

УДК 57.017.642

ИСКУССТВЕННОЕ ИНВЕРТИРОВАНИЕ ЛЕВО-ПРАВОЙ ВИСЦЕРАЛЬНОЙ АСИММЕТРИИ ПОЗВОНОЧНЫХ: КОНЦЕПТУАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕШЕНИЯ

© 2015 г. А. С. Трулев^{1, 2}, Е. Б. Малашичев^{1, 2}, А. С. Ермаков^{1, 2, 3}

¹Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9,

²Институт экспериментальной медицины
197376, Санкт-Петербург, ул. Павлова, дом 12,
Институт цитологии Российской академии наук
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект 4
E-mail: ermakov99@mail.ru

Поступила в редакцию 12.01.2015 г.
Окончательный вариант получен 18.03.2015 г.

Внешне позвоночные животные билатерально-симметричны, но в строении их внутренних органов и систем органов (кровеносной, пищеварительной, дыхательной) наблюдается лево-правая асимметрия. Помимо асимметрии внутренних органов (висцеральной) существует также функциональная (то есть асимметричное функционирование органов на левой и правой сторонах тела) и поведенческая асимметрия. Вопрос о возможной связи между разными видами асимметрии до сих пор остается открытым. Изучение механизмов такой связи, помимо фундаментального интереса, имеет и важное прикладное значение для биомедицины, — в первую очередь для понимания работы мозга в норме и при патологиях и для разработки методов терапии некоторых психических заболеваний, таких, как, например, шизофрения, аутизм, для которых показано нарушение лево-правой функциональной асимметрии головного мозга. Для изучения глубинной связи между разными видами асимметрии необходимо получение адекватных животных моделей, в первую очередь — животных с инвертированными внутренними органами, *situs inversus totalis*. Возможны два основных подхода к получению таких модельных организмов: мутагенез с последующим отбором мутантных линий с мутациями в генах, затрагивающих установление лево-правой висцеральной асимметрии и экспериментальное получение животных с инвертированными внутренними органами. Данный обзор посвящен второму подходу. В статье мы описываем теоретические модели установления лево-правой асимметрии и возможные экспериментальные подходы к получению животных с инвертированными внутренними органами.

Ключевые слова: эмбриология, морфогенез, поведение, лево-правая асимметрия, эмбриональное развитие, нейробиология, позвоночные.

DOI: 10.7868/S0475145015060099

ПЛАН СТРОЕНИЯ ТЕЛА ПОЗВОНОЧНЫХ И ЛЕВО-ПРАВАЯ АСИММЕТРИЯ

В эмбриональном развитии позвоночных животных формируется общий план строения тела. В ходе раннего морфогенеза происходит специализация зародышевых структур в соответствии с тремя ортогональными осями: передне-задней, дорсо-вентральной и медио-латеральной. Внешне позвоночные животные билатерально-симметричны, но внутри они имеют выраженное асимметричное строение, то есть обладают лево-правой асимметрией (Levin, 2004). Лево-правая асимметрия консервативна для позвоночных, хотя ее фенотипические проявления различаются у

представителей разных систематических групп. У человека, как и других млекопитающих, асимметрия внутренних органов проявляется в строении органов грудной клетки (левостороннее положение сердце, неравное число долей легких слева и справа), брюшной полости (правостороннее положение печени и левостороннее — желудка, поджелудочной железы и селезенки; направление закрученности тонкого и толстого кишечника).

Помимо асимметрии внутренних органов, для позвоночных животных характерны другие виды неравенства между левой и правой половинами тела. Широко известны анатомические и функциональные различия между левой и правой ча-

стями головного мозга; известно также, эти различия во многих случаях отражаются и в поведении (Corballis, 2009). Для всех классов позвоночных характерна латерализация функций полушарий головного мозга: правое полушарие связано с более быстрым ответом на раздражители и ориентацией в пространстве, агрессией и половым поведением, а левое, напротив, отвечает за более медленные процессы и более сложный анализ, что связано с механизмами работы полушарий. Правое полушарие мозга осуществляет параллельный процессинг информации, быстрые ответы на стимулы, требующие немедленного реагирования (например, хищника, незнакомую особь своего вида), левое – последовательный процессинг, дискриминацию пищевых объектов от несъедобных при пищеводобывательном поведении, ориентацию по локальным ориентирам (Бианки, 1985; Rogers, 2002; Malashichev, Wassersug, 2004). В виду наличия перехлеста зрительных нервов (полного или частичного) обычно принято говорить о различии в анализе внешних раздражителей системами левый глаз – правое полушарие и правый глаз – левое полушарие. Так, например, жабы рода *Bufo* предпочтительно захватывают добычу, появляющуюся сначала в поле зрения правого глаза (анализ осуществляется левым полушарием), а агрессию по отношению к незнакомой особи своего вида проявляют через шлепки языком в особь своего вида, появившегося в поле зрения левого глаза (анализ осуществляется правым полушарием) (Bisazza et al., 1997).

Латерализация функций имеет большое значение для нормальной работы головного мозга и в эволюции. Так, разделение функций между полушариями способствует большей производительности, когда одновременно выполняются несовместимые задания. Классический пример: цыпленок, наблюдающий за небом левым глазом, в ожидании потенциального хищника, и правым глазом разглядывающим пол клетки, где перемешаны зерна и гравий, похожие друг на друга, но которые необходимо различать (Rogers, 2002). Нарушения в нормальной физиологической межполушарной асимметрии могут приводить не только к снижению эффективности анализа поступающей информации, но у человека могут также коррелировать с психическими заболеваниями. Сбои в латерализации мозговых функций показаны для дислексии (Robichon et al., 2000), депрессии (Pujol et al., 2002), аутизма (Herbert et al., 2005) и шизофрении (Petty, 1999).

Наиболее известный пример функциональной поведенческой асимметрии у человека – праворукость: примерно у 90% людей правая рука доминирует при выполнении некоторых типов движений, таких как письмо, рисование или бросание предмета (Corballis, 2009; Steele, Uomini 2005). Интересно, что частота нарушений поведенческих асимметрий гораздо выше, чем транспозиция внутренних органов: если встречаемость

последней по разным оценкам 1 на 9000 (Torgersen, 1950) либо 1 на 20000 (Levin, Mercola, 1998a), то левши составляют около 10% человеческой популяции (Corballis, 2009; McManus, 2005). Функциональная асимметрия характерна не только для человека, но и для других позвоночных животных практически всех классов от рыб до млекопитающих (см. Rogers, Andrew, 2002; Rogers, Workman, 1993; Malashichev, Rogers, 2002; Malashichev, Deckel, 2006; Vallortigara et al., 2011; Ströckens et al., 2013). Асимметрия также проявляется и вне прямой связи с формированием асимметрии органов, а именно: частоты некоторых аномалий, таких как недоразвитие почки (Schreuder, 2011), заячья губа и волчья пасть (Paulozzi, Lary, 1999) разнятся для левой и правой сторон тела.

НАРУШЕНИЯ В УСТАНОВЛЕНИИ ЛЕВО-ПРАВОЙ АСИММЕТРИИ

Интересно, что надежность механизмов, приводящих к нормальной лево-правой асимметрии, возрастает в ходе эволюции: так, инверсия сердца наблюдается в 5% случаев в развитии рыб, в 1–2% случае у амфибий и птиц, менее чем в 0.1% у млекопитающих и только в 0.01% случаев у человека (Palmer, 2004). Впервые транспозиция внутренних органов была описана Аристотелем (Wood, Blalock, 1940). В Новое Время в Европе феномен *situs inversus viscerium* у человека был переоткрыт в начале XVII века, когда Иероним Фабриций описал случай обратного расположения селезенки и печени (Cleveland, 1926). Несколько позже, в 1643, Марко Северино впервые сообщил о случае декстерокардии, то есть правостороннего положения сердца в грудной клетке.

В 1793 году Мэтью Бейли описал случай полного инвертирования органов грудной клетки и брюшной полости (Klysik, 2008). В настоящее время принято считать, что частота аномального развития положения внутренних органов у людей 1 на 8000–10000, а частота *situs inversus totalis* (то есть полной инверсии органов) 1 на 20000 (Levin, Mercola, 1998a; Palmer, 2004). Скорее всего, оценка встречаемости *situs inversus totalis* у человека занижена, так как аномально устроенные люди не всегда выявляются врачами, и даже порой сами до весьма преклонного возраста не подозревают о том, что их внутренние органы инвертированы (если не проходят, например, рентгенографического обследования). Наблюдаются и другие типы аномалий, такие как изомеризм (потеря асимметрии), гетеротаксия (инверсия отдельных органов). Такие аномалии, в виду несогласованности реверсии одних органов с другими могут приводить к серьезным осложнениям здоровья (Levin, 2005; Erмаков, 2013). В случае левого изомеризма наблюдаются многочисленные пороки сердца (дефекты межпредсердной или межжелудочковой перегородки, стеноз легочного ствола), полиспления, незавершенный поворот кишечника.

Если в норме левое легкое у человека двудольное а правое – трехдольное, то при левом изомеризме оба легких состоят из двух долей (Berg et al., 2005).

Инвертирование лево-правой асимметрии имеет большое значение и для трансплантации органов. Как при гетеротаксии, так и при полной транслокации внутренних органов возникают проблемы с донорскими органами для пересадки, так как нормальным донорским органам трудно занять надлежащее место в теле реципиента вследствие их зеркальной асимметрии (Yu et al., 2014; Polak et al., 2006; Rayhill et al., 2009).

ОСНОВНЫЕ КОНЦЕПТУАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ УСТАНОВЛЕНИЯ ЛЕВО-ПРАВОЙ АСИММЕТРИИ У ПОЗВОНОЧНЫХ

Схематически установление лево-правой асимметрии у позвоночных можно представить в виде трех этапов (Levin, Mercola, 1998a; Levin, 2005). На самом первом этапе установления лево-правой асимметрии происходят процессы, иницирующие экспрессию асимметричных генов. Можно сказать, что на этой стадии происходит потеря билатеральной симметрии и инициация лево-правой асимметрии эмбриона.

Ключевые гены, экспрессирующиеся на второй стадии – гены сигнального белка *nodal* (член семейства TGF- β), его антагонистов *lefty1* и *lefty2* и ДНК-связывающего белка *pitx2* либо (в зависимости от группы позвоночных) их гомологов. *Pitx2* является регуляторным белком и запускает экспрессию комплекса генов, работа которых приводит в конечном итоге к специфическим морфологическим перестройкам левой стороны тела. На последнем этапе за счет процессов деления и миграции клеток, а также изменения их формы происходит собственно морфогенез асимметричных органов.

К настоящему моменту разработаны две основных концептуальных модели процесса инициации асимметрии.

Модель ранней пре-детерминации асимметрии за счет специфического распределения ионных каналов и структурирования ионного транспорта

Эту модель выдвинул в 1990х американский биолог Майкл Левин (Levin, 1997); в ходе разработки модели он основывался в основном на экспериментальных работах на эмбрионах амфибий и птиц. Согласно модели пре-детерминации, установление лево-правой оси тела происходит на самых ранних этапах развития, на стадии зиготы и во время дробления, и к началу гаструляции различия между правой и левыми сторонами зародыша уже оформлены (рис. 1).

Согласно данной модели (Levin, 2005), в цитоскелете зиготы есть структуры, ориентированные относительно будущих дорзо-вентральной и передне-задней оси зародыша, которые опреде-

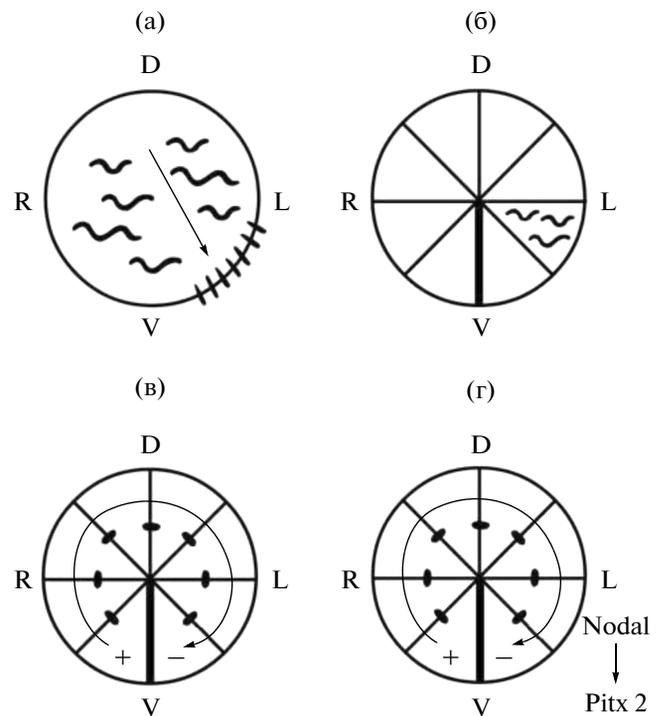


Рис. 1. Модель ранней пре-детерминации асимметрии за счет специфического распределения ионных каналов и структурирования ионного транспорта. Данная модель рассмотрена на примере развития амфибий (Levin, 2004). Сразу же после оплодотворения яйцеклетки и возникновения зиготы происходит пре-детерминация лево-правой оси. Благодаря асимметричным внутриклеточным структурам на стадии зиготы происходит левосторонний транспорт мРНК определенных ионных помп, и они сосредотачиваются в левой части эмбриона (а). На ранних стадиях дробления происходит сосредоточение таких матриц в определенных blastomeres (б). Экспрессируемые с этих матриц белки являются электрогенными белками, то есть способствуют порождению ионных токов. Присутствие электрогенных белков на одной из сторон зародыша приводит к появлению электрического потенциала, то есть образуется электрический градиент и градиент рН вдоль лево-правой оси. Такой потенциал поддерживается благодаря тягу плотных контактов в вентральной части эмбриона (в). Определенные сигнальные молекулы движутся по этому градиенту, концентрируются в левой части эмбриона и запускают экспрессию генов сигнального каскада “левосторонности” (г).

ляют направление цитоплазматического транспорта (рис. 1а) и приводят к асимметричному распределению информационных РНК, кодирующих специфические ионные помпы (рис. 1б). Такие помпы являются электрогенными белками, то есть способствуют порождению ионных токов. Присутствие электрогенных белков на одной из сторон зародыша приводит к появлению электрического потенциала, то есть образуется электрический градиент и градиент рН вдоль лево-правой оси (рис. 1в). Например, более сильный ток H^+ внутрь клеток на одной из сторон эмбри-

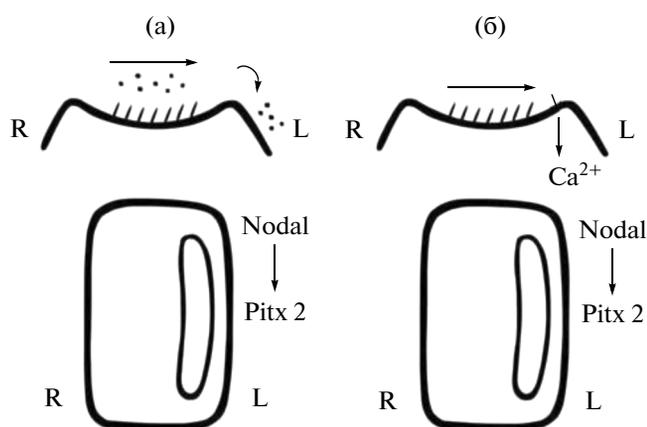


Рис. 2. Модель потери билатеральной симметрии в результате биения ресничек и возникновения микропотоков жидкости. Данная модель рассмотрена на примере развития амфибий. Биение ресничек в области гензенновского узелка порождает левосторонний ток жидкости (а, вверху и б, вверху). Согласно гипотезе переноса морфогена (Nonaka et al., 1998) левосторонний ток жидкости переносит молекулы морфогена в левую часть гензенновского узелка (а, вверху), и морфоген индуцирует экспрессию генов сигнального каскада “левосторонности” в мезодерме левой боковой пластинки зародыша (а, внизу). Согласно альтернативной биомеханической гипотезе (McGrath et al., 2003), механочувствительные реснички в левой стороне гензенновского узелка реагируют на ток жидкости, при этом открываются кальциевые каналы и происходит резкое повышение концентрации ионов Ca^{2+} в клетках левой части зародыша (б, вверху). В результате активирования не известных пока Ca^{2+} -опосредованных сигнальных путей индуцируется экспрессия генов каскада “левосторонности” в мезодерме левой боковой пластинки (б, внизу).

она приведет к потере положительного заряда внеклеточного потенциала на данной стороне и приведет к понижению внутриклеточного рН. Вдоль средней линии на вентральной стороне зародыша клетки смыкаются посредством плотных контактов. Образуется своего рода изолятор, который поддерживает градиентное распределение мембранного потенциала и рН вдоль лево-правой оси зародыша.

Различные значения рН и электрического потенциала вдоль лево-правой оси приводят к экспрессии разных генов в левой и правой частях зародыша (рис. 1г). Возможно, при этом возникает ток небольших сигнальных молекул вдоль образовавшегося градиента, и экспрессия определенных генов запускается в результате воздействия данных молекул на клетки одной или противоположной стороны тела (Levin, Mercola, 1998a; Levin, Mercola, 1999).

Модель потери билатеральной симметрии в результате биения ресничек и возникновения микропотоков жидкости

В основу данной модели легли работы, проведенные на эмбрионах млекопитающих в конце 1990-х—начале 2000-х гг японскими исследовате-

лями под руководством Хироши Хамады (Nonaka et al., 2002) и американскими — под руководством Мартыны Брюкнер (McGrath et al., 2003). Было показано, что биение ресничек в области гензенновского узелка приводит к образованию левостороннего тока жидкости, который, в свою очередь, запускает специфическую экспрессию генов в мезодерме левой боковой пластинки эмбриона (рис. 2). Ряд наследственных синдромов, при которых нарушение нормальной работы ресничек коррелирует с инвертированием или дисплазией внутренних органов (Afzelius, 1976; Davis, Katsanis, 2012) свидетельствует о том, что данная модель справедлива не только для мыши, но и для человека.

До середины 2000-х гг. большинство исследователей считало, что данная модель применима только к развитию млекопитающих, однако, за последнее десятилетие сходный механизм инициации асимметрии был открыт и у низших позвоночных. Согласно данной модели, нарушение симметрии происходит на стадии нейрулы, когда под действием биения ресничек устанавливается левонаправленный ток жидкости, приводящий к асимметричной экспрессии генов: через несколько часов после появления тока жидкости запускается каскад *Nodal* на левой стороне эмбриона.

Существуют две основных гипотезы о том, как ток жидкости приводит к левосторонней экспрессии гена *nodal*.

Согласно гипотезе переноса морфогена (рис. 2а), благодаря создаваемому биением ресничек левостороннему току жидкости, в левой части гензенновского узелка увеличивается концентрация некой важной сигнальной молекулы, которая и вызывает экспрессию генов “левосторонности” в левой части тела эмбриона (Nonaka et al., 1998).

Гипотеза двух типов ресничек или *биомеханическая гипотеза* (рис. 2б) гласит, что реснички в области гензенновского узелка работают не только как генераторы механического сигнала (порождая левосторонний ток жидкости), но и как и его рецепторы, запуская затем процесс повышения концентрации ионов кальция в клетках левой стороны тела (McGrath et al., 2003). Повышение концентрации ионов внутриклеточного кальция активирует неизвестные пока процессы, которые приводят в конечном итоге к активации экспрессии генов “левосторонности”. Часть ресничек в области гензенновского узелка способна к биению, а другая часть неподвижна. Авторы данной гипотезы считают, что эти неподвижные реснички работают как механосенсоры. Для нормального развития лево-правой асимметрии важна не только способность ресничек производить левосторонний ток жидкости в области гензенновского узелка, но и их механочувствительная способность.

К настоящему времени, участие ресничек в формировании лево-правой асимметрии описано не только у млекопитающих (Nonaka et al., 1998;

Okada et al., 2005), но и у рыб (Essner et al., 2005) и амфибий (Schweickert et al., 2007). Сходный механизм описан также для беспозвоночных хордовых – асцидий (Nishide et al., 2012).

ЕСТЬ ЛИ СВЯЗЬ МЕЖДУ РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ АСИММЕТРИИ У ПОЗВОНОЧНЫХ?

До сих пор не до конца ясен вопрос о связи между различными типами асимметрии – внутренних органов (висцеральной) и поведения (функциональной). У позвоночных пока не найдена прямая корреляция между асимметрией внутренних органов и некоторыми типами функциональной поведенческой асимметрией (Malashichev, Wassersug, 2004; Malashichev, 2006). Адекватных моделей для поиска данной взаимосвязи разработано крайне мало.

Известно, что среди людей с *situs inversus totalis* встречаемость левшей не выше, чем среди обычных людей (McManus, 2005). Обследования людей с транслоцированными внутренними органами не выявляют инверсии локализации речевых функций из левого в правое полушарие (Kennedy et al., 1999).

Однако было показано, что асимметричная экспрессия белков Nodal-каскада, помимо участия в регуляции положения внутренних органов, вовлечена также в формирование асимметрии головного мозга: по крайней мере, ядер уздечки и парапинеальных ядер у рыб *Danio rerio* (Concha et al., 2000; Roussigne et al., 2009). Несмотря на это, а также факт того, что *nodal*, *lefty* и *pitx2* также асимметрично экспрессируются в дорсальной части промежуточного мозга акул, асимметричная экспрессия компонентов Nodal-каскада до сих пор не была описана при формировании асимметрии строения головного мозга у млекопитающих или птиц (Roussigne et al., 2012).

В 2005 году вышла статья, в которой описывается мутантная линия рыб *Danio rerio*, названная *fsi* (*frequent-situs-inversus*) (Barth et al., 2005). От 5 до 25% мальков данной линии (в зависимости от кладки) демонстрируют *situs inversus totalis*. Кроме нарушения висцеральной асимметрии, асимметричное расположение таких структур головного мозга, как парапинеальные ядра и ядра уздечки, у представителей данной мутантной линии также нарушено. Изменена и поведенческая асимметрия. В тестах с зеркальным отражением мальки *Danio rerio* дикого типа сначала поворачиваются к своему отражению левым глазом, затем, примерно между четвертой и пятой минутами, поворачиваются правым. Такое же поведение демонстрировали и мальки *Danio rerio* линии *fsi* с неинвертированными внутренними органами; мальки *fsi* с *situs inversus* напротив, сначала поворачиваются к зеркалу правым глазом, после чего поворачивались левым.

Схожая ситуация была в тесте с выбором бусин (*two-choice bead test*): *Danio rerio* дикого типа и *fsi Danio rerio* с *situs solitus* выбирают правую бусину из двух предложенных, тогда как *fsi Danio rerio* с транслоцированными внутренними органами предпочитали левую. Однако в тестах с многокамерным аквариумом (выбор камеры справа/слева по ходу движения), латерализованное поведение *fsi Danio rerio* с *situs inversus* не отличалось от латерализованного поведения как неинвертированных *fsi Danio rerio*, так и *Danio rerio* дикого типа.

Таким образом, у представителей данной мутантной линии наблюдается согласованное изменение висцеральной, нейрональной и некоторых видов поведенческой симметрии. Однако, такая взаимосвязь характерна не для всех видов поведенческой асимметрии: в некоторых поведенческих тестах мутантные и нормальные рыбы демонстрировали сходные асимметрические реакции, например, реакцию С-старта (резкого изгиба тела в одну сторону при испуге). Примечательно, что природа линии *fsi* до сих пор неизвестна. Есть вероятность того, что кроме генетической, велика роль и средовой компоненты в данном синдроме.

ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К ИСКУССТВЕННОМУ ИНВЕРТИРОВАНИЮ ЛЕВО-ПРАВОЙ АСИММЕТРИИ ПОЗВОНОЧНЫХ

Возможно, связь между висцеральной, поведенческой и функциональной асимметрией – лишь частный случай плохо понимаемого пока глубинного механизма регуляции биологического морфогенеза и работы нервной системы (Buznikov, 1984; Levin et al., 2006). Углубление нашего понимания взаимоотношений разных видов асимметрии прольет свет на фундаментальные аспекты биологии развития и нейробиологии.

Вопрос о возможных общих механизмах регуляции висцеральной и нейральных (как структурных, так и функциональных) асимметрий имеет важное прикладное значение для медицины. Существует ряд врожденных синдромов, связанных с дисфункцией ресничек, таких как Синдром Барде-Бидля и Синдром Жубера, при которых не только нарушены лево-правая асимметрия и укладка внутренних органов, но также наблюдаются расстройства умственной деятельности (Davis, Katsanis, 2012; Norris, Grimes, 2012). Кроме того, нарушение латерализации мозга наблюдается и при ряде широко распространенных психических заболеваний, таких как шизофрения (Petty, 1999), дислексия (Robichon et al., 2000), депрессия (Pujol et al., 2002), аутизм (Herbert et al., 2005).

Для исследования взаимосвязи висцеральной и поведенческой асимметрий в условиях контролируемого лабораторного эксперимента необходима разработка адекватных моделей создания животных с *situs inversus totalis*. К настоящему вре-

мени накоплен большой материал по изучению последствий искусственного инвертирования лево-правой асимметрии эмбрионов позвоночных с помощью разных экспериментальных воздействий.

Оценка результатов экспериментального воздействия на лево-правую ось тела позвоночных обычно производится по положению сердца и других внутренних органов. Иногда авторы ограничиваются только оценкой положения сердца (Kawakami et al., 2005; Levin et al., 2002). Во многих работах оценку изменения асимметрии внутренних органов проводили по положению сердца, желчного пузыря и желудка, а также направлению закрученности кишечника (по часовой стрелке или против часовой стрелки). Такой подход более информативен, чем оценка латеральности исключительно по положению сердца, однако, на наш взгляд, он тоже не совсем корректен. Представим гипотетическую ситуацию раскоординированного случайного распределения органов, тогда 1/8 случаев будет отмечаться как *situs inversus totalis*, хотя инвертированными будут лишь три отдельных органа, а не все висцеральные органы в совокупности.

В некоторых работах изменение асимметрии оценивалось только по экспрессии генов, кодирующих белки Nodal-каскада (Bajoghli et al., 2007; Kramer-Zucker et al., 2005; Adams et al., 2006). На наш взгляд, этот подход тоже не полностью корректен. Хотя связь между левосторонней экспрессией *nodal* и левосторонним комплексом внутренних органов выявляется в подавляющем числе случаев, она не абсолютная (Vandreberg, 2012). В работах, авторы которых нарушали работу биения ресничек на стадии нейрулы, наблюдались большая смертность, большее число аномалий развития почек, нервной трубки или хорды, по сравнению с экспериментами, в которых нарушался паттерн ионных токов на более ранних стадиях развития (Vandreberg, 2012)

Первые исследования, в которых были получены животные с инверсированными органами правой и левой сторон проведены в лаборатории Ганса Шпемана в начале XX века. В 1904 г им было показано, что у одного из близнецовых тритонов, полученных методом частичного наложения лигатуры между двумя бластомерами дробящегося яйца, развивается *situs inversus*, причем всегда — у правого близнеца (Blum et al., 2009). Примечательно, что похожий эффект наблюдается и у сиамских близнецов у человека (Spencer, 1992). Позднее ученики Ханса Шпемана Курт Пресслер и Рудольф Мейер с помощью методов микрохирургии продемонстрировали, что поворот среднедорсальной части нейрулы на 180° приводит к появлению головастика травяной лягушки, *Rana temporaria*, и жерлянки, *Bombina variegata*, с инвертированными внутренними органами (Pressler, 1911).

К настоящему времени существует более десятка работ по искусственному инвертированию лево-правой оси зародышей разных групп позвоночных, их разработчики могут быть приверженцами как концептуальной модели ранней преддетерминации асимметрии, так и модели потери асимметрии в результате биения ресничек.

Экспериментальные процедуры, при помощи которых можно повлиять на установление лево-правой асимметрии зародыша, можно разделить на несколько категорий:

Инкубация эмбрионов в присутствии фармакологического агента, оказывающего воздействие на развитие зародыша.

Специфическое подавление или стимулирование экспрессии того или иного гена с помощью методов генной инженерии.

Инъекция биологически активных веществ в эмбрион.

Микрохирургические операции на зародыше.

Биомеханические воздействия на развивающихся животных.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ, ПРИВОДЯЩИЕ К НАРУШЕНИЯМ ЛЕВО-ПРАВОЙ АСИММЕТРИИ ЭМБРИОНА

Эксперименты по инкубации эмбрионов в присутствии фармакологического агента легко осуществимы на зародышах *Anamnia*, так как они хорошо переносят высвобождение из оболочек на ранних стадиях и выживают в культивационных средах. Возможна также фармакологическая обработка зародышей птиц путем введения веществ внутрь яйца либо в системе инкубации зародыша в среде вне яйцевых оболочек (Garic-Stankovic et al., 2008; Levin, Mercola, 1999) в растворе, содержащем интересующие авторов соединения. Результаты экспериментов по фармакологическому воздействию на зародышей суммированы в табл. 1.

Как правило, разработчики экспериментов данной группы базируются на концептуальной модели ранней преддетерминации асимметрии, и инкубация с фармакологическими агентами проводится на ранних стадиях развития животного: от зиготы до нейрулы. Примером использования данного подхода может быть исследование Банни и соавторов 2003 года, в котором было показано, что инкубирование эмбрионов *Xenopus laevis* в течение временного интервала от оплодотворения до стадии 14 (здесь и далее по Ньюкопу-Фабери Nieuwkoop, Faber, 1967) в присутствии фузикококцина приводит к тому, что на стадии 43 (ранний головастик) наблюдается раскоординация положения внутренних органов (сердца, желчного пузыря и направления закручивания петли кишечника) в 25% случаев (Bunney et al., 2003).

Такой эффект вызван тем, что фузикококцин, продукт жизнедеятельности гриба *Fusicoccum amygdali*, связываясь с сигнальными белками се-

Таблица 1. Основные результаты экспериментов по инкубации эмбрионов в присутствии фармакологического агента, оказывающего влияние на формирование лево-правой асимметрии

Объект	Экспериментальные манипуляции	Оценка результатов	Результат	Ссылка
<i>Xenopus laevis</i>	Инкубация эмбрионов от оплодотворения до стадии 14 в растворе, содержащем фюзикокцин	Положение сердца, желчного пузыря, направление закручивания кишечника на стадии 43	Раскоординация положения внутренних органов у 25% эмбрионов	Bunney et al., 2003
<i>Xenopus laevis</i>	Инкубация эмбрионов в среде, содержащей блокаторы H^+/K^+ -АТФазы: омепразол, ланзопразол, SCH28080	Положение сердца, желудка и желчного пузыря на стадии 45, гетеротаксия диагностировалась, если хотя бы один орган занимал обратную позицию.	Гетеротаксия у эмбрионов: у 30% (омепразол), 51% (ланзопразол), 40% (SCH28080)	Levin et al., 2002
<i>Gallus gallus</i>	Инъекция в белок растворов блокаторов H^+/K^+ -АТФазы: омепразол, ланзопразол, SCH28080 или инкубация эмбрионов в среде, содержащей омепразол, ланзопразол, SCH28080	Положение сердца на стадии HH 15, экспрессия генов на различных стадиях развития	Неправильное положение сердца у 14% эмбрионов. Отсутствующая, билатеральная экспрессия или экспрессия без выраженного паттерна) <i>pitx-2</i> (27%), <i>nodal</i> (78%), <i>shh</i> (52%).	Levin et al., 2002
<i>Danio rerio</i>	Инкубация на стадии 1–2 клеток в растворе с омепразолом и SCH28080	Направление сердечной петли на стадии 2 дня после оплодотворения	Обратное направление сердечной петли у 31% эмбрионов (омепразол) и у 27% (SCH28080)	Kawakami et al., 2005
<i>Xenopus laevis</i>	Инкубация эмбрионов в среде, содержащей ингибиторы H^+V -АТФазы от 45 минут после оплодотворения, до стадии 6–7	Положение сердца, желчного пузыря и желудка на стадии 45	Гетеротаксия у 15–45% эмбрионов	Adams et al., 2006
<i>Danio rerio</i>	Инкубация эмбрионов в растворе лобатомида A16 или конканамицина от оплодотворения до стадии 2 клеток	Положение желчного пузыря и поджелудочной железы на 5–6 день после оплодотворения	Гетеротаксия у 15% зародышей (лобатомида A16) или 30% (конканамицин)	Adams et al., 2006
<i>Gallus gallus</i>	Инъекция раствора конканамицина внутрь яйца	Левосторонняя или правосторонняя экспрессия генов <i>nodal</i> и <i>shh</i>	Нарушение левосторонней экспрессии <i>nodal</i> (в 24% случаев) и <i>shh</i> (67%)	Adams et al., 2006
<i>Xenopus laevis</i>	Инкубация эмбрионов в растворе блокаторов серотониновых рецепторов от момента оплодотворения до стадии 16	Положение сердца, желчного пузыря и желудка на стадии 45	Гетеротаксия у 20–44% зародышей	Fukumoto et al., 2005a
<i>Xenopus laevis</i>	Инкубация эмбрионов в растворе ингибиторов моноамин оксидазы от момента оплодотворения до стадии 16	Положение сердца, желчного пузыря и желудка на стадии 45	Гетеротаксия у 22–32% эмбрионов	Fukumoto et al., 2005a
<i>Xenopus laevis</i>	Инкубация эмбрионов от стадии 2 клеток до стадии 22 в растворе, содержащем препараты, изменяющие проводимость щелевых контактов	Положение сердца, желчного пузыря и направления закручивания кишечника	Гетеротаксия у 35–48% эмбрионов	Levin, Mercola, 1998b
<i>Gallus gallus</i>	Инкубация эмбрионов в растворе линдана до 5 или 8 стадии	Экспрессия <i>nodal</i> и <i>shh</i> на стадии 5–8	Билатеральная экспрессия <i>nodal</i> (55%) и <i>shh</i> (45%)	Levin, Mercola, 1999

Таблица 1. Окончание

Объект	Экспериментальные манипуляции	Оценка результатов	Результат	Ссылка
<i>Xenopus laevis</i>	Инкубация эмбрионов с блокаторами белков-переносчиков серотонина на стадиях 0–16	Положение желудка, атриума сердца, желчного пузыря на стадии 45	Гетеротаксия в 17–29% случаев	Fukumoto et al., 2005b
<i>Xenopus laevis</i>	Инкубация эмбрионов в растворе гептанола на стадиях 6–20	Направление сердечной петли и закручивания кишечника и расположение желчного пузыря на стадии 45, а также экспрессия <i>pitx2c</i> на стадиях 28–32	Отсутствие экспрессии <i>pitx2c</i> в левой боковой пластинке, 48% эмбрионов демонстрировали гетеротаксию	Beyer, T. et al., 2012
<i>Xenopus laevis</i>	Инкубация эмбрионов на стадиях 18–21 в среде, содержащей ионофор А23187, октопамин или норадреналин	Направление сердечной петли и закручивания кишечника на стадиях 41–46	<i>Situs inversus</i> в 50% (А23187), 35% (октопамин), 28 (норадреналин)	Toyoizumi et al., 1997
<i>Xenopus laevis</i>	Инкубация эмбрионов в растворе бутирата натрия на стадиях 1–7	Положение сердца, желудка, желчного пузыря на стадии 45	Гетеротаксия у 22.5% эмбрионов	Carneiro et al., 2011

мейства 14-3-3, активирует работу H^+ -АТФазы, располагающейся на плазматической мембране (Korthout, De Boer, 1994). Нарушения в работе протонной помпы приводят к деполяризации мембраны, что нарушает электрический ток, обеспечивающий перенос сигнальных молекул в требуемое для правильного развития место.

Схожий эффект наблюдался при инкубации эмбрионов *Xenopus laevis* в среде, содержащей блокаторы H^+/K^+ -АТФазы. В неоплодотворенных яйцах *Xenopus laevis* распределение α -субъединицы H^+/K^+ -АТФазы радиально симметрично. После оплодотворения большая часть H^+/K^+ -АТФаз сконцентрирована в вегетативной части яйца и небольшой участок располагается напротив места вхождения сперматозоида. После первого деления дробления α и β -субъединицы распределяются асимметрично: они аккумулируются в одном из blastomeres. После второго деления, на стадии 4 клеток становится видно, что H^+/K^+ -АТФаза локализована на правой стороне эмбриона (Aw et al., 2008). Асимметричное распределение H^+/K^+ -АТФазы приводит к формированию асимметрии в токе протонов и разнице в мембранном потенциале вентральных blastomeres. Блокаторы H^+/K^+ -АТФазы, выравнивая мембранные потенциалы между blastomeres, что нарушает корректное установление лево-правой оси, таким образом, положение внутренних органов рандомизируется (Mogokuma et al., 2008).

Результатом блокирования H^+/K^+ -АТФазы при помощи омепразола или SCH28080 у *Danio rerio* на стадии 1–2 клетки была инверсия сердечной петли у 2-дневных мальков примерно в 30% случаев (Kawakami et al., 2005). При обработке за-

родышей SCH28080 на стадии 32–1000 клеток также наблюдалось повышенное число эмбрионов с неправильно расположенным сердцем.

При воздействии данных ингибиторов на развивающихся *Xenopus laevis* были получены схожие результаты. Инкубация эмбрионов в растворах омепразола, SCH 28080 и лансопразола от стадий 0 (сразу же после оплодотворения) и до стадии 16 приводила к гетеротаксии у 30, 40 и 51% головастиков соответственно (Levin et al., 2002). При инъекции указанных веществ в белок куриного яйца у 14% зародышей наблюдалось неправильное положение сердца.

Инкубация эмбрионов *Xenopus laevis* с блокаторами другой протонной помпы, H^+V -АТФазы, также приводила к раскоординации положения внутренних органов на стадии развития 45. H^+V -АТФаза или протонная вакуольная помпа представляет собой комплекс из большого числа белковых субъединиц, чья основная функция – закачка протонов в вакуоль для понижения в ней рН. Кроме того, в некоторых клетках H^+V -АТФаза присутствует также в плазматической мембране клетки, и ее активность приводит к закислению внеклеточного пространства (Nishi et al., 2002). Помимо этого, H^+V -АТФаза вовлечена в сигнальные механизмы пролиферации, дифференцировки и миграции клеток. В работе Адамса и соавторов 2006 года было показано, что распределение А-субъединицы H^+V -АТФазы асимметрично уже на стадии двух клеток, что достигается за счет непосредственного связывания H^+V -АТФазы с активным цитоскелетом (Adams et al., 2006). В той же работе показано, что, если эмбрионы *Xenopus laevis* через 45 минут после оплодотворения поместить в среду, содержащую ингибиторы H^+V -АТ-

Фазы и инкубировать в ней до стадии 6–7, то такое воздействие ведет к раскоординации положения внутренних органов в 15–45% случаев, в зависимости от использования конкретного ингибитора (Adams et al., 2006). Вдобавок, инкубация эмбрионов *Xenopus laevis* в среде с конканамицином (один из ингибиторов Н+V-АТФазы, вызывает гетеротаксию в 35% случаев) приводит тому, что только у 46% эмбрионов наблюдался нормальный (левосторонний) паттерн экспрессии *xnr-1* (гомолог *nodal* у шпорцевой лягушки); у 8% эмбрионов этот ген экспрессировался справа, у 19% – с двух сторон, у 27% не экспрессировался вообще (Adams et al., 2006).

Аналогичные эксперименты были проведены на *Danio rerio*. Инкубация эмбрионов рыб в среде с конканамицином или лоботомидом А16 привела к уменьшению числа и/или размера ресничек в купферовском узелке, а также право- (в 58% случаев) или двусторонней (55% случаев) экспрессии гена *southpaw* – гомолога *nodal* у рыб, в норме экспрессирующегося левосторонне (Long et al., 2003), и гетеротаксии внутренних органов у 30% мальков независимо от конкретного ингибитора, которая определялась по положению поджелудочной железы и желчного пузыря (Adams et al., 2006).

В опытах на куриных эмбрионах, конканамицин инъецировали внутрь яйца курицы *Gallus gallus*. В результате такой инъекции происходило ингибирование работы Н+V-АТФазы (вакуолярной Н + АТФазы), что приводило к нарушению левосторонней экспрессии *nodal* (24%) и *sonic hedgehog*, *shh* (67% случаев) (Adams et al., 2006), тогда как в норме *shh* экспрессируется с левой стороны и индуцирует левостороннюю экспрессию *nodal*.

Fukumoto и соавторы инкубировали развивающихся *Xenopus laevis* в присутствии блокаторов серотониновых рецепторов, от оплодотворения до стадии 16. Результаты экспериментов показали, что ингибирование рецепторов к серотонину 3 и 4 типов приводит к рандомизации положения сердца, желчного пузыря и желудка в 20–44% случаев, в зависимости от конкретного блокатора (Fukumoto et al., 2005a). Ингибирование рецепторов серотонина 1, 2 и 5–7 типов к такому эффекту не приводило: число зародышей с гетеротаксией после обработки ингибиторами рецепторов этих типов было сравнимо с контролем. Наибольший процент гетеротаксии (44%) наблюдался при использовании GR113808, блокатора серотонинового рецептора 4 типа. Примечательно, что 80% животных, подвергшихся воздействию блокаторов серотониновых рецепторов 3 типа, демонстрировали *situs inversus*, а не гетеротаксию (Fukumoto et al., 2005a). Стоит отметить, что блокаторы серотониновых рецепторов действуют только до 7 стадии развития *Xenopus laevis*.

Также на развитие лево-правой оси тела влияли вещества-блокаторы моноамин оксидазы,

фермента, отвечающего за распад серотонина. Так, длительная инкубация в растворе с различными ингибиторами моноамин оксидазы, таких, например, как ипрониазид, ниаламид, приводила к тому, что у 22–32% зародышей *Xenopus laevis* наблюдалось раскоординированное положение различных внутренних органов (Fukumoto et al., 2005a). Кроме того, было показано, что инкубация эмбрионов как с блокаторами серотониновых рецепторов, так и с ингибиторами моноамин оксидазы приводит к нарушению левосторонней экспрессии *xnr1* и *xlefty* (гомологи генов *nodal* и *lefty* у шпорцевой лягушки). Эксперименты, проведенные на куриных эмбрионах, показали аналогичные результаты: введение ингибиторов серотониновых рецепторов 3 или 4 типов, или MAO в яйцо приводило к нарушению левосторонней экспрессии *shh* (Fukumoto et al., 2005a).

В работе Левина и Мерколы 1998 года эмбрионы *Xenopus laevis* инкубировали от стадии 2 клеток до стадии 22 по Ньюкопу-Фаберу в растворе, содержащем препараты, изменяющие проводимость щелевых контактов, такие как анандамид, гептанол, олеиновая или глицерризиновая кислоты. Результаты показали, что нарушение работы щелевых контактов приводит к гетеротаксии внутренних органов в 35–48% случаев (оценивалось положение сердца, желчного пузыря и направления закручивания кишечника), в зависимости от конкретного препарата. Причем период наибольшей чувствительности к препаратам приходится между 5 и 12 стадиями развития (Levin, Mercola, 1998b).

В работе тех же авторов 1999 года было показано, что культивирование куриных эмбрионов, в среде, содержащей линдан, – вещество, которое вызывает замыкание щелевых контактов, приводит к билатеральной экспрессии *shh* (45%) и *nodal* (55%) на стадии 5 или 8 соответственно. Кроме того, было показано, что инкубация зародышей в среде, содержащей антитела против коннексина Cx43, приводит к симметричной экспрессии *shh* и *nodal* в 50 и 65% случаев соответственно. Добавление в культуральную среду антисмысловых олигонуклеотидов к Cx43 также вызывало нарушение нормальной экспрессии *nodal* в 22% (Levin, Mercola, 1999).

Помимо транспорта по щелевым контактам, в перемещение серотонина вовлечены также специфические белки-переносчики серотонина: транспортер серотонина (serotonin transporter, SERT) и везикулярный транспортер моноаминов (vesicular monoamine transporter, VMAT). Инкубация эмбрионов *Xenopus laevis* от оплодотворения яйцеклеток до стадии 16 эмбрионального развития с различными блокаторами белков-переносчиков приводит к гетеротаксии в 17–29% случаев (Fukumoto et al., 2005b). Также как и в случае с блокаторами щелевых контактов, максимальный эффект на развитие *Xenopus laevis* блокаторы серо-

тониновых переносчиков оказывали на стадиях от дробления до стадии 7.

В работе Бейера и соавторов было показано, что инкубация эмбрионов в 0.01% растворе гептанола (спирт, блокирующий работу щелевых контактов) на 6–20 стадии развития по Ньюкупу-Фаберу впоследствии приводит к отсутствию экспрессии *pitx2* в левой боковой пластинке в более чем 60% случаев, а также к гетеротаксии на стадии 45. Кроме того, инъекция гептанола в гастроцель на стадии 15–18 приводила к отсутствию экспрессии *pitx2* в левой боковой пластинке в 60% и нарушениям латерализации внутренних органов примерно в 50% случаев. Таким образом, щелевые контакты участвуют в формировании лево-правой оси на более поздних стадиях развития *Xenopus laevis*, когда реснитчатые клетки крышки blastoцеля уже сформировались и установился левосторонний ток жидкости (Beyer et al., 2012). Тойодзуми и коллеги в 1997 году инкубировали эмбрионы *Xenopus laevis* на стадиях 18–21 в среде, содержащей Ca^{2+} ионофор A23187 в концентрации 50 нМ. Результатом такого воздействия стало формирование *situs inversus* у 50% зародышей на стадии 41–46. При добавлении ионофора к зародышам после достижения ими стадии хвостовой почки число животных с *situs inversus* падало практически до контрольных значений. Инкубация эмбрионов *Xenopus laevis* в среде, содержащей ионофор A23187 на стадиях 11–15 приводила к нарушениям в формировании передне-задней оси тела, при этом количество животных с инвертированными внутренними органами было меньше, чем при инкубации на более поздней стадии (Toyozumi et al., 1997). Также авторами было показано, что при инкубации эмбрионов *Xenopus laevis* в растворе норадrenalина (0.5 мМ) и октопамина (0.05–0.5 мМ) частота встречаемости эмбрионов с *situs inversus* достигала в опытах 28% и 35% соответственно. Стоит отметить, что авторы диагностировали аномалию как *situs inversus* даже в том случае, если только сердце или только кишечник были инвертированы.

СПЕЦИФИЧЕСКОЕ ПОДАВЛЕНИЕ ИЛИ СТИМУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ТОГО ИЛИ ИНОГО ГЕНА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Подавление работы определенных генов или, наоборот, эктопическая экспрессия того или иного гена, вовлеченного в формирование лево-правой оси тела, могут приводить к нарушению латерализации внутренних органов (табл. 2), и данный подход также можно использовать для создания животных с *situs inversus*.

Инъекция на стадии 4-х клеток в вентральный левый бластомер мРНК мутантного перманентно активного *Mad3* (Max-interacting transcriptional repressor 3) приводила к гетеротаксии на стадии 45 у более чем 20% эмбрионов *Xenopus laevis*, подверг-

шимся такому воздействию. Инъекция конструкции, экспрессирующей мутантный перманентно инактивированный ген *Mad3* в вентральный правый бластомер также приводила к повышенному числу зародышей с рандомизированным положением внутренних органов. У эмбрионов, подвергшихся инъекции *Mad3* в активированном состоянии, экспрессия *xnr1* отсутствовала на стадии 21, а зародыши, инъекцированные неактивной формой *Mad3*, демонстрировали уровень билатеральной экспрессии *xnr1* в большем количестве, чем контрольные животные (Carneiro et al., 2011)

Инъекция как мРНК деацетилазы гистонов (Histone deacetylase, HDAC) дикого типа в левую часть зародыша *Xenopus laevis*, так и доминантно-негативной мРНК (Smillie et al., 2004) HDAC в правую приводила к 20% гетеротаксии внутренних органов. Также была нарушена левосторонняя экспрессия *xnr1*. При этом симметричные манипуляции (инъекция мРНК нерабочей формы деацетилазы гистонов в левую часть и рабочей в правую) не приводили к значимым изменениям в лево-правой асимметрии. Инкубация эмбрионов в растворе, содержащем бутират натрия, блокатор фермента деацетилазы гистонов, во время 1–7 стадий развития также приводила к гетеротаксии (в 22% случаев). Воздействие бутиратом натрия на более поздних стадиях не вызывало увеличения числа зародышей с раскоординированным положением внутренних органов (Carneiro et al., 2011).

Эффект *Mad3* и HDAC на развитие лево-правосторонней асимметрии объясняется тем, что белок *Mad3* вовлечен в репрессию транскрипции, причем его ингибирующая активность проявляется в комплексе с деацетилазой гистонов (HDAC) и угнетается ее блокаторами. Оба этих белка экспрессируются симметрично относительно сагитальной плоскости, но комплекс *Mad3*-HDAC способен участвовать в становлении лево-правой оси, ингибируя экспрессию *xnr1* в присутствии серотонина, который аккумулирован в правой части зародыша (Carneiro et al., 2011).

В работе Франческатто и коллег показано, что инъекция морфолино к мРНК, кодирующей СаМК-II (кальмодулин киназа II – фермент Ca^{2+} /кальмодулин-зависимая киназа 2), в эмбрионы *Danio rerio* на стадиях от зиготы до 4 клеток, приводит к нарушениям в латерализации внутренних органов: положение сердца было средним или правосторонним в 60–75% случаев, положение внутренних органов – 55–73% (Francescatto et al., 2010).

СаМК-II экспрессируется равномерно вокруг купферовского пузырька, но активируется только на левой стороне. Как считают авторы, активация САМКII на стадиях 10–12 сомитов является следствием существенного повышения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} на стадии 5–8 сомитов (Sarmah et al, 2005), однако, до сих пор не ясно, какой именно сигнальный путь, регулирующий

Таблица 2. Специфическое подавление или стимуляция экспрессии того или иного гена с помощью методов геной инженерии

Объект	Экспериментальные манипуляции	Оценка результатов	Результат	Ссылка
<i>Gallus gallus</i>	Добавление в среду, в которой развивались эмбрионы антигисмысловых олигонуклеотидов к <i>Sx43</i>	Экспрессия <i>nodal</i>	У 22% эмбрионов билатеральная или отсутствующая экспрессия <i>nodal</i>	Levin, Mercola, 1999
<i>Xenopus laevis</i>	Инъекция в вентральный левый blastomer мРНК, экспрессирующей мутантный перманентно активный <i>Mad3</i> . Инъекция мРНК, экспрессирующей мутантный инактивированный <i>Mad3</i> в вентральный правый blastomer	Положение сердца, желудка, желчного пузыря на стадии 45	Гетеротаксия у 22% (инъекция перманентно активной формы <i>Mad3</i>) или 17.5% (инъекция инактивированной формы <i>Mad3</i>) эмбрионов	Carneiro et al., 2011
<i>Xenopus laevis</i>	Инъекция мРНК <i>HDAC</i> в левые blastomeres на стадии 3 или инъекция <i>double negative HDAC</i> в правые blastomeres	Положение сердца, желудка, желчного пузыря на стадии 45	Гетеротаксия у 18–20% эмбрионов (при инъекции <i>double negative HDAC</i> в правые blastomeres) или 19% при инъекции <i>HDAC</i> дикого типа в вентральный левый blastomer	Carneiro et al., 2011
<i>Danio rerio</i>	Инъекция морфолино к белкам, кодирующим СаМК-II на стадиях от зиготы до стадии 4 клеток	Оценка положения сердца по экспрессии <i>smc2</i> через сутки после оплодотворения, внутренних органов по экспрессии <i>foxa3</i> через два дня после оплодотворения	Средняя или правосторонняя экспрессии <i>smc2</i> у 60–75% зародышей и срединная или правосторонняя экспрессия <i>foxa3</i> у 55–73% зародышей	Francescato et al., 2010
<i>Danio rerio</i>	Введение морфолино к <i>polaris</i> и <i>hippi</i> на стадии 8–10 сомитов.	Определение места экспрессии <i>southraw</i> и <i>pix2</i>	Правосторонняя (7–15%) или отсутствие экспрессии <i>southraw</i> и <i>pix2</i> у 30% эмбрионов (<i>polaris</i>), отсутствие экспрессии <i>southraw</i> и <i>pix2</i> у зародышей, которым вводили морфолино <i>hippi</i>	Kramer-Zucker et al., 2005
<i>Danio rerio</i>	Инъекция морфолино инозитол-1,3,4,5,6-пентакисфат3-киназы на стадии дробления	Положение сердечной трубки на стадии 28 часов после оплодотворения	Правостороннее расположение сердца у 44% зародышей	Sarmah et al., 2005

установление лево-правой асимметрии, активируется САМКII киназой. По мнению авторов СаМК-II может влиять на секрецию белков или вызывать деградацию Chagon, белка-антагониста Southpaw (Francescato et al., 2010).

В работе Крамер-Цукер и соавторов 2005 года, описывающей роль реснитчатых клеток купферовского пузырька в становлении асимметрии внутренних органов у рыб, приведены данные, показывающие, что вмешательство в работу ресничек приводит к нарушениям в латерализации. Введение морфолино к мРНК, кодирующим *ro-laris* и *hippi* (белки, отвечающих за внутриресничный транспорт) на стадии 8–10 сомитов в зародышевой *Danio rerio* приводило к варибельности в паттерне экспрессии *southpaw* и *pitx2* – отсутствию экспрессии в большинстве случаев, а также левосторонней (как в норме), правосторонней (инвертированной), а иногда и билатеральной экспрессии (Kramer-Zucker et al., 2005).

ИНЪЕКЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЭМБРИОН

Другой группой методов, используемых для получения зародышей позвоночных с нарушением в установлении лево-правой асимметрии, является инъекция биологически активных веществ в зародышевые клетки и ткани (табл. 3).

В приведенной выше работе Фукумото 2005 года помимо результатов инкубации эмбрионов *Xenopus laevis* в растворах ингибиторов серотониновых рецепторов или блокаторов моноаминоксидазы, приводятся также данные экспериментов по инъекции блокаторов в клетки зародышей. При введении LY-278,584 (блокатор серотонинового рецептора 3 типа) в правый вентральный бластомер достигается 18% гетеротаксии на 45 стадии развития, причем из них 61–69% – *situs inversus totalis*. Инъекция ингибитора в другие бластомеры приводит к меньшему эффекту (Fukumoto et al., 2005a).

Стоит отметить также результаты экспериментов Вандерберга, в которой производили инъекцию серотонина в один из бластомеров *Xenopus laevis* на стадии 4 клеток. В результате исследователи добивались увеличенного числа эмбрионов с гетеротаксией по сравнению с контрольной группой животных. Что интересно, при инъекции серотонина в левые бластомеры частота гетеротаксии была выше, чем при инъекции в правые. Кроме того, авторами было произведено введение мРНК неактивного рецептора к серотонину 3 типа в один из 4 бластомеров, что также отразилось на расположении внутренних органов. Это исследование показало, что наибольший эффект (гетеротаксии у 55% зародышей) давала инъекция мРНК неактивного рецептора к серотонину 3 типа в правый вентральный бластомер (Vandenberg et al., 2013).

Еще в середине 2000-х гг было показано, что внутриклеточная концентрация ионов Ca^{2+} выше в левой стороне гензеновского узелка у мыши и в левой стороне купферовского пузырька у *Danio rerio*, причем нарушения в работе ресничек приводят к исчезновению данной асимметрии и нарушению установления лево-правой оси в дальнейшем развитии (McGrath et al., 2003; Essner et al., 2005). Показано, что такое неравномерное распределение ионов кальция относительно сагиттальной плоскости у птиц также приводит к установлению лево-правой асимметрии (Garic-Stankovic et al., 2008). При помощи пропитанных хелатором Ca^{2+} ВАРТА-АМ микробусин, введенных в левую сторону гензеновского узелка куриного эмбриона на стадии НН4 можно добиться снижения уровня внутриклеточного Ca^{2+} на левой стороне. Такое воздействие приводит к нарушению в латерализации сердца в 40% случаев, в то время как введение микробусин с ВАРТА-АМ в правую сторону гензеновского узелка не имело эффекта на положение сердца (Garic-Stankovic et al., 2008).

Кроме того, инъекция пропитанных ВАРТА-АМ микробусин в левую сторону гензеновского узелка приводило к билатеральной экспрессии *nodal* в 60% случаев. Правосторонняя инъекция бусин, пропитанных иономицином (Ca^{2+} ионофор, благодаря которому внеклеточный Ca^{2+} входит в клетки и повышается концентрация внутриклеточного Ca^{2+}) приводила к правостороннему положению сердца у 31% зародышей, левосторонняя инъекция не оказывала влияние на развитие сердца (Garic-Stankovic et al., 2008). Также на положение сердца у куриных эмбрионов оказывало влияние левостороннее введение бусин, пропитанных ингибитором кальмодулина кальмидозолием: число зародышей с нарушенной латерализацией сердца возрастало до 36%, и у 59% эмбрионов не экспрессировался *nodal*.

После установления левостороннего тока жидкости в купферовском органе *Danio rerio* на стадиях 5–8 сомитов происходит увеличение концентрации ионов кальция внутри клеток, в левой стороне увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} выражено сильнее (Sarmah et al., 2005). Было показано, что при инъекции морфолино инозитол-1,3,4,5,6-пентакисфосфат3-киназы на стадии дробления приводит к тому, что 44% эмбрионов на стадии 28 часов после оплодотворения имеют сердце на правой стороне, что свидетельствует о роли инозитол-полифосфатного сигнального пути в передаче кальциевой сигнализации и индукции асимметричной экспрессии *nodal*, *lefty-1* и *pitx2* (Sarmah et al., 2005).

В работе Йоста и коллег 1992 года было показано, что инъекция в бластоцель *Xenopus laevis* на стадии 8–10 полипептидов, имеющие RGD-мотивы или гепаринидазу, приводит к *situs inversus* у 46% или 40% животных, соответственно. Данный

Таблица 3. Результаты экспериментов по инъекции биологически активных веществ в эмбрион

Объект	Экспериментальные манипуляции	Оценка результатов	Результат	Ссылка
<i>Xenopus laevis</i>	Инъекция LY-278,584 в вентральный правый бластомер.	Положение сердца, желчного пузыря и желудка на стадии 45	Гетеротаксия у 18% эмбрионов	Fukumoto et al., 2005a
<i>Xenopus laevis</i>	Инъекция серотонина в один из бластомеров на стадии 3	Положение сердца, желчного пузыря и желудка на стадии 45	10–30% случаев гетеротаксии у эмбрионов, в зависимости от количества серотонина и бластомера, в который производили инъекцию	Vandenberg et al., 2013
<i>Gallus gallus</i>	Апликация на левую сторону гензензовского узелка бусин, пропитанных ВАРГА-АМ, на стадии HH3++/HH4	Ориентация сердечной петли на стадии HH10/HH11, место экспрессии <i>nodal</i> на стадии 3 (4 сомитов)	У 40% наблюдалось инвертированное положение сердца, билатеральная экспрессия <i>nodal</i> у 60% эмбрионов	Garic-Stankovic et al., 2008
<i>Gallus gallus</i>	Апликация бусин, пропитанных иономицином, на правую сторону гензензовского узелка на стадии HH3++/HH4	Ориентация сердечной петли на стадии HH10/HH11, место экспрессии <i>nodal</i> на стадии 3 (4 сомитов)	31% с инвертированным положением сердца, 67% эмбрионов не экспрессировали <i>nodal</i> в боковой пластинке	Garic-Stankovic et al., 2008
<i>Xenopus laevis</i>	Инъекция в бластоцель на стадии 8–10 гепаринидазы или полипептидов, имеющие RGD-мотивы	Оценивали положение сердца, печени, желчного пузыря и щитовидной железы и расположения и направления закручивания кишечника	<i>Situs inversus</i> у 46% эмбрионов (RGD) или у 40% (гепаринидаза)	Yost, 1992
<i>Xenopus laevis</i>	Инъекция Activin в субэпидермальное пространство в правой части нейрулы (между 13 и 18 стадиями)	Положение сердца и кишечника на стадии 41–42	Нарушение латерализации у 100% эмбрионов, <i>situs inversus</i> у 80%	Toyoizumi et al., 2000
<i>Xenopus laevis</i>	Инъекция TGFβ5 в правую часть эмбриона,	Положение сердца и кишечника на стадии 41–42	<i>Situs inversus</i> у 88% зародышей	Mogi et al., 2003
<i>Xenopus laevis</i>	Инъекция Хлг-1 в правую боковую пластинку	Положение сердца и кишечника на стадии 41–42	Гетеротаксия у 90% зародышей	Toyoizumi et al., 2005

результат свидетельствует о том, что конститутивный межклеточный матрикс необходим для формирования нормальной лево-правой асимметрии, возможно, через создание субстрата для миграции клеток (Yost, 1992).

Еще один способ добиться нарушения лево-правой латерализации внутренних органов – непосредственная инъекция белков Nodal-каскада в правую часть эмбриона. В начале 2000 году вышла серия работ, авторы которых добивались *situs inversus* у *Xenopus laevis* за счет введения различных белков в правую часть эмбриона на стадии нейрулы (в промежуток между 13 и 18 стадиями развития). Так, Тойодзуми и его коллеги инъекцировали 10–250 пг белка семейства трансформирующего ростового фактора β (TGF β) Activin в субэпидермальное пространство, покрывающее правую боковую пластинку. В результате было получено около 100% зародышей с нарушенной латерализацией внутренних органов, из которых около 80% демонстрировали *situs inversus* (Toyozumi et al., 2000).

В следующей работе этой группы Мого и его коллеги инъекцировали другой белок семейства TGF β , TGF β 5, в правую часть нейрулы. Инъекция TGF β 5 приводила к тому, что до 94% инъекцированных эмбрионов, в зависимости от стадии развития, на которой проводили инъекцию, показывали нарушения в положении внутренних органов, причем полная транслокация внутренних органов была у 88% животных. Максимальный эффект наблюдался при инъекции TGF β 5 на 13–14 стадии развития (Mogi et al., 2003).

Наконец, в работе 2005 той же группы инъекцировали белок Xnr-1 в правую боковую пластинку эмбрионов *Xenopus laevis* на стадиях 13–20, что также приводило к большому числу нарушений в лево-правосторонней асимметрии внутренних органов (85–90%). Примечательно, что при инъекции Xnr-1 в правую часть эмбриона наблюдалась большая частота гетеротаксии, чем при инъекции TGF β 5 или активина, – от 30 до 60% эмбрионов демонстрировали раскоординацию положения внутренних органов (Toyozumi et al., 2005).

МИКРОХИРУРГИЧЕСКИЕ ОПЕРАЦИИ НА ЗАРОДЫШЕ

Реверсии лево-правой оси у позвоночных животных можно добиться также с помощью микрохирургических операций (табл. 4). Выше уже были описаны исследования Ганса Шпемана и его коллег, в которых было показано, что наложение частичной лигатуры на дробящееся яйцо тритона приводило к развитию *situs inversus*, причем всегда – у правого близнеца (Blum et al., 2009), а также работы его учеников Курта Пресслер и Рудольфа Мейера в которых было показано, что микрохирургический поворот среднедорсальной части нейрулы на 180° приводит к появлению головастика *Rana “esculenta”* и *Bombina variegata* с ин-

вертированными внутренними органами (Pressler, 1911). Это были первые работы по получению инвертированных эмбрионов позвоночных с помощью микрохирургии.

В 1945 году Роберт Бэкон провел операции по удалению выстилки архентерона у зародышей *Ambystoma punctatum*. Смертность после такого воздействия была высокой, из 115 эмбрионов 61 дожили до стадии поздней хвостовой почки и только 3 пережили эту стадию. В результате таких экспериментов у 18 эмбрионов развивалось два сердца – на правой и на левой стороне, причем левое сердце всегда было больше и лучше развито, чем правое (Wason, 1945).

В работе Байджолли и соавторов, выполненной на медаке *Oryzias latipes* было использовано физическое воздействие, предотвращающее формирование зоны реснитчатых клеток. При помощи инъекции большого объема воды исследователи добивались разрушения купферовского узелка. Результаты подобного воздействия зависели от фазы развития зародышей: если операция происходила на стадии одного сомита, асимметричная экспрессия *lefty* у 61% эмбрионов была нарушена: у 11% зародышей экспрессия была правосторонней, у 28% – билатеральной, а у 22% отсутствовала. При операции на стадии 2–3 сомитов нарушения в экспрессии *lefty* наблюдали только в 20% случаев, воздействия на более поздних этапах не оказывали влияние на латерализацию внутренних органов (Vajoghli et al., 2007).

Аналогичный подход был использован Мартином Блумом и его соавторами в экспериментах на эмбрионах шпорцевых лягушек. Удаление головной мезодермы (superficial mesoderm) на стадии 10 приводило к тому, что на стадии 45 наблюдали инвертированное закручивание кишки, положение сердца и желчного пузыря или раскоординацию положения внутренних органов (Blum et al., 2009). Ранее было показано, что именно эти клетки формируют крышу бластоцеля, они покрыты ресничками, биение которых производит левосторонний ток жидкости (Shook et al., 2004)

К этой же группе экспериментов можно отнести и работу Йоста и его коллег 1992 года, в которой на стадии 10 наносили рану в области анимальной эктодермы или же производили удаление и реимплантацию эктодермы. В результате таких манипуляций положение каждого из асимметричных внутренних органов изменялось в 50% случаев, независимо от сохранения ориентации имплантированного участка или ее поворота на 180° (Yost, 1992). В исследовании учитывали положение сердца, печени, желчного пузыря, поджелудочной железы и направление закручивания кишечника. Возможно, такой эффект объясняется тем, что на стадии ранней гастролы происходит формирование фибронектинового и геперансульфатного компонентов межклеточного мат-

Таблица 4. Результаты микрохирургических экспериментов, приводящих к нарушениям в установлении лево-правой асимметрии

Объект	Экспериментальные манипуляции	Оценка результатов	Результат	Ссылка
<i>Oryzias latipes</i>	Разрушение кулферовского узелка при помощи инъекции большого объема воды на стадии 1 сомита	Экспрессия <i>lefty</i>	Левосторонняя асимметричная экспрессия <i>lefty</i> нарушена у 61% эмбрионов	Vajoghli et al., 2007
<i>Xenopus laevis</i>	Удаление головной мезодермы на стадии 10	Положение сердца, желчного пузыря и направление закручивания кишечника	Рандомизация установления лево-правой асимметрии.	Blum M. et al., 2009
<i>Xenopus laevis</i>	Нанесение раны в район анимальной эктодермы, удаление и реимплантация энтодермы	Положение сердца, печени, желчного пузыря и щитовидной железы и расположения кишечника	Положение внутренних органов инвертировалось у 50% эмбрионов	Yost, 1992
<i>Gallus gallus</i>	Пересадка участков прекардиальной мезодермы на стадии 6 с образованием у реципиента двух левых или двух правых участков	Формирование петель сердца	Левосторонняя сердечная петля у 24% эмбрионов, <i>cardia bifida</i> у 32% зародышей с двумя правыми участками прекардиальной мезодермы через 24–36 часов после операции	Noyle et al., 1992
<i>Gallus gallus</i>	Пересадка кардиогенных участков на стадии 5 с образованием двух правых или двух левых участков у животного – реципиента	Формирование петель сердца	Левосторонняя сердечная петля у 17.4 эмбрионов, <i>cardia bifida</i> у 15.2% зародышей с двумя правыми кардиогенными участками на стадии 12	Salazar Del Rio, 1974

рикса, а вмешательство в целостность эктодермы приводит к реорганизации матрикса (Yost, 1992).

В работе Салазар Дель Рио было показано, что различные способы культивирования куриных эмбрионов с 5 по 12 стадии (здесь и далее по Hamburger, Hamilton, 1951) *in vitro* влияют на формирование сердца. Так, инкубация зародышей курицы на кольце бумаги приводила к тому, что у 30% эмбрионов развивалась левосторонняя (то есть инвертированная) петля сердца. При культивировании куриных зародышей по методу Спратта на агаре, содержащем яичный белок (Spratt, 1947), в 18% случаев бульбовентрикулярная петля была обращена влево. Среди же эмбрионов, культивированных по методу Нью (*in vitro* на вителлиновой мембране в растворе яичного белка (New, 1955)), такой вариант развития наблюдался только у 6% эмбрионов (Salazar Del Rio, 1974). Используя метод культивации куриных эмбрионов по Нью, Хойл и соавторы провели эксперимент по пересадке участков кардиогенной мезодермы между куриными эмбрионами на 6 стадии развития таким образом, что у зародышей оказывалось либо два правых участка, либо два левых. Результаты показали, что развитие эмбрионов, получивших два правых участка кардиогенной мезодермы, приводило к формированию левой сердечной петли у 24% зародышей, у 32% развивалось *cardia bifida*, и только у 28% эмбрионов было сформировано сердце с правосторонней петлей. У группы эмбрионов с двумя левыми мезодермальными участками и в контрольной группе аномально сформированных сердец не было (Hoyle et al., 1992). В аналогичных экспериментах, проведенных Салазар Дель Рио на более ранней, 5 стадии эмбрионального развития куриного зародыша, были получены схожие результаты: 9 из 46 (17.4%) эмбрионов с двумя правыми кардиогенными участками имели левостороннюю сердечную петлю, а 7 из них (15.2%) — *cardia bifida*. При перестановке кардиогенных участков местами только 50% зародышей имели нормально сформированное сердце, у 4.4% эмбрионов оно было с левосторонней петлей, 43.4% — *cardia bifida* (Salazar Del Rio, 1974).

БИОМЕХАНИЧЕСКИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РАЗВИВАЮЩИХСЯ ЖИВОТНЫХ

В ряде работ показано, что искусственно изменить формирование лево-правой асимметрии можно при помощи биомеханических воздействий (табл. 5).

Исследователями из группы Хироши Хамады было показано, что изменения направления сердечной петли и инвертированную экспрессию *pitx2* у мышей можно получить с помощью создания искусственного правостороннего тока жидкости в области узелка. В этой же работе было показано, что с помощью искусственного левостороннего тока удастся восстановить нормальное

развитие мутантных *iv/iv* мышей. При данной мутации в 50% случаев у гомозигот развивается *situs inversus*, и ток в области гензеновского узелка отсутствует из-за нарушения биения ресничек (Nonaka et al., 2002)

В 2007 году вышла работа Акселя Швейкерт и его коллег, в которой была показана ведущая роль реснитчатых клеток крыши гастроцеля в установлении лево-правой асимметрии *Xenopus laevis* (Schweickert et al. 2007). В данном исследовании авторы инъецировали метилцеллюлозу в область архентерона на стадиях 14–18 по Ньюкуну-Фаберу. В результате введения 1–1.5% раствора метилцеллюлозы вязкость среды гастроцеля повышалась, создавая, таким образом, затруднения биению ресничек и замедление производимого ими тока жидкости. Такое воздействие приводило к повышению числа аномалий в установлении лево-правой асимметрии: число эмбрионов с гетеротаксией на стадии 45 составляло 33%, а 8% зародышей демонстрировали *situs inversus*. Также повышалось число животных, у которых на стадиях 22–34 отсутствовала экспрессия генов *nodal* и *pitx2* (Schweickert et al. 2007).

В другом исследовании (Vandenberg et al., 2012) изучали влияние вибрации на установление лево-правой асимметрии у шпорцевых лягушек, *Xenopus laevis*, и рыб, *Danio rerio*. Эмбрионы амфибий и рыб подвергались вибрации в течение ночи, начиная со стадии зиготы до конца нейруляции у *Xenopus laevis* (примерно 18–19 стадии) и на стадии 5 сомитов у *Danio rerio*. Результат оценивали на 45 стадии развития у лягушек и на стадии 7 дней после оплодотворения у рыб. Было исследовано влияние вибрации разной частоты, направления воздействия, разной формой волны. Результаты экспериментов показали, что для воздействия на латерализацию внутренних органов *Xenopus laevis* (сердце, желчный пузырь, кишечник) наиболее оптимальная вибрация малой частоты (7 Гц), вертикально направлена, с синусоидной формы волны. При этом достигается максимальная частота нарушений лево-правой асимметрии (35%) при минимальных нарушениях в формировании нервной трубки и хвоста. Для рыб вибрация, наиболее подходящая для вмешательства в лево-правую асимметрию внутренних органов, составляла 15 Гц, горизонтально направленная, с прямоугольной формой волны. В таком случае наблюдали наименьшую частоту нарушений в форме хвоста; на формирование нервной трубки у рыб вибрация влияния не оказывала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: НА ПУТИ К РАЗРАБОТКЕ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ИНВЕРТИРОВАННЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ

Как это можно было бы предположить *a priori*, большинство экспериментальных исследований по искусственному нарушению установления висцеральной асимметрии позвоночных, прове-

Таблица 5. Результаты биомеханических экспериментов, приводящих к нарушениям в установлении лево-правой асимметрии позвоночных

Объект	Экспериментальные манипуляции	Оценка результатов	Результат	Ссылка
<i>Mus musculus</i>	Создание искусственного правостороннего тока жидкости в области узелка	Направление сердечной петли и экспрессия <i>pitx2</i>	87.5% эмбрионов с инвертированным направлением сердечной петли и правосторонняя экспрессия <i>pitx2</i>	Nonaka et al., 2002
<i>Xenopus laevis</i>	Иньекция метилцеллюлозы на стадиях 14–18 в область архентерона	Направление сердечной петли, закручивание кишечника, положение желчного пузыря, экспрессия генов <i>nodal</i> и <i>pitx2</i> .	33% эмбрионов с гетеротаксией. 8% – <i>situs inversus</i> . 36% зародышей не экспрессировали <i>nodal</i> 50% не экспрессировали <i>pitx2</i>	Schweickert et al., 2007
<i>Xenopus laevis</i>	Воздействие вибрацией на развивающиеся эмбрионы от момента оплодотворения до стадии 18–19	Положение сердца, желчного пузыря и кишечника ан стадии 45	До 35% зародышей с раскоординацией положения внутренних органов в зависимости от типа вибрации	Vandenberg et al., 2012

денных в 1990–2000-е годы, базируются на тех концептуальных моделях, которые доминировали в биологии развития для данной группы позвоночных. Большая часть исследований проведена на зародышах рыб и амфибий, а вплоть до второй половины двухтысячных годов модель ранней предетерминации асимметрии признавалась для этих групп большинством эмбриологов.

К сожалению, экспериментальных работ по инвертированию зародышей млекопитающих крайне мало, такие эксперименты проводили вне тела матери и на таких стадиях, когда ре-имплантация зародышей уже невозможна. Это значит, что пока нет никаких предпосылок говорить о возможности разработки экспериментального метода получения инвертированных млекопитающих в ближайшие годы. Поиск мутантных линий с нарушениями в установлении лево-правой асимметрии, таких как мутация *iv*, представляется нам в этом случае более перспективным. У рыб, амфибий и птиц развитие зародыша происходит вне тела матери, и разработка методов экспериментального инвертирования для представителей этих групп позвоночных может оказаться более успешной стратегией.

В большинстве случаев вмешательство в процесс формирования лево-правой оси тела приводит к раскоординации положения внутренних органов: результатом подобных экспериментов становится рандомизация положения внутренних органов. Основная проблема, на наш взгляд, заключается в том, что в большинстве исследований, базирующихся на модели ранней предетерминации, воздействие на зародышей проводили начиная с очень ранних стадий в течение длительного времени. Лишь немногие эксперименты приводили только к *situs inversus totalis*. Увеличивалась вероятность влияния эксперимента на другие типы морфогенетических процессов и нарушения полярности вдоль передне-задней и

дорсо-вентральной осей эмбриона. Возможными путями разработки метода с более четким эффектом могут быть более узконаправленное воздействие на меньшем временном интервале, на котором это воздействие наиболее эффективно. Среди удачных работ со стратегией более специфического воздействия можно выделить эксперименты в которых производили инъекцию белков семейства TGF β (Toyoizumi et al., 2000; Mogi et al., 2003; Toyoizumi et al., 2005), в результате чего практически все эмбрионы, подвергшиеся экспериментальным воздействиям, обладали транслоцированными внутренними органами. Другим удачным примером этой стратегии можно считать работу по изучению влияния блокаторов серотониновых рецепторов 3 типа на латерализацию внутренних органов, когда *situs inversus* наблюдали у 20% эмбрионов *Xenopus laevis* (Fukumoto et al., 2005b). При этом следует подчеркнуть, что наиболее перспективные модели возможно создать на анамниях, на которых можно морфогенетический агент добавить и убрать в любой момент, тогда как введение веществ в зародыши амниот не предполагает их выведения по желанию экспериментатора и, тем самым, окончания эксперимента в нужное время. Соответственно, “точечность” воздействия сильно падает. Из рыб и амфибий особенно привлекательны последние, как обладающие дополнительными преимуществами, так как на них проще использовать широкий спектр методов, в том числе микрохирургических. Успешным примером стратегии по стадия-специфичному воздействию может служить работа сотрудников лаборатории Мартина Блума (Schweickert et al., 2007) инверсия внутренних органов среди 8% эмбрионов достигалась вызванным затруднением в биении ресничек, из-за искусственного повышения вязкости жидкости в полости гастроцеля. Модель потери симметрии на стадии нейрулы в результате биения ресничек и тока жидкости применительно к

развитию низших позвоночных, на которой базировались авторы данного исследования, становится все более популярной. Если эти представления верны, в ближайшие годы мы увидим новые экспериментальные работы с более четким стадия-специфичным воздействием на становление лево-правой асимметрии у рыб и, особенно, амфибий.

Работа выполняется при поддержке гранта РНФ № 14-14-00284 “Моторные и зрительные асимметрии у позвоночных животных: эволюция и роль в жизни вида.” (рук. Малашичев Е.Б.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Буанки В.Л.* Асимметрия мозга животных. Ленинград: Наука, 1985. 294 с.
- Adams D.S., Robinson K.R., Fukumoto T. et al.* Early, H⁺-V-ATPase-dependent proton flux is necessary for consistent left-right patterning of non-mammalian vertebrates // *Development*. 2006. V. 133. № 9. P. 1657–1671.
- Afzelius B.A.* A human syndrome caused by immotile cilia // *Science*. 1976. V. 193. № 4250. P. 317–319
- Aw S., Adams D.S., Qiu D. et al.* H,K-ATPase protein localization and Kir4.1 function reveal concordance of three axes during early determination of left-right asymmetry // *Mech Dev*. 2008. V. 125. № 3–4. P. 353–72.
- Bacon R.L.* Self-differentiation and induction in the heart of *Amblystoma* // *Journal of Experimental Zoology*. 1945. V. 98. № 2. P. 87–125.
- Barth K.A., Miklosi A., Watkins J. et al.* fsi Zebrafish show concordial reversal of laterality of viscera, neuroanatomy, and a subset of behavioral responses // *Current Biology*. 2005. V. 15. № 9. P. 844–850.
- Bajoghli B., Aghaallaei N., Soroldoni D. et al.* The roles of Groucho/Tle in left–right asymmetry and Kupffer’s vesicle organogenesis // *Developmental Biology*. 2007. V. 303. № 1. P. 347–361.
- Berg C., Geipel A., Kamil D. et al.* The Syndrome of Left Isomerism // *J. Ultrasound Med*. 2005. V. 24. № 7. P. 921–931
- Beyer T., Thumberger T., Schweickert A. et al.* Connexin 26-mediated transfer of laterality cues in *Xenopus* // *Biol. Open*. 2012. V. 1. № 5. P. 473–481.
- Biszazza A., Cantalupo C., Robins A. et al.* Pawedness and motor asymmetries in toads // *Laterality*. 1997. V. 2. № 1. P. 49–64.
- Blum M., Beyer T., Weber T et al.* *Xenopus*, an Ideal Model System to Study Vertebrate Left-Right Asymmetry // *Developmental Dynamycs*. 2009. V. 238. № 6. P. 1215–1225.
- Bunney T.D., De Boer A.H., Levin M.* Fusicocin signaling reveals 14-3-3 protein function as a novel step in left-right patterning during amphibian embryogenesis // *Development*. 2003. V. 130. № 20. P. 4847–58.
- Buznikov G.A.* The action of neurotransmitters and related substances on early embryogenesis // *Pharmacol Ther*. 1984. V. 25. № 1. P. 23–59.
- Carneiro K., Donnet C., Rejtar T. et al.* Histone deacetylase activity is necessary for left–right patterning during vertebrate development // *BMC Dev Biol*. 2011. V. 20. № 11. P. 1–29.
- Cleveland M.* *Situs inversus viscerum* an anatomic study // *Arch Surg*. 1926. V. 13. № 3. P. 343–368
- Corballis M.C.* The evolution and genetics of cerebral asymmetry // *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2009. V. 364. № 1519. P. 867–879.
- Concha M.L., Burdine R.D., Russel C. et al.* A nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain // *Neron*. 2000. V. 28. № 2. P. 399–409.
- Davis E.E., Katsanis N.* The ciliopathies: a transitional model into systems biology of human genetic disease // *Current Opinion in Genetics & Development*. 2012. V. 22. № 3. P. 290–303.
- Ermakov A.S.* Establishment of Visceral Left–Right Asymmetry in Mammals: The Role of Ciliary Action and Leftward Fluid Flow in the Region of Hensen’s Node // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2013. V. 44. № 5. P. 254–266.
- Essner J.J., Amack J.D., Nyholm M.K. et al.* Kupffer’s vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left–right development of the brain, heart and gut // *Development*. 2005. V. 132. № 6. P. 1247–1260.
- Francescato L., Rothschild S.C., Myers A.L. et al.* The activation of membrane targeted CaMK-II in the zebrafish Kupffer’s vesicle is required for left-right asymmetry // *Development*. 2010. V. 137. № 16. P. 2753–2762.
- Fukumoto T., Kema I.P., Levin M.* Serotonin signaling is a very early step in patterning of the left–right axis in chick and frog embryos // *Curr. Biol*. 2005a. V. 15. № 9. P. 794–803.
- Fukumoto T., Blakely R., Levin, M.* Serotonin transporter function is an early step in left right patterning in chick and frog embryos // *Dev. Neurosci*. 2005b. V. 27. № 6. P. 349–363.
- Garic-Stankovic A., Hernandez M., Flentke G.R. et al.* A ry-anodine receptor-dependent *Cai2+* asymmetry at Hensen’s node mediates avian lateral identity // *Development*. 2008. V. 135. № 19. P. 3271–80.
- Hamburger V., Hamilton H.* A series of normal stages in the development of the chick embryo // *Journal of Morphology*. 1951. V. 88. № 1. P. 49–92
- Hoyle C., Brown N.A., Wolpert L.* Development of left/right handedness in the chick heart // *Development*. 1992. № 115. P. 1071–1078
- Herbert M.R., Ziegler D.A., Deutsch C.K. et al.* Brain asymmetries in autism and developmental language disorder: a nested whole-brain analysis // *Brain*. 2005. V. 128. № 1. P. 213–226
- Kawakami Y., Raya A., Raya R.M. et al.* Retinoic acid signalling links left–right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo // *Nature*. 2005. V. 435. № 7039. P. 165–171
- Kennedy D.N., O’Craven K.M., Ticho B.S. et al.* Structural and functional brain asymmetries in human *situs inversus totalis* // *Neurology*. 1999. V. 53. № 6. P. 1260–1265.
- Klysiak M.* Ciliary syndromes and treatment // *Pathology – Research and Practice*. 2008. V. 204. № 2. P. 77–88
- Korthout H., De Boer A. H.* A fusicocin-binding protein belongs to the family of 14-3-3 brain protein homologs // *Plant Cell*. 1994. V. 6. № 11. P. 1681–1692.
- Kramer-Zucker A.G., Olale F., Haycraft C.J. et al.* Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer’s vesicle is required for normal organogenesis // *Development*. 2005. V. 132. № 8. P. 1907–1921.
- Levin M.* Left-right asymmetry in vertebrate embryogenesis // *Bioessays*. 1997. V. 19. № 4. P. 287–96.
- Levin M.* The embryonic origins of left-right asymmetry // *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004. V. 15. № 4. P. 197–206.

- Levin M. Left–right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review // *Mechanisms of Development*. 2005. V. 122. № 4. P. 3–25.
- Levin M., Buznikov G.A., Lauder J.M. Of minds and embryos: left–right asymmetry and the serotonergic controls of pre–neural morphogenesis // *Dev Neurosci*. 2006. V. 28. № 3. P. 171–185.
- Levin M., Mercola M. The compulsion of chirality: toward an understanding of left–right asymmetry // *Genes & Dev*. 1998a. V. 12. № 6. P. 763–769.
- Levin M., Mercola M. Gap junctions are involved in the early generation of left right asymmetry // *Dev Biol* 1998b. V. 203. № 1. P. 90–105.
- Levin M., Mercola M. Gap junction-mediated transfer of left–right patterning signals in the early chick blastoderm is upstream of Shh asymmetry in the node // *Development* 1999. V. 126. № 1. P. 4703–4714.
- Levin M., Thorlin T., Robinson K.R. et al. Asymmetries in H/K-ATPase and Cell Membrane Potentials Comprise a Very Early Step in Left–Right Patterning // *Cell*. 2002. V. 111. № 1. P. 77–89.
- Long S., Ahmad N., Rebagliati M. The zebrafish nodal-related gene southpaw is required for visceral and diencephalic left–right asymmetry // *Development*. 2003; V. 130. № 11. P. 2303–2316.
- Malashichev Y.B. One-sided limb preference is linked to alternating-limb locomotion in anuran amphibians // *J. Comp. Psychology*. 2006. V. 120. № 4. P. 401–410.
- Malashichev Y.B., Deckel A.W. Behavioral and morphological asymmetries in vertebrates. Austin: Landes Bioscience, 2006. 193 p.
- Malashichev Y.B., Rogers L.J. (Eds.). Behavioural and morphological asymmetries in amphibians and reptiles // *Laterality: Asymmetries of Body, Brain, and Cognition* (Special Issue). 2002. V. 7. № 3. 195–293.
- Malashichev Y., Wassersug R.J. Left and right in the amphibian world: which way to develop and where to turn // *BioEssays*. 2004. V. 26. № 5. P. 512–522.
- McGrath J., Somlo S., Makova S. et al. Two Populations of Node Monocilia Initiate Left–Right Asymmetry in the Mouse // *Cell*. 2003. V. 114. № 1. P. 61–73.
- McManus C. Reversed Bodies, Reversed Brains, and (Some) Reversed Behaviors: Of Zebrafish and Men // *Developmental cell*. 2005. V. 8. № 6. P. 796–797.
- Mogi K., Goto M., Ohno E. et al. *Xenopus* neurula left–right asymmetry is respecified by microinjecting TGF- β 5 protein // *Int. J. Dev. Biol*. 2003. V. 47. № 1. P. 15–29.
- Morokuma J., Blackiston D., Levin M. KCNQ1 and KCNE1 K⁺ channel components are involved in early left–right patterning in *Xenopus laevis* embryos // *Cell Physiol Biochem*. 2008. V. 21. № 5–6. P. 357–72.
- New D.A. A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro // *J. Embryol. Exp. Morph.* 1955. V. 3. № 4. P. 320–31.
- Nieuwkoop P.D., Faber J. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1967. 258 p.
- Nishi T., Forgac M. The vacuolar (H⁺)-ATPases – nature’s most versatile proton pumps // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002. V. 3. № 2. P. 94–103.
- Nishide K., Mugitani M., Kumano G. et al. Neurula rotation determines left–right asymmetry in ascidian tadpole larvae // *Development*. 2012. V. 139. № 8. P. 1467–1475.
- Nonaka S., Tanaka Y., Okada Y. et al. Randomization of Left–Right Asymmetry due to Loss of Nodal Cilia Generating Leftward Flow of Extraembryonic Fluid in Mice Lacking KIF3B Motor Protein // *Cell*. 1998. V. 95. № 6. P. 829–837.
- Nonaka S., Shiratori H., Saijoh Y. et al. Determination of left–right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow // *Nature*. 2002. V. 418. № 6893. P. 96–99.
- Norris D.P., Grimes D.T. Mouse models of ciliopathies: the state of the art // *Disease Models & Mechanisms*. 2012. V. 5. № 3. P. 299–312
- Okada Y., Takeda S., Tanaka Y. et al. Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left–right axis determination // *Cell*. 2005. V. 121. № 4. P. 633–644.
- Palmer A.R. Symmetry breaking and the evolution of development // *Science*. 2004. V. 306. № 5697. P. 828–833.
- Paulozzi L.J., Lary J.M. Laterality patterns in infants with external birth defects // *Teratology*. 1999. V. 60. № 5. P. 265–271.
- Petty R.G. Structural asymmetries of the human brain and their disturbance in schizophrenia // *Schizophr Bull*. 1999. V. 25. № 1. P. 121–139.
- Polak W.G., Chudoba P.J., Patrzalek D. et al. Organ donor with complete *situs inversus*. Case report and review of the literature // *Ann Transplant*. 2006. V. 11. № 1. P. 43–46.
- Pujol J., Cardoner N., Benlloch L. et al. CSF spaces of the sylvian fissure region in severe melancholic depression // *Neuroimage*. 2002. V. 15. № 1. P. 103–106
- Pressler K. Beobachtungen und Versuche über den normalen und inversen Situs viscerum und cordis bei Anurenlarven // *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*. 1911, V. 32. № 1. P. 1–35.
- Rayhill S.C., Scott D., Orloff S. et al. Orthotopic, but reversed implantation of the liver allograft in *situs inversus totalis*—a simple new approach to a difficult problem // *Am J Transplant*. 2009. V. 9. № 7. P. 1602–1606.
- Robichon F., Lévrier O., Farnarier P. et al. Developmental dyslexia: atypical asymmetry of language areas and its functional significance // *European Journal of Neurology*. 2000. V. 7. № 1. P. 35–46.
- Rogers L.J., Andrew R. Comparative Vertebrate Lateralization. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. 660 p.
- Rogers L.J. Lateralised brain function in anurans: comparison to lateralisation in other vertebrates // *Laterality*. 2002. V. 7. № 3. P. 219–239.
- Rogers L.J., Workman L. Footedness in birds // *Animal Behaviour*. 1993. V. 45. № 2. P. 409–411
- Roussigne M., Bianco I.H., Wilson S.W. et al. Nodal signaling imposes left–right asymmetry upon neurogenesis in the habenular nuclei // *Development*. 2009. V. 136. № 9. P. 1549–1557.
- Roussigne M., Blader P., Wilson S.W. Breaking symmetry: The zebrafish as a model for understanding left–right asymmetry in the developing brain // *Develop Neurobiol*. 2012. V. 72. № 3. P. 269–281.
- Sarmah B., Latimer A.J., Appel B. Inositol polyphosphates regulate zebrafish left–right asymmetry // *Dev Cell*. 2005. V. 9. № 1. P. 133–145.
- Salazar Del Rio. J. Influence of extrinsic factors on the development of the bulboventricular loop of the chick embryo // *J. Embryol. exp. Morph.* 1974. V. 31. № 1. P. 199–206.
- Schreuder M.F. Unilateral anomalies of kidney development: why is left not right? // *Kidney International*. 2011. V. 80. № 7. P. 740–745.
- Schweickert T., Weber T., Beyer P. et al. Cilia-driven leftward flow determines laterality in *Xenopus* // *Curr. Biol*. 2007. V. 17. № 1. P. 60–66.

- Shook D.R., Majer C., Keller R. Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species, *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis* // Dev Biol. 2004. V. 270. № 1. P. 163–185
- Smillie D.A., Llinas A.J., Ryan J.T.P et al. Nuclear import and activity of histone deacetylase in *Xenopus* oocytes is regulated by phosphorylation // Journal of Cell Science. 2004. V. 117. № 9. P. 1857–1866.
- Spencer R. Conjoined Twins: Theoretical Embryologic Basis // Teratology. 1992. V. 45. № 6. P. 591–602.
- Spratt N.T.Jr., A simple method for explanting and cultivating early chick embryos in vitro // Science. 1947. V. 106. № 2758. P. 452.
- Steele J., Uomini N. Humans, tools and handedness. In Stone knapping: the necessary conditions for a uniquely hominin behaviour (eds V. Roux & B. Brill). Cambridge, UK: McDonald Institute for Archaeological Research. 2005. P. 217–239.
- Ströckens F., Güntürkün O., Oecklenburg S. Limb preferences in non-human vertebrates // Laterality: Asymmetries of Body, Brain and Cognition. 2013. V. 18. № 5. P. 536–575.
- Torgersen J. Situs inversus, asymmetry, and twinning // American J. Human Genet. 1950. V. 2. № 4. P. 361–370.
- Toyozumi R., Kobayashi T., Kikukawa A. et al. Adrenergic neurotransmitters and calcium ionophore-induced *situs inversus viscerum* in *Xenopus laevis* embryos // Dev Growth Diff. 1997. V. 39. № 4. P. 505–514.
- Toyozumi R., Mogi K., Takeuchi S. More than 95% reversal of left-right axis induced by right-sided hypodermic microinjection of activin into *Xenopus* neurula embryos // Dev. Biol. 2000. V. 221. № 2. P. 321–336.
- Toyozumi R., Ogasawara T., Takeuchi S. et al. *Xenopus* nodal related-1 is indispensable only for left-right axis determination // Int. J. Dev. Biol. 2005. V. 49. № 8. P. 923–938.
- Vallortigara G., Chiandetti C., Sovrano V.A., Brain asymmetry (animal) // WIREs Cogn Sci. 2011. V. 2. № 2. P. 146–157.
- Vandreberg L.N. Laterality defects are influenced by timing of treatments and animal model // Differentiation. 2012. V. 83. № 1. P. 26–37.
- Vandenberg L.N., Lemire J.M., Levin M. Serotonin has early, cilia-independent roles in *Xenopus* left-right patterning // Disease Models & Mechanisms. 2013. V. 6. № 1. P. 261–268.
- Vandenberg L.N., Stevenson C., Levin M. Low Frequency Vibrations Induce Malformations in Two Aquatic Species in a Frequency-, Waveform-, and Direction-Specific Manner // PLoS ONE. 2012. V. 7. № 12. e51473.
- Wood C.O., Blalock A. *Situs inversus totalis* and disease of biliary tract: survey of literature and report case // Arch Surg. 1940. V. 40. № 5. P. 885–896.
- Yost H.J. Regulation of vertebrate left-right asymmetries by extracellular matrix // Nature. 1992. V. 357. № 6374. P. 158–161.
- Yu S., Guo H., Zhang W. et al. Orthotopic liver transplantation in *situs inversus* adult from an ABO-incompatible donor with *situs inversus* // Gastroenterology. 2014. V. 14. № 46. P. 1–4.

Artificial Inversion of the Left–Right Visceral Asymmetry in Vertebrates: Conceptual Approaches and Experimental Solutions

A. S. Trulev^{a, b}, E. B. Malashichev^{a, b}, and A. S. Ermakov^{a, b, c}

^a Faculty of Biology, St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

^b Institute of Experimental Medicine, ul. Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia

^c Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii pr. 4, St. Petersburg, 194064 Russia

e-mail: ermakov99@mail.ru

Received January 12, 2015; in final form, March 18, 2015

Externally, vertebrates are bilaterally symmetrical; however, left–right asymmetry is observed in the structure of their internal organs and systems of organs (circulatory, digestive, and respiratory). In addition to the asymmetry of internal organs (visceral), there is also functional (i.e., asymmetrical functioning of organs on the left and right sides of the body) and behavioral asymmetry. The question of a possible association between different types of asymmetry is still open. The study of the mechanisms of such association, in addition to the fundamental interest, has important applications for biomedicine, primarily for the understanding of the brain functioning in health and disease and for the development of methods of treatment of certain mental diseases, such as schizophrenia and autism, for which the disturbance of left–right asymmetry of the brain was shown. To study the deep association between different types of asymmetry, it is necessary to obtain adequate animal models (primarily animals with inverted visceral organs, *situs inversus totalis*). There are two main possible approaches to obtaining such model organisms: mutagenesis followed by selection of mutant strains with mutations in the genes that affect the formation of the left–right visceral asymmetry and experimental obtaining of animals with inverted internal organs. This review focuses on the second approach. We describe the theoretical models for establishing left–right asymmetry and possible experimental approaches to obtaining animals with inverted internal organs.

Keywords: embryology, morphogenesis, behavior, left–right asymmetry, embryonic development, neurobiology, vertebrates