers.

Key words: epithelium, gastrula, *Xenopus*, apical angles, degree of apex, apical index, topology, geometry, morphogenesis, mechanical stress