

УДК 591

НЕЙРУЛЯЦИЯ ПРОДОЛЖАЕТСЯ: КОМАНДУЕТ ПАРАДОМ ... АПИКАЛЬНАЯ КОНСТРИКЦИЯ

© 2014 г. В. Корж^{1,2}

¹Институт молекулярной и клеточной биологии,

Агентство по вопросам науки, технологии и исследований, Сингапур

²Факультет биологических наук, Национальный Университет Сингапура

e-mail: vlad@imcb.a-star.edu.sg

Поступила в редакцию 27.11.13 г.

Окончательный вариант получен 13.02.14 г.

Традиционно нейруляция определяется как процесс закрытия нервной трубки. Новые данные показали, что с закрытием нервной трубки основные движущие силы нейруляции продолжают действовать, по крайней мере, до тех пор пока не сформируется центральный канал нервной трубки. В этой связи в данной работе предложено выделить два периода нейруляции. Согласно этим представлениям ранняя нейруляция соответствует периоду закрытия нервной трубки, а поздняя нейруляция – периоду формирования центрального канала. Обсуждаются примеры дефектов нервной трубки, затрагивающие позднюю нейруляцию.

Ключевые слова: ранняя и поздняя нейруляция, центральный канал, покровная пластинка, Ф-актин, Zic6, Rock, *Danio rerio*.

DOI: 10.7868/S0475145014040065

*Нейруляция – процесс формирования
нервной трубки*

Врожденные дефекты являются основной причиной детской смертности в возрасте до года (Petrini et al., 2002). Существенный вклад в эту грустную статистику вносят дефекты нервной трубки (ДНТ). Как правило, ДНТ возникают вследствие аномальной нейруляции и относятся к наиболее частым врожденным дефектам (1–2 на 1000 новорожденных). Эти цифры варьируют в разных странах (Copp et al., 2003; Wallingford et al., 2013). Как правило, статистика учитывает только наиболее ярко выраженные ДНТ и в том числе анэнцефалию, энэнцефалию, краниоррашишкитис (*craniorachischisis*) и раздвоение позвоночника (*spina bifida*). Что же касается скрытых дефектов как правило выражающихся в расширении полости центрального канала спинного мозга, то оказалось, что они также влияют на качество жизни пациентов. До внедрения диагностики нервной трубки с помощью метода магнитно-резонансной томографии (МРТ) многие из этих случаев оставались незамеченными. Поскольку эти дефекты выражены относительно слабо, в своем большинстве они, вероятно, представляют варианты известных ДНТ. Возможно, часть этих нарушений возникают вследствие нарушения событий, кото-

рые имеют место после закрытия (или кавитации) нервной трубки.

Как изменялось определение нейруляции...

Нарушения нейруляции интересовали исследователей во все времена. Так закрытие нервной трубки было детально описано Колликером в 1861 г. и Гиссом в 1874 г. (Kolliker, 1861; His, 1974; Obladen, 2011). Согласно Карфункелю (Karfunkel, 1974), С.О. Джэкобсон в 1962 г. определил нейруляцию как серию событий, которая приводит к закрытию нервной пластинки и формированию нервной трубки, а затем слиянию латеральной эктодермы по дорсальной средней линии. Вслед за ним Карфункель (1974) предложил вероятно наиболее краткое и вместе с тем наиболее широкое определение нейруляции, как “процесс формирования нервной трубки”. При обсуждении нейруляции у цыплят Колас и Шоэнвольф (Colas and Schoenwolf, 2001) предложили рассматривать нейруляцию как процесс развития, который приводит к сворачиванию плоского слоя эпителиальных клеток в вытянутую трубку. Эти же авторы четко определили четыре стадии первичной нейруляции на тканевом уровне: формирование нервной пластинки, приобретение ею определенной формы, изгибание нервной пластинки и закрытие нервной бороздки. И, тем не менее, не-

смотря на длительную историю исследования процесса нейруляции, фундаментальные механизмы, действующие в процессе закрытия нервной трубки, а равно и дефекты этого процесса, исследованы недостаточно.

Типы нейруляции

Итак, по современным представлениям нейруляция у всех видов животных начинается с нервной пластинки и заканчивается нервной трубкой. Что же касается событий между этими двумя состояниями, то у разных видов морфология этого процесса существенно различается и может быть разделена на первичную и вторичную нейруляцию. Первичная нейруляция, описанная при формировании передней части нервной трубки у птиц и млекопитающих характеризуется формированием, поднятием и слиянием нервных валиков (Copp et al., 2003; Colas and Schoenwolf, 2001). В отличие от этого, вторичная нейруляция начинается с миграции клеток нервной пластинки к средней линии, что приводит к ее утолщению и формированию нервного кила с последующей трансформацией его в нервный стержень, который в дальнейшем претерпевает кавитацию и превращается в нервную трубку. Вторичная нейруляция наблюдается при формировании задней части нервной трубки млекопитающих, где после закрытия заднего нейропора (E9.5–10.0) первичная нервная трубка вытягивается в каудальном направлении и нейроцель (примитивная полость нервной трубки) формируется за счет кавитации посредством удлинения предсуществующей полости первичной нервной трубки (Naidich et al., 1984; Nievelstein et al., 1993; Schoenwolf, 1984). Такой же тип нейруляции описан у костистых рыб, таких как медака и данио (Strahle and Blader, 1994).

И потому не следует удивляться тому обстоятельству, что в переходной зоне между передней и задней частями нервной трубки у млекопитающих нейруляция проходит по типу промежуточной между первичной и вторичной нейруляцией, который напоминает нейруляцию у амфибий и хрящевых рыб (Detlaff et al., 1993; Wallingford et al., 2013; Васецкий С.Г., личное сообщение). Например, у аксолотля нервная пластинка сперва утолщается, как у костистых рыб, но не полностью так что нервный киль не формируется, а утолщенная нервная пластинка сворачивается в нервную трубку. Это приводит к тому, что нейроцель возникает в более дорсальном (по сравнению с птицами) положении.

Было бы полезно провести более детальный анализ нейруляции как в промежуточной зоне у млекопитающих, так и у видов с промежуточным типом нейруляции и сравнить его детали на молекулярном уровне с тем, что известно в отношении первичной и вторичной нейруляции. Ведь неко-

торые авторы полагают, что первичная и вторичная нейруляции отличаются довольно существенно. Эти соображения находят косвенное подтверждение в результатах анализа формирования осевых структур у данио, где было показано, что дорсальная мезодерма дает начало нотохорду и сомитам туловища, а вентральная мезодерма — сомитам хвоста (Agathon et al., 2003). С учетом индуктивных взаимодействий между нервной пластинкой и латеральной мезодермой можно ожидать, что дорсальная и вентральная мезодерма отличаются своим молекулярным содержанием и генерируют несколько отличный набор индукторов, эффект которых на события нейруляции вдоль передне-задней оси отличается. И все же даже, несмотря на то, что формирование передней и задней нервной трубки различается как морфологически так и в какой-то степени на молекулярном уровне, процесс нейруляции в целом осуществляется согласно общим правилам морфогенеза, которые в свою очередь зависят от общих биофизических детерминантов определяющих форму клеток и органов (Belousov and Lakirev, 1991; Colas and Schoenwolf, 2001). В частности, недавний прогресс в понимании нейруляции продемонстрировал эволюционный консерватизм молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе обоих типов нейруляции (см. обзор, Solnica-Krezel, 2006; Wada and Okamoto, 2009).

Необходимо отметить, что у млекопитающих переход от первичной к вторичной нейруляции происходит по мере того, как постепенно уменьшается масса нервной ткани. Кстати, разница в размерах нервных валиков и их постепенное уменьшение в передне-заднем направлении не осталась незамеченной. Полагают, что именно это обстоятельство лежит в основе различий в топологии нейруляции на разных уровнях вдоль передне-задней оси тела у одного и того же животного (Colas and Schoenwolf, 2001). И потому возможно не случайно то обстоятельство, что вторичная нейруляция у млекопитающих имеет место в задней части тела, где масса нервной ткани значительно меньше, чем в передней. Подобные аргументы можно привлечь к анализу нейруляции у рыб, где у видов с большими яйцеклетками нейруляция более напоминает этот процесс у амфибий, а уменьшение размеров яйцеклетки коррелирует с переходом ко вторичной нейруляции, как у данио (Detlaff et al., 1993; Strahle and Blader, 1994; Papan and Campos-Ortega, 1999; Korzh et al., 1993; Korzh, 1994; Kimmel et al., 1995).

Существенно также и то, как происходит закрытие нервной трубки у разных видов животных (Copp et al., 2003). У млекопитающих нервные валики замыкаются прежде всего на уровне продолговатого мозга и далее этот процесс распространяется каудально и рострально (закрытие 1). Место закрытия 2, которое у мышей находится на

границе переднего и среднего мозга, у различных линий мышей варьирует, а у человека закрытие 2 вообще отсутствует. Еще один участок смыкания нервных валиков у мышей и человека находится на уровне переднего мозга, откуда этот процесс распространяется в каудальном направлении (закрытие 3). По понятным причинам описание событий нейруляции у человека остается неполным и противоречивым. Следствием этого является весьма осторожный подход к интерпретации патологии нейруляции человека на основании данных полученных на других видах и прежде всего на мышах (см. обзор O'Rahilly and Muller, 2002; Padmanabhan, 2006). И это несмотря на то, что исследования нейруляции на мышах основаны на анализе мутантов, который внес существенный вклад в понимание молекулярных механизмов нейруляции. Вместе с тем прежде чем переносить эти представления на нейруляцию у человека было бы желательно, чтобы результаты, полученные на мышах, были подтверждены данными экспериментального анализа нейруляции у других видов животных. В частности существенный вклад в современные представления о молекулярных механизмах этого процесса был внесен исследованиями нейруляции у рыб и амфибий (Wallingford, 2006, 2013; Lowery and Sive, 2004). А поскольку у человека проявление мутаций может иметь видоспецифический характер, ограничение исследований нейруляции анализом этого процесса у грызунов может оказаться весьма недальновидным.

В частности анализ нейруляции у видов с внешним оплодотворением делает возможным прямое наблюдение этого процесса. Так, например, нейруляция у амфибий (тритона и ксенопуса) была документирована *in vivo* с использованием видеосъемки (Wallingford and Harland, 2002; <http://www.sdbc.org/object?ObjectID=266>; Wallingford, 2005; <http://www.bio.utexas.edu/faculty/wallingford/Movies/ax6.mov>; см. также фильм Дэвида Шука http://faculty.virginia.edu/shook/ShowMovies/Xenopus_Gastrulation.mov). Эти фильмы демонстрируют, что у амфибий также как у млекопитающих нервный валик смыкается сперва в районе промежуточного мозга и далее нервная трубка замыкается в обоих направлениях. Следовательно, у амфибий имеет место закрытие 1. А поскольку для наблюдения закрытия 3 необходимы иные проекции, в настоящее время вопрос о наличии закрытия 3 у амфибий остается открытым. Что же касается нейруляции у костистых рыб, то имеющиеся видеофильмы или недостаточно контрастны или будучи выполнены на трансгенных эмбрионах экспрессирующих флуоресцентные белки иллюстрируют только определенные детали нейруляции (Geldmacher-Voss et al., 2003). Остается только сожалеть об отсутствии таких фильмов поскольку данио и медака также как и мышь позволяют эффективно применять к анализу про-

цессов развития мутационный анализ. Вероятно, следует подумать о создании трансгенных линий данио специально для наблюдения нейруляции. Для этого можно было бы объединить различные трансгенные линии и создать комбинированных животных экспрессирующих несколько трансгенов. Перспективным для этой цели представляется также использование новых методов микроскопии таких, как например, микроскопия с освещением в одиночной плоскости (single plane illumination microscopy, SPIM; см. обзор, Корж и Воланд, 2012; Huisken and Stainier, 2009).

Может оказаться весьма продуктивной попытка использования данио в качестве модели нейруляции в каудальном участке нервной трубки млекопитающих, где также имеет место вторичная нейруляция. В этом участке нарушения нейруляции вызывают *spina bifida*. Хотя события нейруляции в этом участке изучались на цыплятах и мышах, их механизм изучен недостаточно и в частности понимание генетического контроля требует дальнейших исследований (Gofflot et al., 1997; Muller and O'Rahilly, 2004). Это еще раз подчеркивает необходимость применения комплементарного подхода в изучении нейруляции на модельных животных (Wallingford et al., 2013).

Факторы нейруляции

Уже шла речь о том, что несмотря на явные морфологические отличия оба типа нейруляции зависят от сходных общих детерминант и в том числе биофизических параметров определяющих форму и действующих в эпителиальных зачатках. Таковыми являются поверхностное натяжение возникающее вследствие клеточной адгезии, гравитации, вязкости и эластичности (Newman and Comper, 1990; Foty et al., 2004; Forgacs et al., 1998; см. Colas and Schoenwolf, 2001). На клеточном уровне нейруляция зависит от давления извне на латеральный участок нервной пластинки, которое возникает вследствие пролиферации клеток мезодермы подстилающих эту часть нервной пластинки. В этой связи особый интерес представляют попытки связать мутации генов, принимающих участие в этом процессе, с ДНТ у человека. Мальформация Киари 1 типа (МК1) считается врожденной патологией формирования нервной трубки, связанной с расширением центрального канала по типу сирингомиелии (см. ниже; Селезнева и др., 2003; Barry et al., 1957; Gardner and Goodall 1950; Sarnat, 2008). Недавно была проанализирована связь МК1 с 58 генами участвующими в формировании параксиальной мезодермы и оказалось, что по крайней мере мутации трех генов (CDX1, FLT1 and ALDH1A2) связаны с этим дефектом (Urbizu et al., 2013). В частности, ALDH1A2 участвует в регуляции метаболизма ретиноевой кислоты (РК), которая в свою очередь

тесно связана с конвергентным удлинением тела в процессе гастрюляции (Kam et al., 2013); CDX1 взаимодействует с PK (Langerke et al., 2011); FLT1 регулирует клеточную полярность и подвижность посредством активации PI3K, MAPK/ERK, АСТ1 сигнальных каскадов (Wang et al., 2011).

Важную роль в нейруляции выполняют внутренние факторы и прежде всего апикальная констрикция и клеточная пролиферация в нервной трубке (Bohme, 1988; Copp et al., 2003). Апикальная констрикция происходит за счет сокращения Ф-актина (см. обзор, Sawyer et al., 2010). Совсем недавно было показано, что в процессе апикальной констрикции важную роль выполняет эндцитоз посредством которого удаляется избыток мембраны возникающий при сокращении актомиозина у апикальной поверхности клеток (Lee and Harland, 2010).

Все те же внутренние факторы продолжают действовать и после закрытия (или кавитации) нервной трубки. К ним присоединяется еще один фактор, а именно постоянное увеличение числа аксонов в вентро-латеральной нервной трубке создающее дополнительное давление на клеточную территорию нервной трубки и способствующее редукции нейроцеля на поздних стадиях нейруляции (Bohme, 1988; Kondrychyn et al., 2013).

К настоящему времени выявлены несколько молекулярных регуляторов апикальной констрикции, клеточной пролиферации и аксоногенеза и в том числе Shroom3, Abl/Arg, Rap1, Rho киназа (Rock), Mena/Vasp, MARCKS, миозин IIВ. Эти белки связывают нейруляцию с сократительным цитоскелетом (Haigo et al., 2003; Hildebrand and Soriano, 1999; Hildebrand et al., 2005; Kinoshita et al., 2008; Koleske et al., 1998; Menzies et al., 2004; Nishimura and Takeichi, 2008; см. обзор Sawyer et al., 2010). Эти белки сохраняют активность и после закрытия нервной трубки, т.е. в процессе превращения примитивной полости нервной трубки (нейроцеля) в центральный канал, которое происходит параллельно с интенсивным растяжением клеток покровной пластинки нервной трубки (Sevc et al., 2009; Kondrychyn et al., 2013). Эти наблюдения дают основания полагать, что нейруляция не заканчивается в момент закрытия (или кавитации) нервной трубки.

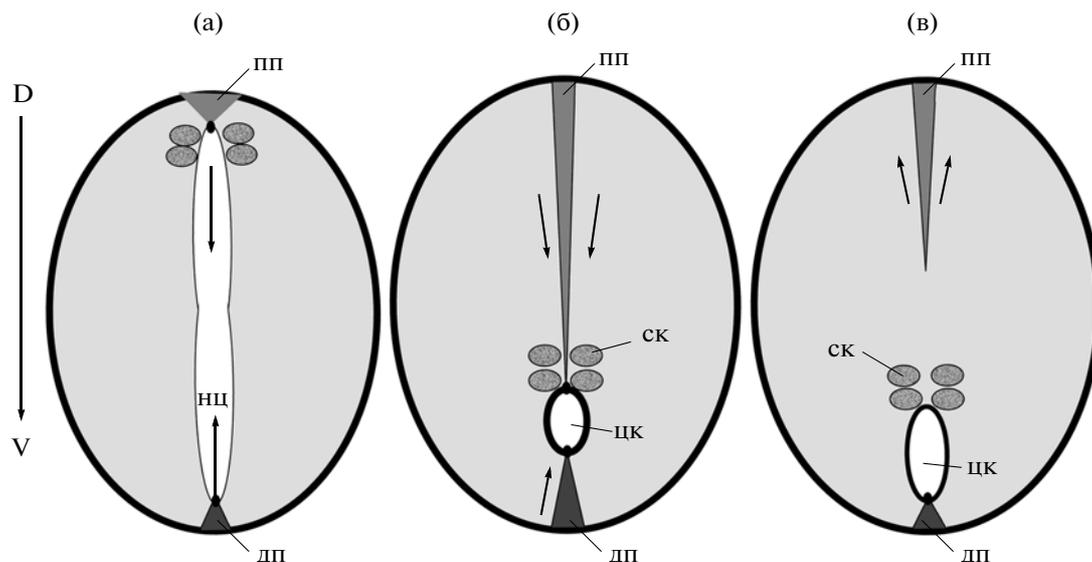
Нарушение регуляции генов экспрессирующихся в покровной пластинке прерывает их контакт с центральным каналом и вызывает деформацию последнего (Kondrychyn et al., 2013). Можно полагать, что этим неприятности только начинаются. Отсутствие контакта покровной пластинки с центральным каналом не может не нарушать передачу морфогенетических сигналов из покровной пластинки, а это в свою очередь вероятно приведет к нарушению дифференцировки нейральных клеток. Более того, изменение формы центрального канала также может повлечь за

собой нарушение циркуляции спинно-мозговой жидкости с далеко идущими последствиями, как, например, болезни выражающиеся в преждевременной дегенерации нервных клеток (Johanson et al., 2008).

Завершение нейруляции

Представляется, что для начала дискуссии о том, какое событие считать концом нейруляции, наиболее подходящим является лаконичное определение этого процесса Карфункелем (1974) согласно которому нейруляция завершается формированием нервной трубки. Следовательно, необходимо определить тот момент, когда завершается формирование нервной трубки. В этом контексте необходимо рассмотреть два обстоятельства о которых уже шла речь. Первое из них – слияние нервных валиков, которое у видов со вторичной нейруляцией соответствует кавитации. С учетом того, что у млекопитающих и амфибий этот процесс развивается постепенно, в реальном времени он занимает некоторое время. Следовательно, можно говорить о “периоде” слияния нервных валиков. Второе – более поздний период соответствует завершению превращения примитивного просвета нервной трубки (нейроцеля) в центральный канал.

Здесь необходимо упомянуть, что после слияния нервных валиков и закрытия нервной трубки движущие силы нейруляции продолжают действовать. Продолжается процесс апикальной констрикции, который прежде всего зависит от сокращения Ф-актина, идет пролиферация нейральных клеток, нарастает число аксонов (Bohme, 1988; Copp et al., 2003, Sawyer et al., 2010). Эти факторы ответственны за превращение нейроцеля в центральный канал и морфогенез сигнальных центров нервной трубки – покровной и донной пластинок (Snow et al., 1990; Sevc et al., 2009; Kondrychyn et al., 2013). У данио начало удлинения покровной пластинки совпадает с выплыванием, что соответствует завершению эмбриогенеза. А завершение морфогенеза покровной пластинки и центрального канала как у костистых рыб так и у млекопитающих приходится на период раннего постнатального развития (Li et al., 2009; Kondrychyn et al., 2013). Поскольку движущие силы нейруляции продолжают действовать и после закрытия нервной трубки, можно предположить, что нейруляция закрытием нервной трубки не заканчивается. Возможно, нейруляция завершается формированием центрального канала? Ведь этим событием завершается наиболее активная фаза морфогенеза нервной трубки. На этом этапе наблюдается прекращение сокращения Ф-актина вследствие апикальной констрикции, существенно замедляется удлинение клеток покровной пластинки. Что же касает-



Морфогенез покровной пластинки и центрального канала в развитии костистых рыб на модели данио. а – контроль, диаграмма поперечного среза тела эмбриона данио на уровне удлиненного желтка, 48 ч после оплодотворения; нейроцель еще не сократилась, клетки покровной пластинки (ПП) относительно компактны, стволовые клетки (СК) находятся вблизи от ПП; б – контроль, диаграмма поперечного среза тела на уровне удлиненного желтка, 72 ч после оплодотворения; нейроцель (НЦ) сократилась и превратилась в центральный канал (ЦК), клетки ПП растянулись пропорционально сокращению НЦ и перекрыли 2/3 диаметра нервной трубки; клетки донной пластинки (ДП) тоже вытянулись, но очень умеренно; в – *Zis6* морфант, диаграмма поперечного среза тела на уровне удлиненного желтка, 72 ч после оплодотворения, клетки ПП утратили контакт с ЦК и сократились сместившись дорсально, ДП сократилась сместив ЦК и СК вентрально.

ся клеточной пролиферации и формирования ахоннов, то эти процессы продолжают и позже, а следовательно они характерны не только для периода нейруляции и имеют более общий характер.

Таким образом, нейруляцию можно разделить на два основных этапа. Ранняя нейруляция завершается закрытием нервной трубки, а поздняя нейруляция начинается после этого периода и завершается формированием центрального канала. Этот последний процесс происходит параллельно с удлинением клеток покровной пластинки, делая эти клетки удобным маркером формирования центрального канала (рисунок). По его завершении удлинение клеток покровной пластинки резко замедляется, но, тем не менее, продолжается ввиду постоянного роста нервной трубки до той поры, пока процесс роста всего организма продолжается как таковой.

Патология нейруляции у модельных животных

Анализ аномального развития нервной трубки уже с самого начала привел в появлении двух теорий объясняющих причины ДНТ. Одна из них была предложена еще до того, как был описан процесс нейруляции. В 1769 г. Моргани, работы которого положили начало патологии, предложил, что нервная трубка может открыться из-за избыточного давления спинномозговой жидкости

(Morgagni, 1769). А после того как нейруляция была описана Колликером и Гиссом, была предложена идея о том, что ДНТ возникают вследствие нарушения слияния нервных валиков (von Recklinghausen, 1886; Padmanabhan, 2006; Van Allen et al., 1993). Далее эти идеи в разных вариациях использовались для описания закрытия нервной трубки у разных видов животных и в том числе человека. С началом молекулярной эры к анализу механизмов нейруляции привлекли генетический анализ и к настоящему времени у мышей охарактеризованы более 200 генов, мутации которых вызывают дефекты нервной трубки (Harris and Juriloff, 2010). Однако не все эти гены связаны с ДНТ человека, что служит хорошей иллюстрацией видоспецифической вариации молекулярной программы нейруляции. Несмотря на это мутации многих генов регулирующих несколько эволюционно консервативных сигнальных каскадов (например, неканонический Wnt) или процессов (например, клеточная полярность, конвергентное удлинение, цилиогенез) вызывают нарушение нейруляции как у млекопитающих так и у костистых рыб (Wallingford et al., 2013; Wada and Okamoto, 2009). В частности у данио нарушения нейруляции связаны с нарушением функции одной из Na/K-АТФаз (*atp1a1*, мутант *snakehead*), N-cadherin (мутант *parachute*), *Mypt-1* (Gutzman and Sive, 2010), *Arnt2*, *Claudin5a*, *Fibronectin* (му-

тант natter); Pardbyb (Munson et al., 2008); нескольких Zic генов (Elsen et al., 2008; Nyholm et al., 2009). Недавно нарушение формирования центрального канала было отмечено при нарушении функции Zic6 и Rho-киназы (Rock; Kondrychyn et al., 2013).

*Патология центрального канала
у человека и животных*

Повышение частоты аномального развития нервной трубки было найдено в тех случаях, когда беременные женщины страдали ожирением или диабетом. С учетом того обстоятельства, что число больных страдающих болезнями метаболизма стремительно растет (Padmanabhan, 2006) вероятно следует ожидать увеличения количества пациентов с разными формами ДНТ. Этот же эффект наблюдается у беременных женщин страдающих эпилепсией и принимающих противосудорожные препараты содержащие вальпроаты или трихостатин. Эти лекарства ингибируют деацетилазы гистонов и вызывают эпигенетические изменения хроматина (Copp et al., 2003; Wallingford et al., 2013). Вместе с тем было отмечено, что в последнее время в неврологической практике наблюдается снижение частоты и выраженности ДНТ. Это может быть следствием улучшения питания и его разнообразия, а также добавками фолиевой кислоты (ФК, фолат или витамин B₉) в пшеничную муку в США, Канаде, Австралии и других странах, или же повышением эффективности контроля в период беременности практикуемого в Европе.

В этом контексте хотелось бы ответить на несколько вопросов. Какова судьба тех детей из групп риска, которые были спасены от ДНТ добавками ФК? Как происходило их развитие и каково состояние их здоровья в зрелом возрасте? Каков эффект этой терапии на пул вредных мутаций в популяции? Если недостаток фолатов оказывает влияние на несколько поколений потомков (Padmanabhan et al., 2013), то какой эффект вызывает избыток фолатов? Вероятно эти вопросы еще долго будут оставаться без ответа. Ведь ни в одной из стран, где практикуют добавки ФК, нет долгосрочного мониторинга детей из групп риска (R.J. Vegu, личное сообщение), не говоря уже о анализе последующих поколений, необходимость которой стала ясна совсем недавно.

ФК терапия является предметом постоянной дискуссии. В частности недавно было показано, что нарушение метаболизма ФК у мышей оказывает долгосрочный эффект на эпигенетическом уровне выявляемый даже через пять поколений (Padmanabhan et al., 2013). Эти результаты позволяют предположить, что повышенный уровень ФК также вызывает эпигенетические эффекты. А потому увеличение дозы ФК в пище

здоровых беременных женщин может оказаться не столь уж безобидным с учетом того обстоятельства, что ФК стимулирует клеточную пролиферацию и потенциальные долговременные побочные эффекты этого воздействия до сих пор исследованы не в полной мере (Wallingford et al., 2013). Некоторое подтверждение эти соображения получили в данных по влиянию добавок ФК на срок беременности. В исследовании проведенном недавно в Норвегии было показано, что прием добавок содержащих ФК более чем за 8 недель до зачатия повышает вероятность преждевременного рождения ребенка (Sendpiel et al., 2013).

Патология ранней нейруляции приводит к ярко выраженным и легко детектируемым морфологическим признакам. Что же касается слабо выраженных форм ДНТ, которые в частности могут быть следствием патологии поздней нейруляции, то здесь внешние признаки практически не выражены и надежная статистика отсутствует. Однако можно думать, что такие формы ДНТ не только встречаются значительно чаще, чем острые формы ДНТ, но и сохраняются в популяции. Такие нарушения представленные в виде локализованного расширения центрального канала сопровождаются диссоциированной хронической болью и нарушением чувствительности кожи к температурным воздействиям. Их диагностируют как гидромиелию (hydromyelia) или сирингомиелию (syringomyelia) или идиопатическую сирингомиелию (idiopathic syringomyelia). Не вникая в историю терминологической путаницы, здесь достаточно отметить несколько попыток определить эти состояния более строго (Jenkins and Sener, 1999; Milhorat, 2000; Roser et al., 2010). В частности в более поздней из этих работ (Roser et al., 2010) сирингомиелия определяется как более серьезное состояние включающее “аномалию нервной трубки у основания черепа, и в том числе мальформацию Киари, сращение нервной трубки с окружающими тканями, раздвоение позвонника (открытая и закрытая формы), субарахноидальные цисты, опухоли спинного мозга, сколиоз в тяжелой форме, травму спины записанную в историю болезни, состояние после менингита, любую форму хирургии спинного мозга, а также перидуральную анестезию”. Расширение полости центрального канала бывает довольно обширным и может располагаться на протяжении 10 сегментов (Заббарова и др., 2010). В противоположность этому гидромиелия, как правило, представляет собой значительно менее опасное состояние характеризующееся продолговатым расширением центрального канала 3–5 сегментов в длину, расположенным в торакальной области спинного мозга. Эти пациенты не страдают от серьезных неврологических недостатков однако испытывают рассеянные болевые ощущения, которые отличны от нейропатической боли при диссоциативном син-

дроме (Roser et al., 2010). Следовательно по сравнению с сирингомиелией, гидромиэлия представляет собой менее опасную форму расширения центрального канала. Полагают, что гидромиэлия может являться состоянием предшествующим сирингомиелии (Roser et al., 2010). В отсутствие надежной статистики о частоте гидромиэлии в популяции для грубой оценки можно воспользоваться причинно-следственной связью гидромиэлии и сирингомиелии. По непонятным причинам только у 5% пациентов с незначительными травмами спинного мозга возможны осложнения в форме сирингомиелии. Не может ли это число отражать частоту гидромиэлии в популяции? Вероятно, обоснованный ответ на этот вопрос придется отложить до тех пор пока исследования с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) не предоставят достаточное количество данных для проверки этой гипотезы. Механизм формирования полостей в спинном мозге все еще остается неясным (Заббарова и др., 2010) однако можно предполагать, что они могут быть как наследственными так и приобретенными состояниями.

Гидромиэлия и сирингомиелия характерны не только для человека. Ввиду внедрения МРТ в ветеринарную практику эти состояния были описаны также у домашних животных (лошадь, верблюд, собака, кот; Sponseller et al., 2011). Показано повышение частоты таких заболеваний у определенных пород животных. Например, у спаниэлей породы кавалер Король Чарльз сирингомиелия является относительно частым неврологическим диагнозом (Rushbridge et al., 2006). Это же состояние было зарегистрировано и у более экзотических видов животных, как например, у одного из видов оленей (Reeves' Muntjac; Dutton et al., 2002). Эти данные представляют еще один аргумент в пользу сходства молекулярной программы нейруляции вне зависимости от того блокируется ли центральный канал по мере взросления организма. Такой блок центрального канала наблюдается у видов, проводящих значительную часть времени с головой в вертикальном положении по отношению к телу, как-то человек и приматы, верблюд и летучие мыши, у которых голова располагается значительно выше или ниже тела. Центральный канал остается открытым у тех видов у которых голова расположена на уровне тела (собака, рыбы, амфибии, грызуны; Galarza, 2002).

Морфологические проявления нарушения поздней нейруляции вызванные подавлением активности *Zic6* и Rho-киназы в экспериментах на данио (рисунок) также, вероятно, следует классифицировать в контексте развития представлений о гидромиэлии и сирингомиелии. В частности подавление активности *Zic6* и немышечного миозина IIА (*myh9*) вызывает относительно незначительное расширение центрального канала сходное с гидромиэлией. При ингибировании ак-

тивности Rho-киназы расширение центрального канала охватывает более обширную область центрального канала и судя по вытеканию красителя из его полости сопровождается сиринксами (Kondrychyn et al., 2013; наши неопубликованные данные). Следовательно, это нарушение по морфологическим признакам следует отнести к сирингомиелии. Эти результаты показали, что на молекулярном уровне гидромиэлия и сирингомиелия вызваны нарушением механизмов регулирующих клеточную адгезию и цитоскелет, которые лежат в основе апикальной констрикции и ответственны за более тяжелые формы НТД. В этой связи гидромиэлия и сирингомиелия вероятно представляют слабовыраженные формы НТД и вызваны относительно небольшими нарушениями молекулярного механизма нейруляции или нарушениями на молекулярном уровне на стадиях поздней нейруляции. Таковые могут возникать по причинам отличным от тех, что затрагивают раннюю нейруляцию или являться отражением относительно слабых или регуляторных мутаций генов ответственных за раннюю нейруляцию (Patterson et al., 2009).

Вероятно, по мере постепенного внедрения ФК терапии и общего улучшения состояния здоровья в развитых странах за счет более сбалансированного питания и доступности микроэлементов и витаминов слабовыраженные формы ДНТ такие как гидромиэлия будут замещать тяжелые формы ДНТ. Результаты подтверждающие это предположение уже получены. Вероятно, слабовыраженные формы ДНТ могут возникать вследствие нарушений на молекулярном уровне на стадиях поздней нейруляции по причинам отличным от тех, что затрагивают раннюю нейруляцию или являться отражением регуляторных мутаций генов ответственных за раннюю нейруляцию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Корж В., Воланд Т. Анализ поведения одиночных молекул *in vivo* или ... почему маленькая рыбка лучше большого таракана. Онтогенез. 2012. Т. 43 (2). С. 83–93.
- Заббарова А.Т., Давлетишина Р.И., Михайлов А.И., и др. Гидромиэлия при демиелинизирующих и димизмунных миелопатиях // Невролог. Вестник, 2010. Т. 42 (1). С. 115–120.
- Селезнева А.В., Менделевич Е.Г., Михайлов И.М., и др. МРТ-особенности задней черепной ямки при семейной сирингомиелии // Невролог. Вестник. 2003. Т. 35 (1–2). С. 44–46.
- Agathon A., Thisse C., Thisse B. The molecular nature of the zebrafish tail organizer // Nature, 2003. V. 424 (6947). P. 448–452.
- Barrett E.J., Liu Z. The endothelial cell: an “early responder” in the development of insulin resistance // Rev. Endocr. Metab. Disord. 2013. V. 14 (1). P. 21–27.
- Barry A., Patten B.M., Stewart B.H. Possible factors in the development of the Arnold-Chiari malformation // J. Neurosurg. 1957. V. 14 (3). P. 285–301.

- Belousov L.V., Lakirev A.V.* Generative rules for the morphogenesis of epithelial tubes // *J. Theor. Biol.* 1991. V. 152 (4). P. 455–468.
- Bohme G.* Formation of the central canal and dorsal glial septum in the spinal cord of the domestic cat // *J. Anat.* 1988. V. 159. P. 37–47.
- Copp A.J., Greene N.D., Murdoch J.N.* The genetic basis of mammalian neurulation // *Nat. Rev. Genet.* 2003. V. 4(10). P. 784–793.
- Colas J.F., Schoenwolf.* Towards a cellular and molecular understanding of neurulation // *Dev. Dyn.* 2001. V. 221 (2). P. 117–145.
- Dettlaff T.A., Ginsburg A.S., Schmalhausen O.I.* Sturgeon Fishes. Developmental Biology and Aquaculture // Springer Verlag, Berlin, 1993. 300 p.
- Dutton C.J., Duncan M., Price H.I.* Hydromyelia in a Reeves' muntjac (*Muntiacus reevesi*) // *J. Zoo. Wildl. Med.* 2002. V. 33 (3). P. 256–262.
- Elsen G.E., Choi L.Y., Millen K.J. et al.* Zic1 and Zic4 regulate zebrafish roof plate specification and hindbrain ventricle morphogenesis // *Dev. Biol.* 2008. V. 314 (2). P. 376–392.
- Forgacs G., Foty R.A., Shafir Y. et al.* Viscoelastic properties of living embryonic tissues: a quantitative study // *Biophys. J.* 1998. V. 74 (5). P. 2227–2234.
- Foty R.A., Pflieger C.M., Forgacs G. et al.* Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior // *Development.* 1996. V. 122 (5). P. 1611–1620.
- Galarza M.* Evidence of the subcommissural organ in humans and its association with hydrocephalus // *Neurosurg. Rev.* 2002. V. 25 (4). P. 205–215.
- Gardner W.J., Goodall R.J.* The surgical treatment of Arnold-Chiari malformation in adults; an explanation of its mechanism and importance of encephalography in diagnosis // *J. Neurosurg.* 1950. V. 7 (3). P. 199–206.
- Geldmacher-Voss B., Reugels A.M., Pauls S. et al.* A 90-degree rotation of the mitotic spindle changes the orientation of mitoses of zebrafish neuroepithelial cells // *Development.* 2003. V. 130 (16). P. 3767–3780.
- Gofflot F., Hall M., Morriss-Kay G.M.* Genetic patterning of the developing mouse tail at the time of posterior neuropore closure // *Dev. Dyn.* 1997. V. 210 (4). P. 431–445.
- Gutzman J.H., Sive H.* Epithelial relaxation mediated by the myosin phosphatase regulator Mypt1 is required for brain ventricle lumen expansion and hindbrain morphogenesis // *Development.* 2010. V. 137 (5). P. 795–804.
- Haigo S.L., Hildebrand J.D., Harland R.M. et al.* Shroom induces apical constriction and is required for hinge-point formation during neural tube closure // *Curr. Biol.* 2003. V. 13 (24). P. 2125–2137.
- Harris M.J., Juriloff D.M.* An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure // *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 2010. V. 88 (8). P. 653–669.
- Hildebrand J.D., Soriano P.* Shroom, a PDZ domain-containing actin-binding protein, is required for neural tube morphogenesis in mice // *Cell.* 1999. V. 99 (5). P. 485–497.
- Hildebrand J.D.* Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network // *J. Cell Sci.* 2005. V. 118 (Pt 22). P. 5191–5203.
- His W.* Unsere Körperform und das physiologische Problem ihrer Entstehung. Briefe an einen befreundeten Naturforscher // Leipzig: F.C.W. Vogel, 1874. 12.
- Huisken J., Stainier D.Y.* Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology // *Development.* 2009. V. 136 (12). P. 1963–1975.
- Jenkins J.R., Sener R.N.* Idiopathic localized hydromyelia: dilatation of the central canal of the spinal cord of probable congenital origin // *J. Comput. Assist. Tomogr.* 1999. V. 23 (3). P. 351–353.
- Johanson C.E., Duncan J.A., 3rd, Klinge P.M. et al.* Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease // *Cerebrospinal Fluid Res.* 2008. V. 5. P. 10.
- Kam R.K., Shi W., Chan S.O.* dhars3 attenuates retinoic acid signaling and is required for early embryonic patterning // *J. Biol. Chem.* 2013 Sep. 17. [Epub ahead of print].
- Karfunkel P.* The mechanisms of neural tube formation // *Int. Rev. Cytol.* 1974. V. 38 (0). P. 245–271.
- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R. et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish // *Dev. Dyn.* 1995. V. 203 (3). P. 253–310.
- Kinoshita N., Sasai N., Misaki K. et al.* Apical accumulation of Rho in the neural plate is important for neural plate cell shape change and neural tube formation // *Mol. Biol. Cell.* 2008. V. 19 (5). P. 2289–2299.
- Koleske A.J., Gifford A.M., Scott M.L. et al.* Essential roles for the Abl and Arg tyrosine kinases in neurulation // *Neuron.* 1998. V. 21(6). P. 1259–1272.
- Kondrychyn I., Teh C., Sin M. et al.* Stretching morphogenesis of the roof plate and formation of the central canal // *PLoS One.* 2013. V. 8 (2). e56219.
- Korzh V., Edlund T., Thor S.* Zebrafish primary neurons initiate expression of the LIM homeodomain protein Isl-1 at the end of gastrulation // *Development.* 1993. V. 118 (2). P. 417–425.
- Korzh V.P.* Genetic control of early neuronal development in vertebrates // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1994. V. 4(1). P. 21–28.
- Kölliker A.* Entwicklungsgeschichte des Menschen und der höheren Tiere // Leipzig. 1861. P. 46–51.
- Lee J.Y., Harland R.M.* Endocytosis is required for efficient apical constriction during *Xenopus* gastrulation // *Curr. Biol.* 2010. V. 20 (3). P. 253–258.
- Lengerke C., Wingert R., Beeretz M. et al.* Interactions between Cdx genes and retinoic acid modulate early cardiogenesis // *Dev. Biol.* 2011. V. 354 (1). P. 134–142.
- Li Y.C., Bai W.Z., Sakai K. et al.* Fluorescence and electron microscopic localization of F-actin in the ependymocytes // *J. Histochem. Cytochem.* 2009. V. 57 (8). P. 741–751.
- Lowery L.A., Sive H.* Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation // *Mech. Dev.* 2004. V. 121 (10). P. 1189–1197.
- Menzies A.S., Aszodi A., Williams S.E. et al.* Mena and vasodilator-stimulated phosphoprotein are required for multiple actin-dependent processes that shape the vertebrate nervous system // *J. Neurosci.* 2004. V. 24 (37). P. 8029–8038.
- Muller F., O'Rahilly R.* The primitive streak, the caudal eminence and related structures in staged human embryos // *Cells Tissues Organs.* 2004. V. 177 (1). P. 2–20.

- Milhorat T.H.* Classification of syringomyelia // *Neurosurg. Focus.* 2000. V. 8 (3). P. E1.
- Morgagni J.B.* The Seats and Causes of Diseases as Investigated by Anatomy // 3 volumes, Translated by Benjamin Alexander. Miller & T Candell Publishers, London, 1769.
- Munson C., Huiskens J., Bit-Avragim N. et al.* Regulation of neurocoel morphogenesis by Pard6 gamma b // *Dev. Biol.* 2008. V. 324 (1). P. 41–54.
- Naidich T.P., Fernbach S.K., McLone D.G. et al.* John Caffey Award. Sonography of the caudal spine and back: congenital anomalies in children // *AJR Am. J. Roentgenol.* 1984. V. 142 (6). P. 1229–1242.
- Newman S.A., Comper W.D.* ‘Generic’ physical mechanisms of morphogenesis and pattern formation // *Development.* 1990. V. 110 (1). P. 1–18.
- Nievelstein R.A., Hartwig N.G., Vermeij-Keers C. et al.* Embryonic development of the mammalian caudal neural tube // *Teratology.* 1993. V. 48 (1). P. 21–31.
- Nishimura T., Takeichi M.* Shroom3-mediated recruitment of Rho kinases to the apical cell junctions regulates epithelial and neuroepithelial planar remodeling // *Development.* 2008. V. 135 (8). P. 1493–1502.
- Nyholm M.K., Abdelilah-Seyfried S., Grinblat Y.* A novel genetic mechanism regulates dorsolateral hinge-point formation during zebrafish cranial neurulation // *J. Cell. Sci.* 2009. V. 122 (Pt 12). P. 2137–2148.
- Obladen M.* Cats, frogs, and snakes: early concepts of neural tube defects // *J. Child. Neurol.* 2011. V. 26 (11). P. 1452–1461.
- O’Rahilly R., Muller F.* The two sites of fusion of the neural folds and the two neuropores in the human embryo // *Teratology.* 2002. V. 65 (4). P. 162–170.
- Padmanabhan N., Jia D., Geary-Joo C. et al.* Mutation in folate metabolism causes epigenetic instability and transgenerational effects on development // *Cell.* 2013. V. 155 (1). P. 81–93.
- Padmanabhan R.* Etiology, pathogenesis and prevention of neural tube defects // *Congenit Anom (Kyoto).* 2006. V. 46 (2). P. 55–67.
- Patterson V.L., Damrau C., Paudyal A. et al.* Mouse hitchhiker mutants have spina bifida, dorso-ventral patterning defects and polydactyly: identification of Tulp3 as a novel negative regulator of the Sonic hedgehog pathway // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18 (10). P. 1719–1739.
- Papan C., Campos-Ortega J.A.* Region-specific cell clones in the developing spinal cord of the zebrafish // *Dev. Genes. Evol.* 1999. V. 209 (3). P. 135–144.
- Petrini J., Damus K., Russell R. et al.* Contribution of birth defects to infant mortality in the United States // *Teratology.* 2002. V. 66. Suppl 1. P. S3–S6.
- Roser F., Ebner F.H., Sixt C. et al.* Defining the line between hydromyelia and syringomyelia. A differentiation is possible based on electrophysiological and magnetic resonance imaging studies // *Acta Neurochir (Wien).* 2010. V. 152 (2). P. 213–219; discussion 219.
- Rusbridge C., Greitz D., Iskandar B.J.* Syringomyelia: current concepts in pathogenesis, diagnosis, and treatment // *J. Vet. Intern. Med.* 2006. V. 20 (3). P. 469–479.
- Sarnat H.B.* Disorders of segmentation of the neural tube: Chiari malformations // *Handb. Clin. Neurol.* 2008. V. 87. P. 89–103.
- Sawyer J.M., Harrell J.R., Shemer G. et al.* Apical constriction: a cell shape change that can drive morphogenesis // *Dev. Biol.* 2010. V. 341 (1). P. 5–19.
- Schoenwolf G.C.* Histological and ultrastructural studies of secondary neurulation in mouse embryos // *Am. J. Anat.* 1984. V. 169 (4). P. 361–376.
- Sengpiel V., Bacelis J., Myhre R. et al.* Folic acid supplementation, dietary folate intake during pregnancy and risk for spontaneous preterm delivery: a prospective observational cohort study // *BMC Pregnancy Childbirth.* 2013. V. 13. P. 160.
- Sevc J., Daxnerova Z., Miklosova M.* Role of radial glia in transformation of the primitive lumen to the central canal in the developing rat spinal cord // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2009. V. 29 (6–7). P. 927–936.
- Snow D.M., Steindler D.A., Silver J.* Molecular and cellular characterization of the glial roof plate of the spinal cord and optic tectum: a possible role for a proteoglycan in the development of an axon barrier // *Dev. Biol.* 1990. V. 138 (2). P. 359–376.
- Sponseller B.A., Sponseller B.T., Alcott C.J. et al.* Syringohydromyelia in horses: 3 cases // *Can. Vet. J.* 2011. V. 52 (2). P. 147–152.
- Strahle U., Blader P.* Early neurogenesis in the zebrafish embryo // *FASEB J.* 1994. V. 8 (10). P. 692–698.
- Solnica-Krezel L.* Gastrulation in zebrafish – all just about adhesion? // *Curr. Opin Genet. Dev.* 2006. V. 16 (4). P. 433–441.
- Urbizu A., Toma C., Poca M.A. et al.* Chiari malformation type I: a case-control association study of 58 developmental genes // *PLoS One.* 2013. V. 8 (2). P. e57241.
- Van Allen M.I., Kalousek D.K., Chernoff G.F. et al.* Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans // *Am. J. Med. Genet.* 1993. V. 47 (5). P. 723–743.
- Von Recklinghausen F.* Untersuchungen über die spina bifida // *Virchows Arch. [Path. Anat].* 1886. V. 105. P. 243–373.
- Wada H., Okamoto H.* Roles of noncanonical Wnt/PCP pathway genes in neuronal migration and neurulation in zebrafish // *Zebrafish.* 2009. V. 6 (1). P. 3–8.
- Wallingford J.B. et al.* The continuing challenge of understanding, preventing, and treating neural tube defects // *Science.* 2013. V. 339(6123). P. 1222002.
- Wallingford J.B., Niswander L.A., Shaw G.M. et al.* Planar cell polarity, ciliogenesis and neural tube defects // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. Spec. № 2. P. R227–234.
- Wallingford J.B., Harland R.M.* Neural tube closure requires Dishevelled-dependent convergent extension of the midline // *Development.* 2002. V. 129 (24). P. 5815–5125.
- Wallingford J.B.* Neural tube closure and neural tube defects: studies in animal models reveal known knowns and known unknowns // *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 2005. V. 135C (1). P. 59–68.
- Wang F., Yamauchi M., Muramatsu M. et al.* RACK1 regulates VEGF/Flt1-mediated cell migration via activation of a PI3K/Akt pathway // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286 (11). P. 9097–9106.
- Zolessi F.R., Arruti C.* Apical accumulation of MARCKS in neural plate cells during neurulation in the chick embryo // *BMC Dev. Biol.* 2001. V. 1. P. 7.

Neurulation Continues: the Parade Commander Is... Apical Constriction**V. Korzh^{a, b}**^a *Institute of Molecular and Cell Biology, Agency for Science, Technology, and Research, Singapore*^b *Faculty of Biological Sciences, National University of Singapore**e-mail: vlad@imcb.a-star.edu.sg*

Received November 27, 2013; in final form, February 13, 2014

Abstract—Neurulation is traditionally defined as the process of closure of the neural tube. New data have shown that the major driving forces of neurulation continue to operate with the closure of the neural tube, at least until the central canal of the neural tube has formed. Owing to this, the paper proposes to distinguish two periods of neurulation. According to these notions, early neurulation corresponds to the period of closure of the neural tube, and late neurulation corresponds to the period of formation of the central canal. Examples of neural tube defects that affect late neurulation are discussed.

Keywords: early and late neurulation, central canal, roof plate, F-actin, Zic6, Rock, *Danio rerio*