

УДК 591.392

ИЗМЕНЧИВОСТЬ КОЛИЧЕСТВЕННО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ И ФОРМИРОВАНИЕ ДОРСОВЕНТРАЛЬНЫХ РАЗЛИЧИЙ В РАННЕМ МОРФОГЕНЕЗЕ ВЬЮНА, *MISSGURNUS FOSSILIS* L.

© 2016 г. В. Г. Черданцев, Е. Г. Корвин-Павловская

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет

119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

E-mail: vgcherdantsev@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.10.2014 г.

Окончательный вариант получен 25.03.2015 г.

Анализ нормальной изменчивости количественно-морфологических признаков в раннем эмбриогенезе вьюна на фиксированном материале и индивидуальных траекториях развития живых зародышей показывает, что дорсовентральная дифференцировка бластодермы проходит два этапа. Сначала, при инициации эпиболии, выделяются сагиттальный (короткий) и поперечный (длинный) меридианы бластодермы, и только затем, при образовании зародышевого кольца (ЗК), дифференцируются противоположные полюса сагиттального меридиана. Зародышевый щиток (ЗЩ) чаще всего закладывается в сегменте бластодермы с максимальным радиусом кривизны наружной границы и, соответственно, максимальной величиной активного натяжения поверхности раздела бластодермы с желточным синцитием (перибластом) и желтком. В этом случае конвергенция внутренних клеток к будущему дорсальному сегменту, ведущая к образованию ЗЩ, является механическим следствием анизотропии поверхностного натяжения. Нормальный ход эпиболии связан с периодическими изменениями кривизны наружной поверхности бластодермы, причем новые эмбриональные структуры — дорсальный сегмент, ЗК и ЗЩ — выделяются тогда, когда кривизна поверхности становится максимально однородной. Хотя у большинства зародышей ЗЩ закладывается внутри исходного дорсального сегмента, прослежены индивидуальные траектории развития, на которых ЗК начинает формироваться на дорсальном полюсе бластодермы, но ЗЩ образуется на ее противоположной стороне, в точке замыкания ЗК. В обоих случаях точкой инициации ЗК оказывается точка конвергенции потоков центробежной миграции клеток, возникающих в краевой зоне бластодермы при инициации, или же при замыкании ЗК.

Ключевые слова: морфогенез, дорсовентральная полярность, изменчивость, количественно-морфологические признаки, индивидуальные траектории развития, вьюн.

DOI: 10.7868/S047514501601002X

Хотя для зародышей костистых рыб, в частности, *zebrafish* и вьюна, давно были найдены морфологические критерии дорсовентральной (ДВ) асимметрии бластодермы на стадиях, предшествующих образованию зародышевого кольца (ЗК) и зародышевого щитка (ЗЩ) (Черданцева, Черданцев, 1985; Schmitz, Campos-Ortega, 1994; Неклюдова и др., 2003, 2007; Cherdantseva, Cherdantsev, 2006), это обстоятельство как-то упускается из вида в современных молекулярно-биологических работах. Даже зональность экспрессии генов *nodal*, самых ранних “мезодермальных” генов зародыша, начинают регистрировать не раньше образования ЗЩ, так как считается, что до появления ЗЩ нельзя узнать, какой из сегментов бластодермы является дорсальным сегментом, и существует ли вообще такой сегмент (Myers et al., 2002; Hong et al., 2010). По той же причине ради-

ально симметричной считается и запускающая экспрессию генов *nodal* экспрессия генов *gata*, *znf503* и других в краевой зоне перибласта (желточного синцития) (Chen, Kimelman, 2000; Hong et al., 2010), хотя различия в интенсивности окраски мРНК на противоположных полюсах краевого перибласта хорошо видны на оригинальных фотографиях.

Точно так же обстоит дело и с обнаруженной сравнительно недавно асимметрией распределения субкортикальных микротрубочек и связанной с ними мРНК *Wnt8* (а также мРНК гена *squint*) в желточной клетке (желточном мешке) у зародышей *zebrafish* во время первого деления дробления (Gore, Sampath, 2002; Gore et al., 2005; Tran et al., 2012). Нарушение радиальной симметрии состоит в повороте содержащей микротрубочки субкортикальной зоны вегетативного по-

люса желточной клетки относительно анимально-вегетативной оси яйца, как при образовании серого серпа у амфибий. Возникающая асимметрия считается ДВ асимметрией потому, что у 90% зародышей ЗЩ образуется в сегменте бластодермы, лежащем в том же секторе яйца, что и микро-трубочки (Gore, Sampath, 2002; Gore et al., 2005; Tran et al., 2012).

Аналогия с возникновением ДВ асимметрии у амфибий очевидна, но дело в том, что у амфибий сборка микро-трубочек и поворот субкортикального слоя вегетативного желтка связаны не только с перемещением в область серого серпа материнских мРНК (*Wnt* и *VegT*) и активацией β -катенина. Между сборкой микро-трубочек, ростом концентрации β -катенина и изменением формы желточного купола возникает положительная обратная связь, необходимая для выделения дорсального домена (зоны серого серпа) на макроскопическом уровне (Gerhart, 2001). После образования серого серпа яйцо амфибий перестает быть круглым из-за геометрических различий между его дорсальным и вентральным полушарием (Дорфман, Черданцев, 1977; Черданцев, 2003). У лягушки на стадии четырех или восьми бластомеров, когда форма наружной поверхности яйца ближе всего к сферической форме, угловой размер дорсального полушария достоверно меньше углового размера вентрального полушария (Скобеева, Черданцев, неопубликованные данные). Разделяющая эти полушария меридиональная борозда смещена к дорсальной стороне зародыша, что противоречит правилам Гертвига-Сакса, поскольку именно к дорсальной стороне смещен желток. Это можно объяснить только различиями в величине активного натяжения поверхности дорсального и вентрального полушария зародыша, которые, в свою очередь, являются одной из причин возникновения колбовидных клеток и начала гастрюляционных движений (Belousov, 2015).

Ситуацию же с формированием ДВ различий у эмбриогенезе костистых нельзя не считать парадоксальной. С одной стороны, подчеркивается принципиальное сходство генных каскадов, действующих на пути превращения радиально симметричного яйца в билатерально симметричную гастрюлу (Stern, 2006), с другой – может сложиться впечатление, что у костистых рыб, вплоть до появления ЗЩ, действие генов то ли вообще не связано с морфогенезом бластодермы, то ли отсутствует сам ее морфогенез. Дело, по-видимому, в том, что догастрюляционные ДВ различия могут иметь не материальную, а геометрическую природу, что отнюдь не лишает их морфогенетического значения, вплоть до участия в регуляции действия генов.

Геометрическая природа этих различий – естественное следствие однородности клеточного состава бластодермы костистых рыб, вытекающей из меробластического типа развития. Различия клеток с разным соотношением желтка и свободной цитоплазмы, такие, как у амфибий, у костистых рыб переходят в различия между собственно эмбриональными клетками бластодермы и экстраэмбриональными тканями (клеточной оболочкой зародыша и желточным синцитием), отчего как эмбриональная, так и экстраэмбриональная ткань сами по себе становятся более однородными.

Пространственная однородность не является кажущейся. Клетки бластодермы костистых рыб образуют эпителиальный пласт не раньше образования ЗК (Неклюдова и др., 2007), а до этой стадии внутренние (собственно эмбриональные) клетки активно и беспорядочно перемешиваются, меняясь своими соседями (Ballard, 1981; Trinkaus, 1993). Это, с одной стороны, подразумевает однородность и взаимозаменяемость клеток, а с другой – исключает возможность однозначной связи между клеткой, ее положением и судьбой (Kimmel et al., 1990; Melby et al., 1996). Однородность и “текучесть” состава эмбриональной ткани может означать, что у костистых рыб ДВ полярность бластодермы вообще отсутствует до оформления клеток в эпителиальный пласт и образования ЗК, или же она возникает на границе раздела бластодермы с желтком, т.е., в желточном синцитии (перибласте). Судя различию формы противоположных краев бластодермы, хорошо заметному у *zebrafish* и выюна на гистологических и оптических сагиттальных срезах уже перед началом эпителиации, активное натяжение поверхности раздела бластодермы с желтком выше в том сегменте бластодермы, в котором, при прочих равных условиях, закладывается и формируется ЗЩ (рис. 1). В условиях механического равновесия избыток активного натяжения данного участка поверхности должен уравниваться его упругим (пассивным) растяжением, что объясняет не только различия формы противоположных сегментов бластодермы, показанные на рис. 1, но и аккумуляцию эмбриональных клеток в краевой зоне дорсального сегмента, ведущую к образованию ЗЩ (Cherdantseva, Cherdantsev, 2006; Cherdantsev, Grigorieva, 2012). Различия формы противоположных краев бластодермы далеко не случайно напоминают различия между передним (лидирующим) и задним (“тянущим”) краем фибробласта, ползущего по субстрату (желточной клетке), где дорсальный край бластодермы является аналогом лидирующего края, а миграция клеток в краевую зону дорсального сегмента – аналогом экзоцитоза клеточной поверхности.

Задача этой работы – проследить, используя, прежде всего, данные цейтраферной кино съем-

ки, когда и как возникают описанные ДВ различия, и насколько устойчива их связь с локализацией ЗЩ, заполняя лауну, существующую в эмбриологии костистых рыб для периода между восстановлением радиальной симметрии яйца после первого деления дробления (Tran et al., 2012) и возникновением ЗЩ. Проблема состоит в том, что макроскопические различия, возникающие при взаимодействии активных и пассивных механических напряжений, крайне динамичны. Математическая модель (Белинцев, 1990; Cherdantsev, Grigorieva, 2012; Cherdantsev, 2014) допускает как осцилляции, т.е., чередование “дорсальной” и “вентральной” формы одного и того же края бластодермы, так и пространственную дифференцировку, когда различия краев бластодермы становятся стационарными и определяют направление и величину векторов коллективного движения клеток при формировании ЗК и ЗЩ. Можно ожидать, что связь между ДВ различиями до и после начала гаструляции не будет однозначной, а значит, необходимо исследовать нормальную изменчивость морфогенеза на количественно-морфологическом уровне. В этой работе выделены два качественно различных способа определения места формирования ЗЩ, по-разному связанных с ДВ различиями на предшествующих по времени стадиях и входящих, тем не менее, в спектр нормальной индивидуальной изменчивости развития.

Анализ изменчивости показывает, что во всей широте ее диапазона коллективные движения клеток зависят от макроскопических различий формы противоположных полюсов бластодермы, за исключением тех этапов морфогенеза, на которых эти различия временно утрачиваются. В этом случае они возникают заново на основе случайных флуктуаций и (или) молекулярно-генетических сигналов, сохраняя или не сохраняя преемственность с различиями на предыдущих стадиях развития. Как и у амфибий, положительная обратная связь между событиями на молекулярном и макроскопическом уровне является обязательной для продолжения нормального морфогенеза (ср. Belousov, 2015). Широко распространенное противопоставление консервативности молекулярно-генетических сигналов изменчивости формообразования на макроскопическом уровне по меньшей мере спорно. Морфогенетические различия в поведении дорсальной и вентральной половины зародыша у амфибий и костистых рыб повторяются, невзирая на различия в строении яйца и характере дробления, тогда как гены, выполняющие, по-видимому, сходные морфогенетические функции, не обязательно гомологичны и могут действовать на разных стадиях развития (Gerhart, 2001; Stern, 2006).

Из-за отсутствия молекулярных маркеров экспрессии генов в эмбриональных клетках бласто-

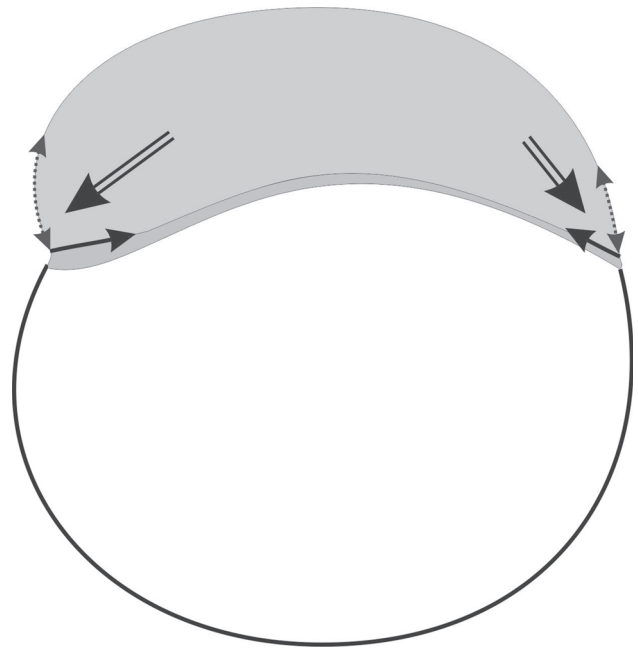


Рис. 1. Схематическое изображение сагиттального среза зародыша вьюна в начале эпиболии (Cherdantseva, Cherdantsev, 2006, с изменениями). Светлая заливка — бластодерма, темная заливка — желточный синцитий, дорсальная сторона слева. Сплошные стрелки — активное натяжение поверхности раздела бластодермы с желточным синцитием, пунктирные стрелки — пассивное растяжение поверхности бластодермы, двойные стрелки — векторы центробежной миграции внутренних клеток бластодермы.

дермы до возникновения ЗЩ, а также из-за необходимости исследовать количественными методами большой объем материала, в этой работе мы используем количественно-морфологические критерии ДВ различий, а чтобы быть уверенным в их надежности, прослеживаем — там, где это возможно — динамику количественно-морфологических характеристик на индивидуальных траекториях развития живых зародышей.

Преимущество вьюна перед *zebrafish* (недостатки же слишком общеизвестны, чтобы о них говорить) состоит не только в большом размере кладки, позволяющем исследовать масштабы и организацию нормальной изменчивости развития при минимальном вкладе генетической и средовой компонент, но, главным образом, в широте диапазона изменчивости, включающего вариации места и времени закладки ЗЩ (Неклюдова и др., 2007; Cherdantsev, 2014). При этом нужно учитывать, что набор признаков, которые можно измерить на поверхности живых зародышей в начале эпиболии (ст. 8, см. Костомарова, 1975), очень скуден, а измерения на оптических срезах невозможны из-за недостаточной прозрачности бластодермы. Для признаков, характеризующих внутреннее строение зародышей, приходится

ограничиваться изучением их изменчивости на фиксированном материале, что хотя и позволяет реконструировать ход морфогенеза (Черданцев, 2003), но не дает возможности проследить индивидуальные траектории развития. У вьюна внутреннюю структуру зародыша на оптическом срезе можно анализировать, начиная со ст. 9–10, когда из бластодермы образуется достаточно прозрачный эпителиальный пласт. Оценивать изменчивость внутренней структуры зародышей до и после ст. 9 приходится разными методами, но мы попытаемся показать, что различия в организации морфогенеза на дорсальной и вентральной стороне зародыша являются общими для предгастрюляционных и постгастрюляционных стадий. Поэтому, если говорить только о формировании ДВ различий, то выводы, сделанные на основании анализа фиксированного материала, можно, в принципе, экстраполировать на более поздние стадии развития, и наоборот.

В этой работе, помимо кладок, полученных от разных самок и оплодотворенных разными самцами, использованы фрагменты одной и той же кладки икры, оплодотворенных разными самцами, и кладки разных самок, оплодотворенные одним самцом. Сделано это для того, чтобы оценить соотношение внутригрупповой и межгрупповой компонент изменчивости, обусловленных разными факторами — зависящими (яйца разных кладок, оплодотворенные спермой одного самца) и не зависящими (яйца одной кладки, оплодотворенные спермой разных самцов) от размера яиц. Для краткости, в первом случае мы будем говорить о материнской, во втором — об отцовской компоненте межгрупповых различий, воздерживаясь от обсуждения сложного вопроса о соотношении генетических и негенетических факторов отцовского и материнского влияния.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Зрелые яйцеклетки вьюна, *Missgurnus fossilis* L., получали путем инъекции хорионического гонадотропина (Костомарова, 1975). Для изучения индивидуальных траекторий развития зародышей в желточных оболочках помещали в лунки, ориентировали анимальным полюсом вверх и фотографировали через каждые 20 мин, тщательно контролируя их ориентацию. После появления зародышевого щитка зародышей в лунках поворачивали “в профиль”, так чтобы плоскость оптического среза совпадала с сагиттальной плоскостью, и продолжали их фотографировать вплоть до ст. 12 (две трети эпиболии). Полученные изображения анализировали с помощью пакета программ AxioVision. Индивидуальные траектории были прослежены для 90 зародышей 11 разных кладок, так как при интервале регистрации в 20 мин серия последовательных наблюдений может

включать не более 9–10 зародышей: если их больше, то регистрацию их развития уже нельзя считать синхронной.

Для изучения изменчивости на фиксированном материале зародышей фиксировали на ст. 8–9 в 8% параформальдегиде на фосфатном буфере и изучали их строение на анатомических срезах, анализируя их изображения с помощью того же пакета программ. Схема измерения количественно-морфологических характеристик на поверхности и оптических сагиттальных срезах живых, а также сагиттальных анатомических срезах фиксированных зародышей представлены на рис. 2. На изображениях живых зародышей были измерены:

длина максимального сагиттального ($M1$) и максимального поперечного ($M2$) меридианов бластодермы живых зародышей (рис. 2а);

величина обрастания бластодермой желточной клетки (E , рис. 2б);

толщина дорсального (Td) и вентрального (Tv) края бластодермы в области точки перегиба кривизны внутренней поверхности бластодермы, а также толщина бластодермы в ее центральной зоне (Ta) (рис. 2б).

На анатомических сагиттальных срезах фиксированных зародышей на стадиях до формирования зародышевого кольца дополнительно измеряли величину обрастания бластодермой желтка (E), анимально-вегетативную высоту яйца (H), максимальный диаметр поверхности раздела бластодермы с желтком (D) и площадь контура наружной поверхности бластодермы (V/S), служащую мерой отношения объема бластодермы к площади ее поверхности (рис. 2в).

Угловые величины выражали в угловых градусах, а линейные величины и площадь — в условных единицах, равных 0.01 мм (0.01 мм²). Для статистической обработки материала использовали пакет программ STATISTICA 10.

Для оценки соотношения внутригрупповых и межгрупповых различий, обусловленных влиянием самца и самки, полученную икру разделяли на две порции, оплодотворяемые спермой разных самцов, а спермой одного самца оплодотворяли икру двух разных кладок. Этого достаточно для однофакторного дисперсионного анализа (фактор — самка или самец), а также для анализа иерархического комплекса (кладка 1 × самец 1) VS (кладка 1 × самец 2) и (кладка 2 × самец 1) VS (кладка 2 × самец 2), позволяющего рассчитать долю влияния самца и самки на измеренные количественные признаки. Каждая анализируемая группа состояла не меньше чем из 60 зародышей.

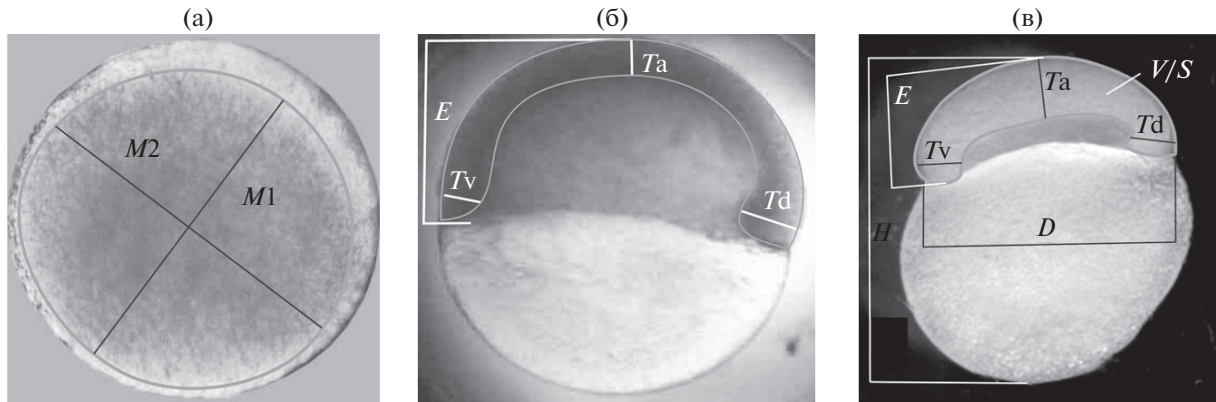


Рис. 2. Схема измерения количественных признаков у живых и фиксированных зародышей: а – общий вид бластодермы живых зародышей с анимального полюса (ст. 8), б – сагиттальный оптический срез (ст. 9), в – сагиттальный анатомический срез (ст. 8+). *M1* – сагиттальный, *M2* – поперечный меридиан бластодермы, *E* – степень эпиболии, *Td* – толщина дорсального, *Tv* – толщина вентрального края бластодермы, *Ta* – толщина бластодермы в центральной зоне; *H* – высота яйца, *D* – диаметр границы раздела бластодермы с желтком, *V/S* – площадь контура бластодермы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Неустойчивость изотропной формы бластодермы и осцилляции

С самого начала эпиболии (ст. 8) бластодерма имеет анизотропную форму, которая едва заметна на глаз, но становится очевидной при последовательном измерении длины меридианов *M1* и *M2* (см. рис. 2а) у живых зародышей, ориентированных анимальным полюсом вверх (рис. 3). Величина *M1* меньше величины *M2* во всех сериях измерений, так что наружный контур бластодермы представляет собой не окружность, а эллипс с небольшим, но статистически достоверным ($p < 0.05$) различием величин его длинной и короткой оси, за исключением точек, соответствующих сериям 4 и 9. У всех зародышей с прослеженными индивидуальными траекториями развития ЗЩ закладывался на одной из боковых сторон эллипса и никогда – на его полюсах, поэтому меридиан *M1* можно считать сагиттальным (долготным), а меридиан *M2* – широтным (поперечным) меридианом бластодермы.

Различие длины двух меридианов максимально в начале эпиболии (первое измерение, ст. 8), затем оно уменьшается, чтобы снова возрасти после выделения ЗЩ (десятая серия). В обоих случаях анизотропия достигает максимума при минимальной величине среднего радиуса окружности бластодермы, когда граница раздела бластодермы с желтком (желточным синцитием) имеет минимальный периметр и максимальную кривизну.

Минимумы величины среднего радиуса чередуются с максимумами, в которых различия длины меридианов *M1* и *M2* становятся статистически недостоверными (точки 4 и 9 на рис. 3), т.е., форма бластодермы становится практически изотропной. Статистически достоверные различия

между соседними точками самих кривых *M1* и *M2* при этом отсутствуют, из чего следует, что периодическим изменениям подлежит именно степень анизотропии наружного контура бластодермы, а не отдельные характеристики. Чередование максимумов и минимумов означает, что изотропная и анизотропная форма являются фрагментами единого колебательного цикла, но устойчивость анизотропной формы как возможного стационарного состояния гораздо выше – это очевидно, если сравнить общую продолжительность существования анизотропной и изотропной формы на рис. 3.

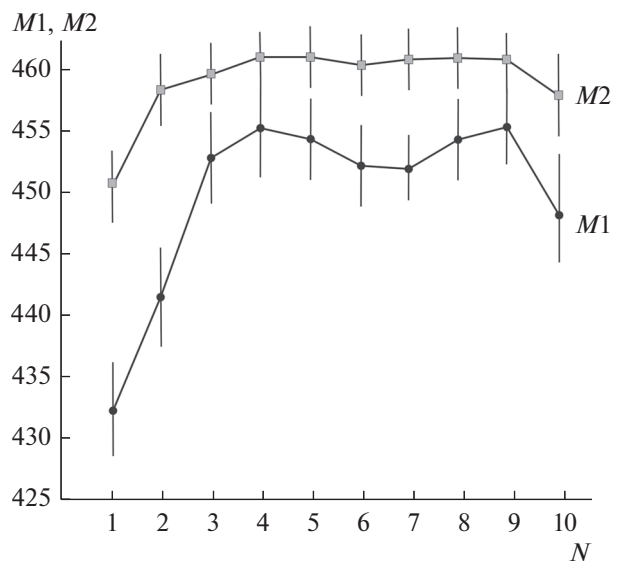


Рис. 3. Зависимость величины сагиттального и поперечного меридиана бластодермы (*M1* и *M2*, ордината) от номера измерения (*N*, абсцисса) в последовательных сериях измерения живых зародышей от начала эпиболии (серия 1) до появления ЗЩ (серия 10).

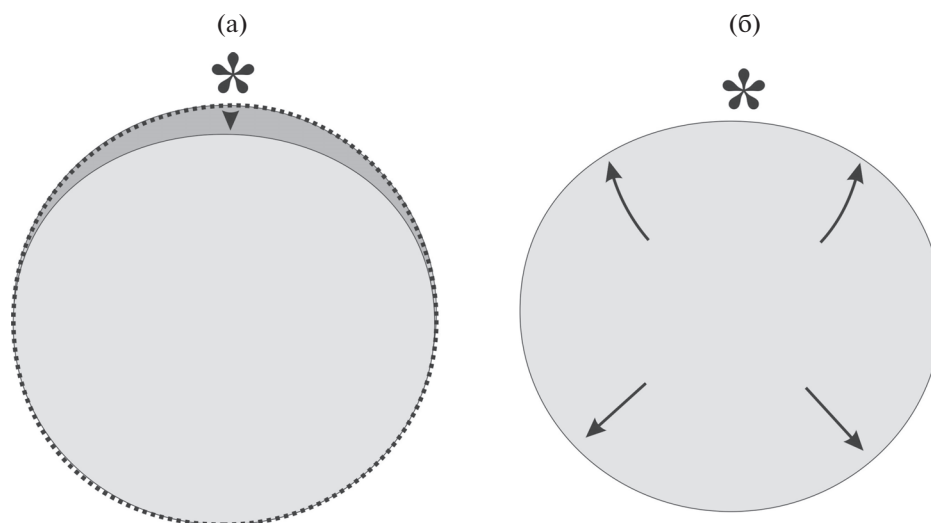


Рис. 4. Осцилляции формы наружного контура бластодермы (вид сверху) при уменьшении (а) и увеличении (б) ее периметра: светлая заливка — бластодерма, пунктир — исходный контур ее окружности, темная заливка — обнажающийся краевой перибласт. Звездочка — зона роста активного натяжения поверхности, наконечник — сокращение наружной поверхности; стрелки — центробежные потоки внутренних клеток бластодермы, остальные пояснения в тексте.

В фазах максимальной сокращения (максимальной кривизны) окружности бластодермы к ее анизотропии добавляются четко выраженные морфологические различия между противоположными сторонами эллипса. В начале эпиболии на одной из этих сторон кривизна окружности бластодермы становится еще меньше — край бластодермы оттягивается “назад”, в направлении, противоположном направлению эпиболии, обнажая краевой перибласт (желточный синцитий), а с противоположной стороны кривизна возрастает, практически выравняваясь с кривизной полюсов эллипса (рис. 4а, ср. с рис. 2а). На рис. 3 видно, что это происходит прежде всего из-за полярного (одностороннего) сокращения сагиттального меридиана бластодермы $M1$ при сравнительно небольшом вкладе неполярного сокращения меридиана $M2$. Таким образом, бластодерма приобретает билатерально симметричную форму благодаря анизотропии, т.е., превращению окружности в эллипс, который становится билатерально симметричным при возникновении между его противоположными сторонами таких же различий, как между боковой стороной и полюсом эллипса. С физической точки зрения переход к билатеральной симметрии означает рост величины активного натяжения окружности бластодермы в одном из ее секторов, скорее всего из-за роста контрактильной активности краевого перибласта (Черданцева, Черданцев, 1985).

Ключом к пониманию геометрических и, как следствие, механических причин усложнения формы может служить тот факт, что анизотропия и билатеральная симметрия возникают при уве-

личении кривизны (уменьшении радиуса) окружности бластодермы. Эту окружность можно рассматривать как активную оболочку, в которой действуют силы активного натяжения ее поверхности, но которая, в то же время, может пассивно растягиваться под действием сил внутреннего давления (Cherdantsev, Grigorieva, 2012; Cherdantsev, 2014). Принципиальной особенностью активных оболочек является неустойчивость круговой симметрии (изотропии), так как при увеличении средней кривизны (сжатии) оболочки между активным сокращением и пассивным растяжением ее поверхности возникает положительная связь, способствующая “выдавливанию” из оболочки ее фрагментов, т.е., дифференцировке ее кривизны (подробнее см. Cherdantsev, 2014). Разделение окружности бластодермы на участки с разной кривизной (полюса и боковые стороны эллипса) увеличивает отношение периметра бластодермы к ее площади, а значит — сопротивление давлению, которое внутренние клетки бластодермы оказывают на ее внешнюю границу (полюса эллипса действуют как геометрические ребра жесткости оболочки).

Различия в кривизне противоположных сторон эллипса, благодаря которым бластодерма становится билатерально симметричной, возникают по той же причине. Активное натяжение выше на менее искривленной, а пассивное растяжение — на более искривленной поверхности, что усиливает активное сопротивление оболочки ее пассивному растяжению (см. рис. 4а). С возникновением центробежных потоков клеток, растягивающих бластодерму, различия в кривизне

оболочки нивелируются, но ее выравнивание неизбежно ведет к утрате круговой симметрии в распределении клеток краевой зоны бластодермы (рис. 4б). Искривление траекторий движения клеток (клеточных потоков), показанное на рис. 4б, возникает из-за того, что исходно менее искривленная поверхность легче поддается пассивному растяжению, что должно уравниваться стягиванием клеток в эту область, т.е., конвергенцией траекторий их центробежного движения.

Асимметрия кривизны, максимальная в самом начале эпиболии, уменьшается по мере разделения бластодермы на центральную (3–4 слоя клеток) и краевую (5–6 слоев клеток) зону (точки 3–9 на эмпирической кривой $M1$ на рис. 3). Она возрастает после образования ЗЩ, когда средний радиус окружности бластодермы снова уменьшается (точка 10 на рис. 3), а толщина краевой зоны начинает уменьшаться из-за радиальной интеркаляции клеток. Интеркаляция, возникающая в ответ на падение активного натяжения границы раздела бластодермы с желтком, начинается раньше и идет быстрее у вентрального полюса, а на противоположном (дорсальном) полюсе, где закладывается ЗЩ, краевая зона бластодермы оттягивается назад и обнажает краевой перибласт совершенно так же, как в одном из секторов бластодермы в начале эпиболии (Неклюдова и др., 1999, 2007). Таким образом, формирование ЗЩ завершает морфогенетический цикл, возвращая окружность бластодермы к максимальной разности натяжения ее противоположных сторон, такой, как в начале эпиболии.

Изменчивость индивидуальных траекторий развития в процессе формирования ДВ полярности

Второй максимум асимметрии определяет место формирования ЗЩ. Можно предположить, что дифференцировка кривизны окружности бластодермы в начале эпиболии также является ДВ дифференцировкой, но дело оказывается сложнее и интереснее.

Проследивая развитие индивидуальных зародышей со стандартной (анимальным полюсом вверх) тщательно контролируемой ориентацией и четко выраженной начальной асимметрией полюсов бластодермы можно измерить, с точностью до 45° , угловое расстояние между предполагаемым исходным положением дорсального полюса и местом закладки ЗЩ. Частотное распределение величины этого расстояния имеет две моды — основную, когда ЗЩ закладывается как раз у того края бластодермы, который оттягивался назад в начале эпиболии, и дополнительную, когда он закладывается на максимальном расстоянии от этого края (рис. 5).

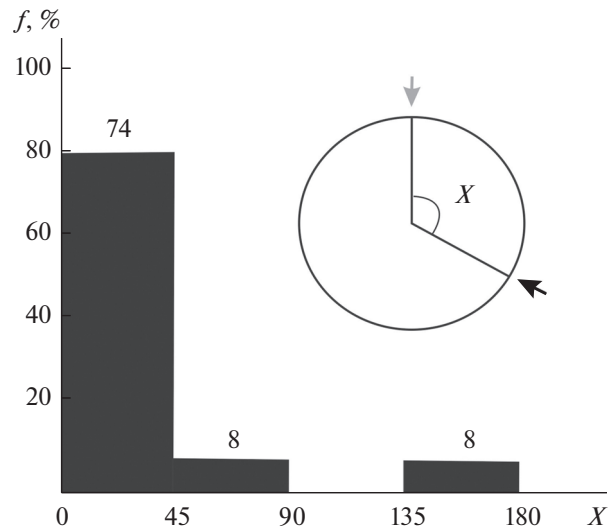


Рис. 5. Распределение частот (f , ордината) величин углового расстояния (X , абсцисса) между зоной сокращения периметра бластодермы в начале эпиболии (серая стрелка) и зоной, где образуется ЗЩ (черная стрелка). Цифры над колонками гистограммы — число зародышей.

В обоих случаях первоначальная дифференцировка кривизны окружности бластодермы является фактором ДВ дифференцировки. При основной моде детерминации ДВ различий (рис. 6) уменьшение локальной кривизны (рис. 6.1, наконецник), а значит, рост активного натяжения наружной границы данного сегмента бластодермы в начале эпиболии уравнивается стягиванием клеток бластодермы к этой границе. Рост локальной концентрации клеток у края бластодермы вызывает образование зачатка ЗК (звездочка на рис. 6.5, 6.6 и 6.9), который, по мере распространения ЗК вдоль краевой зоны бластодермы (пунктирные стрелки на рис. 6.9), становится центром конвергенции клеточных потоков (стрелки на рис. 6.10), формирующих ЗЩ.

При дополнительной моде (рис. 7) вначале все происходит точно так же (рис. 7.1–7.6), но исходный зачаток ЗК “расплывается” по мере распространения ЗК на противоположную сторону бластодермы, что хорошо видно, если сравнить область разрыва пунктирных стрелок на рис. 6.9 и 7.8. В результате, локальная концентрация клеток краевой зоны оказывается максимальной не в области закладки, а в области замыкания ЗК (см. рис. 7.8), которая и становится центром конвергенции клеточных потоков, а значит, местом формирования ЗЩ (рис. 7.9).

С точки зрения геометрии клеточных движений механизм возникновения ЗЩ на двух противоположных полюсах бластодермы совершенно одинаков. Становится понятным, почему в опытах с культивированием изолированных фраг-

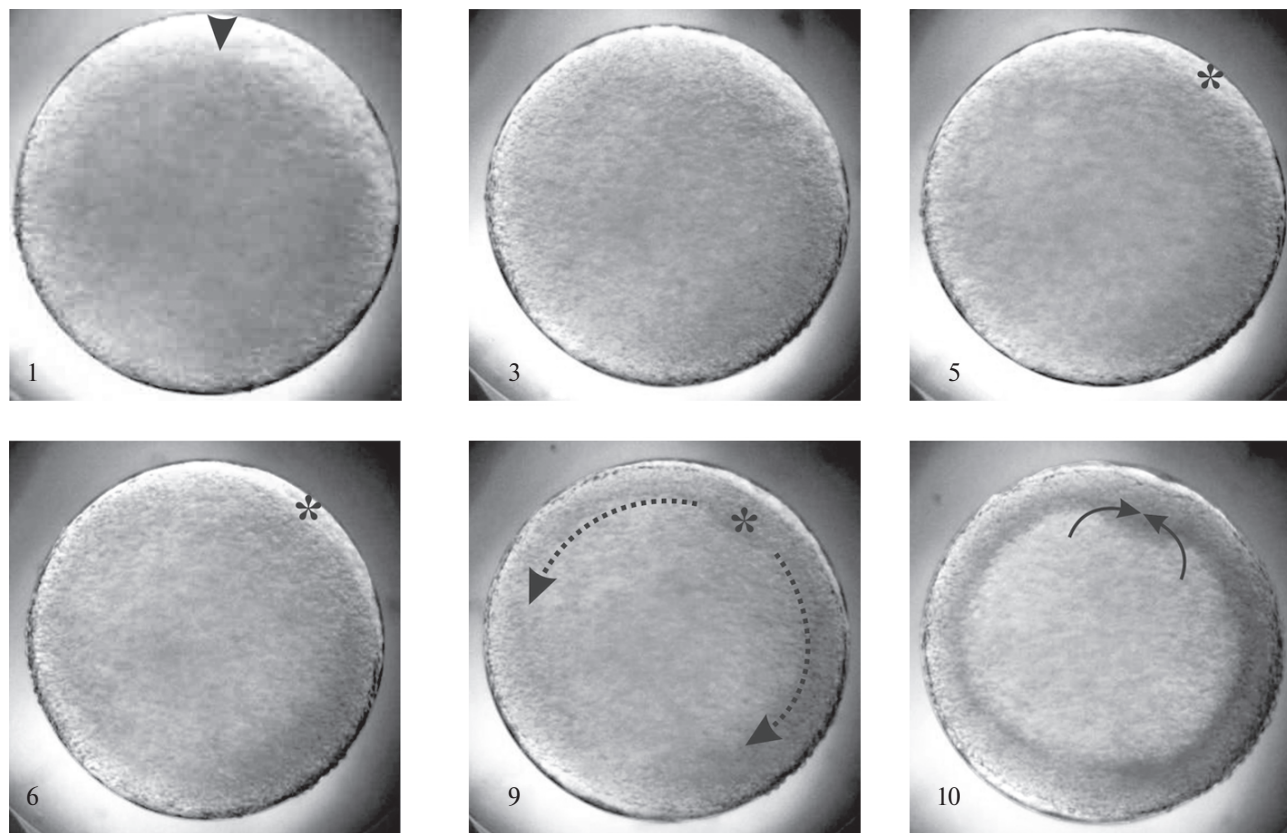


Рис. 6. Этапы формирования ДВ полярности при образовании ЗЩ в зоне сокращения периметра бластодермы в начале эпиболлии. Цифры – номера последовательных измерений одного зародыша, ориентированного анимальным полюсом вверх: наконечник – сокращение периметра бластодермы с обнажением краевого перибласта, звездочка – начало очерчивания внутренней границы ЗК, пунктирные стрелки – латеральное распространение этой границы, сплошные стрелки – конвергенция клеточных потоков, формирующих ЗЩ.

ментов бластодермы на стадии замыкания ЗК осевые структуры дифференцируются с максимальной и равной частотой из дорсальных и вентральных фрагментов (Неклюдова и др., 1999, 2007). В опытах с удалением цитоплазмы краевых blastomeres у зародышей вьюна ЗЩ обычно закладывается на оперированной стороне бластодермы, у края, к которому в процессе заживления раны стягивается формирующийся краевой перибласт, и где, следовательно, растет поверхностное натяжение границы раздела бластодермы с желтком (Ивашкин, Черданцев, 2012). Величина активного натяжения этой границы растет как при инициации, так и при замыкании ЗК, чем, очевидно, и объясняется конкуренция этих участков за образование ЗЩ.

Эволюция онтогенеза обычно ведет к фиксации детерминированной последовательности стадий развития (Cherdantsev, 2014), такой, как на рис. 6, и из-за этого кажется, что и само развитие без нее невозможно. В действительности это не так, что доказывается существованием дополнительной моды детерминации ДВ оси (см. рис. 7),

возникающей из-за неустойчивости (или метастабильности, см. Белинцев, 1990) изотропной формы, когда причиной возникновения ДВ асимметрии являются случайные флуктуации плотности расположения клеток. Флуктуации, ведущие к росту локальной концентрации клеток и способствующие возникновению ЗЩ на необычном месте, наиболее вероятны в области замыкания ЗК, но вероятность, что при этом возникнет ЗЩ, находится в обратной зависимости от интенсивности стягивания клеток к противоположному краю бластодермы, с которого образование ЗК начиналось.

До образования ЗК величина максимального диаметра бластодермы не возрастает, и то, что кажется обрастанием желтка, является результатом выпячивания поверхности раздела бластодермы с желтком (перибласта), уменьшающей величину своего активного натяжения и, соответственно, увеличивающей свою площадь и кривизну вместе с площадью и кривизной самой бластодермы. Основной, и по сути единственной активной компонентой коллективного движения клеток является

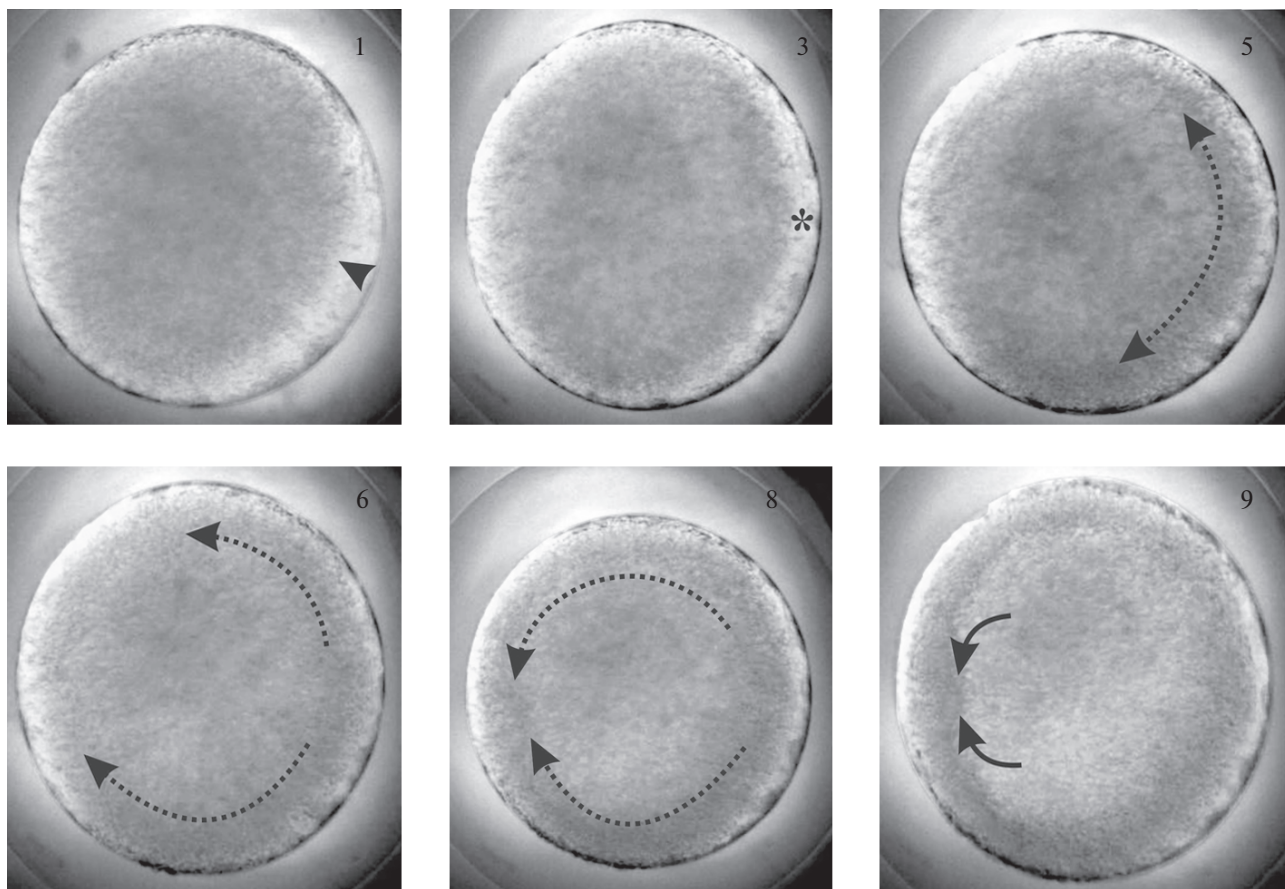


Рис. 7. Этапы формирования ДВ полярности при образовании ЗЩ напротив места сокращения периметра бластодермы в начале эпиболии. Обозначения те же, что на рис. 6.

радиальная интеркаляция, ведущая к уменьшению числа клеточных слоев бластодермы и, соответственно, увеличению ее площади при неподвижности ее краевых точек (Warga, Kimmel, 1990; Неклюдова и др., 2007). После образования ЗК эпиболия становится одной из компонент основного гастрюляционного движения, включающего, помимо интеркаляции, активное движение края ЗК по поверхности желтка (увеличение диаметра бластодермы), центробежные потоки клеток в направлении ЗК и конвергентные потоки, направленные в зону формирования ЗЩ (Ballard, 1981; Черданцев, Цветкова, 2005; Cherdantseva, Cherdantsev, 2006).

Описанная выше изменчивость процесса формирования ДВ полярности – частный случай изменчивости индивидуальных траекторий развития. Для их изучения достаточно вычислить коэффициенты статистической корреляции между значениями признаков в сериях последовательных измерений индивидуальных зародышей (Cherdantsev, Scobeyeva, 2012). Анализируя индивидуальные траектории, мы имеем право объеди-

нить зародышей разных кладок, так как в данном случае нас интересует общая организация изменчивости в последовательных сериях измерения признаков. Критерием устойчивости индивидуальных траекторий можно считать величину коэффициентов положительной корреляции между сериями, а отсутствие (статистическая недостоверность) корреляции означает, что любая индивидуальная траектория развития неустойчива, т.е., что этих траекторий просто нет.

До появления ЗЩ прижизненно можно измерить только сагиттальный ($M1$) и поперечный ($M2$) меридианы бластодермы. Корреляции между последовательными сериями измерения сагиттального меридиана представлены на рис. 8а в виде корреляционного графа, включающего только статистически достоверные корреляции при $p < 0.05$. Чтобы сделать его менее громоздким, мы сократили число последовательных серий вдвое, учитывая только нечетные номера, с первого по девятый. Число и величина положительных корреляций возрастают с номером серии, что означает постепенную стабилизацию траекторий разви-

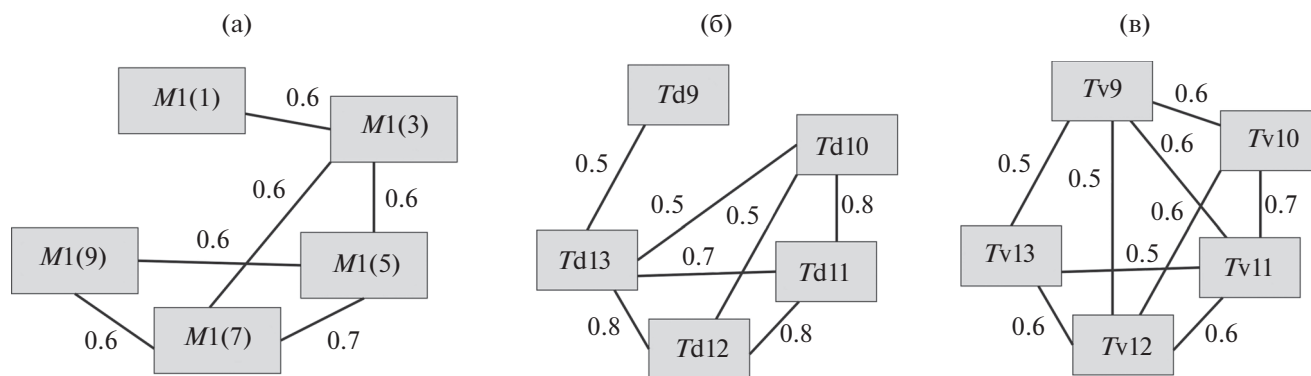


Рис. 8. Графы корреляций в последовательных сериях измерений признаков (обозначения признаков см. на рис. 1, цифры – номера серий измерений) индивидуальных зародышей: а – от начала эпиболии до появления ЗЩ, б и в – от появления ЗЩ до двух третей эпиболии. Учтены только статистически достоверные (при $p < 0.001$) корреляции.

тия. Факторный анализ серий, образующих граф, выделяет два фактора, в один из которых с высокими факторными нагрузками входят серии 1–3, а в другой – остальные серии (данные не приведены). Из этого следует, что индивидуальные траектории развития стабилизируются с упрощением формы бластодермы, и чем слабее переходы между радиально симметричной и билатерально симметричной формой (серии 4–9, см. рис. 3), тем выше устойчивость траекторий.

После появления зачатка ЗЩ появляется возможность проследить индивидуальные траектории изменения признаков на оптических сагиттальных срезах. На рис. 8б, 8в показаны корреляционные графы признаков Td и Tv , характеризующих максимальную толщину бластодермы в области ЗЩ и в области ЗК на противоположном (вентральном) полюсе (см. рис. 2). Во время гаструляции форма изменяется быстрее и заметнее, чем на догастрляционных стадиях, поэтому в корреляционные графы включены все последовательные серии измерений, от серии 9 до серии 13 (две трети эпиболии).

В начальной серии – серии 9, в которой начинает формироваться ЗЩ – толщина дорсального

края бластодермы выпадает из общей системы корреляций точно так же, как в начале эпиболии выпадали из нее первые серии измерений сагиттального меридиана бластодермы. Для всех серий факторный анализ выделяет всего один фактор, где статистически недостоверна только факторная нагрузка серии 9 (табл. 1). Это вполне соответствует визуальное впечатление, что форма ЗЩ во время его закладки варьирует независимо от остальных морфологических характеристик. Иначе обстоит дело с вентральным краем: его толщина в серии 9 не выпадает из корреляционного графа, а при факторном анализе в единственный выделенный фактор входят все серии с факторной нагрузкой, близкой к единице (см. табл. 1). Для признака E , характеризующего степень эпиболии (см. рис. 1), корреляционный граф устроен практически так же, как для толщины вентрального края бластодермы.

Формирование ЗЩ (серии 9–10) связано с резким статистически достоверным скачком в толщине дорсального края бластодермы, менее заметным (на грани статистической достоверности) на вентральной стороне ЗК (рис. 9). С точки зрения формирования ДВ различий, повторяется картина, наблюдавшаяся в начале эпиболии, с той лишь разницей, что все события происходят в пределах ЗК. На дорсальной стороне между вовлечением клеток в состав ЗК, ведущим к утолщению этой зоны, и эпиболией, ведущей к уменьшению ее толщины из-за ее растяжения при обрастании клетками желтка, отсутствует динамическое равновесие – сначала вовлечение клеток опережает эпиболию, а потом наоборот. На дорсальной стороне эпиблия не может продолжаться иначе, как через “проталкивание” клеток ЗЩ в более глубокие слои бластодермы (Wagga, Kimmel, 1990), из чего следует, что формирование осевой мезодермы – прямое следствие организации морфогенеза. На вентральной сто-

Таблица 1. Факторный анализ признаков Td и Tv в последовательных сериях прижизненных измерений

Факторные нагрузки Td (один фактор)	Факторные нагрузки Tv (один фактор)
$Td9$ 0.4	$Tv9$ 0.7
$Td10$ 0.8	$Tv10$ 0.9
$Td11$ 0.9	$Tv11$ 0.9
$Td12$ 0.9	$Tv12$ 0.9
$Td13$ 0.9	$Tv13$ 0.9

Примечание. Статистически достоверные факторные нагрузки выделены жирным шрифтом, для обоих признаков изменчивость всех серий укладывается в один фактор.

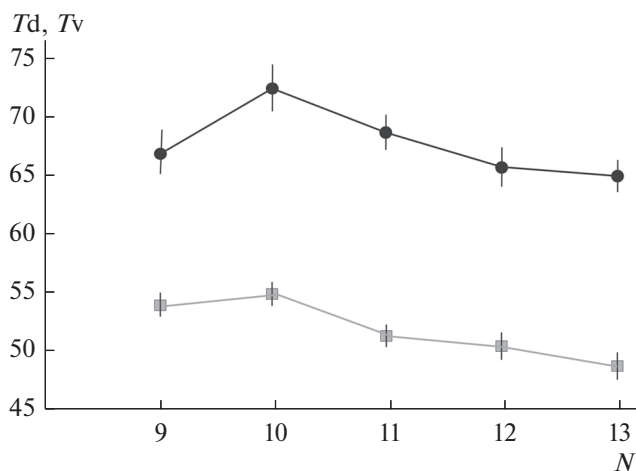


Рис. 9. Зависимость толщины дорсального (T_d , черные окружности) и вентрального (T_v , серые прямоугольники) от номера измерения (N , абсцисса) в последовательных сериях измерения живых зародышей от появления ЗЩ (серия 9) до двух третей эпиболии (серия 13).

роне оба процесса находятся в относительном равновесии – поэтому там не образуется осевой мезодермы – а уменьшение толщины ЗК после того, как окружность бластодермы проходит экватор яйца, связано с движением клеток вентрального сектора ЗК в сторону дорсального сектора (подробнее см. Cherdantsev, 2014).

Факторный анализ признаков T_d , T_v , E и T_a (толщина бластодермы за пределами ЗК) в сериях 9 и 10 дает картину, представленную в табл. 2. Морфогенетическая интерпретация двух выделенных факторов очевидна – положительная связь признаков T_d и T_v (фактор I) означает аккумуляцию клеток в области ЗК, а отрицательная связь признаков T_a и E (фактор II) – эпиболию, идущую за счет радиальной интеркаляции клеток “крыши” бластодермы. ДВ различия не видны на фоне общего для всех секторов бластодермы накопления клеток в составе ЗК, но в следующих сериях, начиная с серии 12, когда окружность бластодермы окончательно проходит экватор яйца и ее диа-

метр начинает уменьшаться, качественные различия дорсальной и вентральной эпиболии становятся очевидными (см. табл. 2). На дорсальной стороне (фактор I) темп лимитирующим звеном эпиболии является толщина дорсального края бластодермы (отрицательная связь между признаками T_d и E), а на вентральной стороне (фактор II) – толщина “крыши” (центральной зоны) бластодермы (отрицательная связь между признаками T_v и A). Другими словами, на дорсальной стороне эпиболия лимитируется избытком, а на вентральной стороне – недостатком концентрации клеток краевой зоны бластодермы. Значит, для того чтобы скорость эпиболии во всех секторах бластодермы была одинаковой, дорсальная эпиболия должна быть связана с усложнением формы ЗК (увеличением отношения поверхности к объему), совершенно так же, как это происходило в начале эпиболии с одним из секторов бластодермы, который чаще всего становился дорсальным сектором. Образование ЗЩ оказывается процессом, полностью гомологичным процессу дифференцировки меридианов бластодермы задолго до начала гастрюляции, несмотря на то, что причинная связь между этими процессами не обязательна.

В случае, когда она отсутствовала, т.е. у зародышей дополнительной моды распределения, показанного на рис. 5, в сериях 9–10 (начало формирования ЗЩ) величина T_d была достоверно меньше, величина E – достоверно больше ($p < 0.05$), чем у зародышей основной моды, при минимальном различии величин T_d и T_v . Изменчивость гастрюляции устроена таким образом, что зародышам приходится выбирать между ускорением эпиболии ценой задержки развития ЗЩ, или ускорением развития ЗЩ ценой замедления эпиболии: в первом случае образование ЗЩ начинается до, а во втором – после прохождения окружности бластодермы экваториальной плоскости. С точки зрения механики активных оболочек, утолщение края окружности бластодермы, расположенной над экватором, и увеличение ее кривизны (уменьшение диаметра) после прохождения экватора вызывает один и тот же эффект.

Таблица 2. Факторные нагрузки признаков, характеризующих динамику эпиболии в последовательных сериях прижизненных измерений 9–10 и 12–13

Признак	Фактор I (серии 9–10)	Фактор II (серии 9–10)	Фактор I (серии 12–13)	Фактор II (серии 12–13)
T_d	0.9	0.0	–0.1	0.9
T_v	0.9	0.0	0.8	0.2
T_a	0.0	0.8	0.9	0.0
E	0.1	–0.8	–0.2	–0.8

Примечание. Статистически достоверные факторные нагрузки выделены жирным шрифтом, в сериях 9–10 граница бластодермы на уровне экватора яйца, в сериях 12–13 – достоверно ниже экватора.

Из-за роста локальной концентрации (плотности расположения) клеток внутри краевой зоны возрастают силы латерального давления, и энергетически выходной (уменьшающей отношение объема краевой зоны к площади ее поверхности) становится дифференцировка кривизны окружности бластодермы. Канализация изменчивости, т.е., существование как минимум двух альтернативных и эквивифинальных способов развития ЗЩ — до и после прохождения экватора — оказывается неизбежным следствием самого механизма эпиболии. Развитие ЗЩ до прохождения экватора возможно лишь при сильном различии толщины ЗК на противоположных полюсах бластодермы, а после экватора его причиной является потеря устойчивости радиальной симметрии, и теоретически ЗЩ может развиваться даже при отсутствии исходных ДВ различий в толщине ЗК, т.е., без всякой связи с предшествующими по времени стадиями (Cherdantseva, Cherdantsev, 2006; Cherdantsev, 2014). Изменчивость процесса формирования ЗЩ в точности повторяет изменчивость способов ДВ разметки бластодермы до образования ЗК.

Взаимодействие активных и пассивных механических напряжений при формировании ДВ различий на догастрюляционных стадиях развития

На фиксированном материале изменчивость изучали на стадии 8+, соответствующей третьей–пятой сериям прижизненных наблюдений. Учитывая существование двух разных мод детерминации ДВ различий, определение дорсального и вентрального полюсов было, до известной степени, условным: утолщенный край бластодермы с большей величиной краевого угла между наружной и внутренней поверхностью считался дорсальным краем. Площадь V/S , измеренная с помощью программы AxioVision, является мерой отношения объема бластодермы к площади ее поверхности, включая поверхность ее раздела с желтком: при неподвижности краевых точек эта величина максимальна при нулевой кривизне

этой поверхности и уменьшается по мере ее выпячивания в сторону бластодермы.

Результаты факторного анализа признаков, показанных на рис. 2в (за исключением признака H), в объединенной выборке из 11 кладок икры, оплодотворенной разными самцами (неконтролируемое оплодотворение), представлены в табл. 3 (общая группа). Толщина дорсального (Td) и вентрального (Tv) края бластодермы, а также толщина центральной зоны (Ta) являются компонентами одного и того же вектора изменчивости (фактор I). Очевидно, что это компоненты процесса радиальной интеркаляции, ведущего при нормальном ходе развития к уменьшению толщины бластодермы и отношения ее объема к площади ее поверхности. Таким образом, в ходе радиальной интеркаляции возникают активные силы латерального давления, не просто увеличивающие площадь бластодермы, но и изгибающие формирующийся эпителиальный пласт, увеличивая его кривизну — из-за этого и возникает, при наблюдении *in vivo*, иллюзия обрастания желтка. Величины D и E являются компонентами второго вектора изменчивости (фактор II), и их совместный рост отражает пассивное растяжение поверхности бластодермы под действием самих клеток бластодермы, движущихся в сторону наружной поверхности и растягивающих ее. Рост диаметра поверхности раздела бластодерма/желток (D) и “натягивание” бластодермы на желток (рост величины E) — это, очевидно, пассивная (упругая) реакция поверхности бластодермы на внутреннее давление, создаваемое той же радиальной интеркаляцией.

Единственным отличием от взаимодействий, вытекающих из факторного анализа изменчивости более поздних стадий развития (см. табл. 2) является разделение между разными факторами вклада величин Td , Tv (фактор I) и Ta (фактор II). Такое разделение является естественным следствием образования ЗК и концентрации морфогенеза именно в этой зоне. В табл. 3 представлены также результаты факторного анализа тех же признаков в выборочной группе зародышей, у которых величина V/S меньше ее среднего значения

Таблица 3. Факторные нагрузки признаков в общей группе зародышей, фиксированных в начале эпиболии, и в выборке зародышей с величиной отношения объема к площади поверхности бластодермы (V/S), меньшей группового среднего ($V/S < M$)

Признак	Фактор I (общая группа)	Фактор II (общая группа)	Фактор I ($V/S < M$)	Фактор II ($V/S < M$)
Td	0.8	−0.1	0.8	0.4
Tv	0.9	0.5	0.8	−0.1
Ta	0.7	0.1	0.2	0.7
E	0.1	0.7	−0.2	−0.8
D	0.1	0.7	−0.2	−0.8

Примечание. Статистически достоверные факторные нагрузки выделены жирным шрифтом.

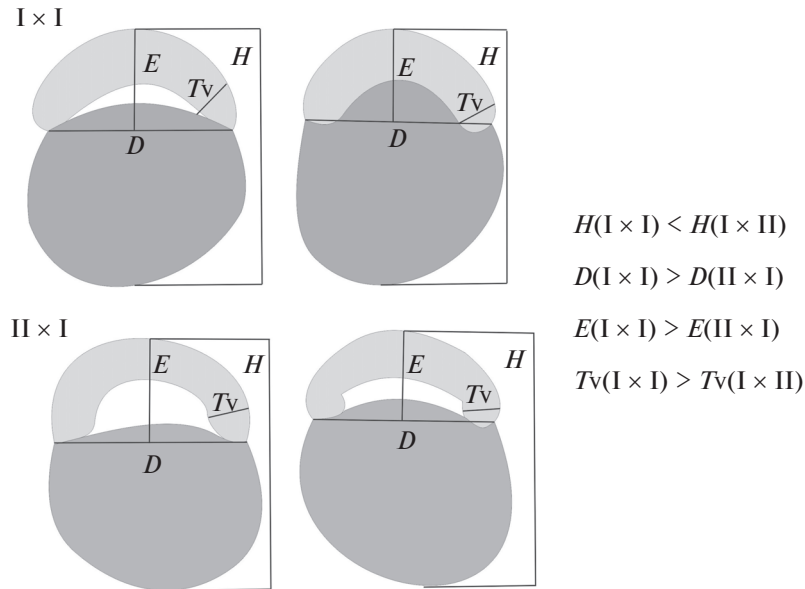


Рис. 10. Материнский эффект в контролируемом скрещивании: яйца кладок I и II, оплодотворенные спермой самца I. Для каждой группы (I × I и II × I) представлены два контрастных индивидуальных варианта строения зародыша на сагиттальном анатомическом срезе (ст. 8+). В правой половине рисунка представлены статистически достоверные (при $p < 0.05$) различия количественно-морфологических характеристик.

этой величины ($V/S < 102$). В данном случае мы используем величину V/S как параметр, позволяющий выделить группу зародышей с более высоким отношением площади blastодермы к ее объему и, соответственно, большей величиной вклада в морфогенез активного роста поверхности за счет интеркаляции клеток. Картина получается в принципе такая же, как после образования ЗК (см. табл. 3).

Таким образом, при нормальном ходе эпиболии чередуются формы с высоким и низким отношением площади blastодермы к ее объему, причем формы с высокой величиной этого отношения пространственно неоднородны, что подразумевает дифференцировку blastодермы на центральную и краевую зону, а также ДВ дифференцировку самой краевой зоны. Сдвиг изменчивости в сторону форм с высоким отношением площади к объему говорит об увеличении вклада активных напряжений, вызываемых силами латерального давления, и наоборот, при уменьшении их вклада должна возрастать доля пространственно однородных форм.

Именно такого рода сдвиги происходили в опытах с контролируемым скрещиванием, т.е., у зародышей разных кладок, оплодотворенных спермой одного самца (материнский эффект), или у зародышей одной кладки, оплодотворенной спермой разных самцов (отцовский эффект). Типичный пример четко выраженного материнского эффекта представлен на рис. 10, где отмечены

признаки, значения которых достоверно различались при $p < 0.05$.

Различия величин H , E и D отражают размерные различия яиц двух кладок. В более мелких яйцах (кладка I) относительно больше свободной от желтка цитоплазмы (Корвин-Павловская и др., 1996), поэтому еще до начала эпиболии диаметр поверхности раздела blastодермы с желтком (D) должен быть больше. Соответственно, возрастает вклад в эпиболию радиальной интеркаляции клеток, т.е., в яйцах с относительно меньшим объемом blastодермы поверхность ее раздела с желтком должна сильнее выпячиваться, приводя к росту величины E . Что же касается величины V/S , то отсутствие для нее различий между кладками I и II тоже объяснимо: при большем относительном объеме blastодермы поверхность ее раздела с желтком выпячивается сильнее, что, в частности, ведет к существенному увеличению размера blastоцеля (см. рис. 10). Связь материнского эффекта с размером яиц подтверждается тем, что описанные различия воспроизводятся в опытах с частичным удалением желтка, ведущих к увеличению, и опытах с удалением цитоплазмы blastомеров, ведущих к уменьшению относительного объема blastодермы (Корвин-Павловская и др., 1996; Ивашкин, Черданцев, 2012).

Уменьшение толщины вентрального края blastодермы тоже является очевидным следствием уменьшения относительного объема blastодермы, т.е., большей степенью ее пассивного растяжения, но замечательно, что это не касается тол-

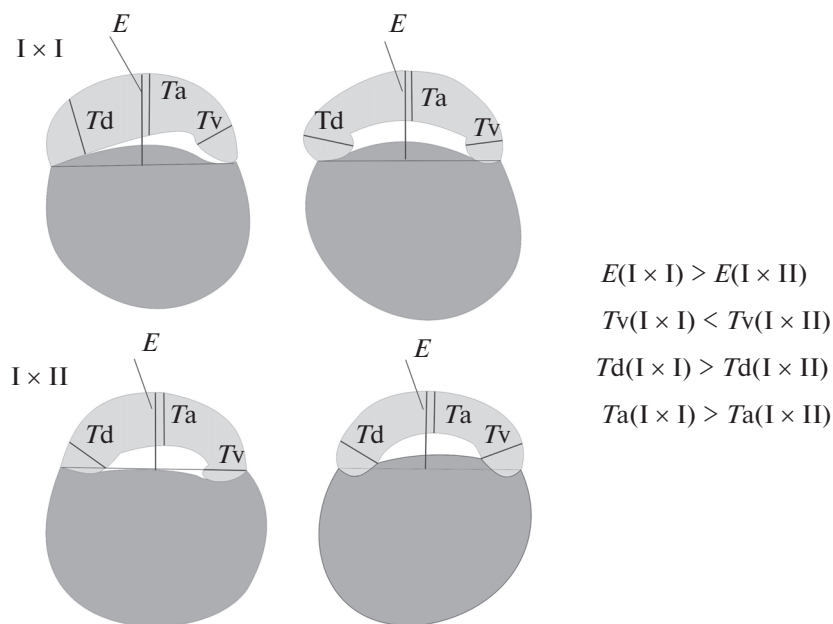


Рис. 11. Отцовский эффект в контролируемом скрещивании: яйца кладки I, оплодотворенные спермой самцов I и II, данные представлены так же, как на рис. 10.

щины дорсального края. Дело, очевидно, в том, что дорсальный край, морфогенез которого связан с вовлечением в него окружающих клеток краевой зоны и ростом плотности расположения клеток, сопротивляется пассивному растяжению сильнее, чем вентральный край.

Величина и характер материнского эффекта были вполне предсказуемыми, но неожиданно оказалось то, что отцовский эффект — не связанный с различием размера яиц — был не менее заметен и четко отличался от материнского эффекта (рис. 11).

Зародыши, развивавшиеся из яиц одной кладки, оплодотворенных спермой разных самцов, различались, что было очевидно даже без количественной оценки, степенью асимметрии бластодермы (предположительно — ДВ асимметрии). При факторном анализе группы со слабой асимметрией ($I \times I$ на рис. 11) получается такое же распределение факторных нагрузок, как в табл. 3, а для группы с сильной асимметрией ($I \times II$ на рис. 11) — такое, как в табл. 3. Поскольку различия в величине V/S отсутствуют, более сильную асимметрию нельзя объяснить просто изменением темпов эпиболлии, речь явно должна идти о сдвиге соотношения активной и пассивной компоненты морфогенеза. Поскольку это не связано с размерными различиями, естественно предположить, что это соотношение варьирует за счет изменения вклада активной компоненты (сил латерального давления).

При оценке влияния самца с помощью однофакторного дисперсионного анализа, значения

F -критерия (отношения изменчивости, обусловленной влиянием самца, к общей изменчивости) оказались равными 1.6 для признака Td и 18.6 для признака Tv . Аналогичные различия в силе влияния группы на признаки Td и Tv получались при оплодотворении спермой одного самца икры разных самок, и в опытах с неконтролируемым оплодотворением. Для вентральной стороны влияние группы оказывается сильнее, независимо от источников и характера этого влияния, что можно объяснить только общей дестабилизацией морфогенеза на дорсальной стороне зародыша из-за увеличения относительного вклада активных напряжений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первичную эмбриональную дифференцировку обычно представляют как возникновение “цветных” различий, не зависящих от геометрии, игнорируя отсутствие эмпирических данных, подтверждающих такое представление. Даже ссылка на зональную экспрессию генов неубедительна: зональные различия в экспрессии могут, разумеется, возникать и в морфологически однородной среде, но в этом случае они крайне нестабильны и не имеют значения для дальнейшего хода развития (Lerchner et al., 2000). Решающая роль геометрии в дифференцировке полюсов бластодермы у зародышей вьюна следует из того факта, что эта дифференцировка возможна только при анизотропной форме окружности бластодермы — другими словами, когда дифференцировка полю-

сов главных осей симметрии вытекает из дифференцировки самих этих осей, которая может быть только геометрической, так как цветная анизотропия не имеет физического смысла.

Поэтому, говоря о ДВ различиях, мы старались избегать слово полярность, так как речь должна идти о качественно различных способах организации морфогенеза дорсальной и вентральной половины бластодермы, возвращая нас к первоначальному смыслу концепции мозаичного развития. Из анализа индивидуальных траекторий развития следует, что они дестабилизируются при возникновении новых геометрических особенностей, являющихся одновременно новыми особыми точками векторных полей клеточного движения. Эти особенности возникают на дорсальной стороне зародыша (образование ЗЩ), или на стороне, которая с наибольшей вероятностью становится дорсальной при дальнейшем ходе развития (уменьшение кривизны наружной границы бластодермы в одном из ее секторов в начале эпиболлии). С их появлением, просто из-за усложнения морфогенеза, вклад в изменчивость ее внутригрупповой компоненты, в частности, случайных флуктуаций, возрастает и соответственно ослабляется связь с предшествующими по времени стадиями развития.

Устойчивость же индивидуальных траекторий развития вентральной половины зародыша и, соответственно, более тесная связь с историей развития является естественным следствием большей простоты и постоянства геометрии коллективных морфогенетических движений клеток — точно так же, как в гастрюляции амфибий (Черданцев, 2003; Cherdantsev, Scobeyeva, 2012). Особый интерес, на наш взгляд, представляет возможность механической интерпретации различий в организации изменчивости количественных признаков, связанных с формированием основного плана строения зародыша. Все эти различия — от межгрупповых различий до различий между изменчивостью морфогенеза дорсальной и вентральной половины зародыша — могут возникать при изменении всего одного параметра, характеризующего соотношение вклада активных и пассивных механических напряжений в изменение формы эпителиального пласта (ср. Cherdantsev, 2014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белинцев Б.Н. Физические основы формообразования. М.: Наука, 1990. 340 с.
- Дорфман Я.Г., Черданцев В.Г. Роль силы тяжести в раннем морфогенезе. Внешняя среда и развивающийся организм. М.: Наука, 1977. С. 146–161.
- Ивашкин Е.Г., Черданцев В.Г. Морфогенетические последствия частичного удаления цитоплазмы бластомеров в раннем эмбриональном развитии вьюна *Missgurnus fossilis* L. // Онтогенез. 2012. Т. 43. С. 202–211.
- Корвин-Павловская Е.Г., Неклюдова И.В., Слепцова Л.А., Голиченков В.А. Исследование регуляционных процессов в раннем развитии вьюна при уменьшении объема желтка зиготы // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология. 1996. № 4. С. 32–36.
- Костомарова А.А. Вьюн *Missgurnus fossilis* L. Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 308–324.
- Неклюдова И.В., Корвин-Павловская Е.Г., Черданцев В.Г. Дорсо-вентральные различия морфологических потенциалов бластодермы вьюна в опытах с эксплантацией ее фрагментов // Онтогенез. 2003. Т. 30. № 5. С. 353–361.
- Неклюдова И.В., Корвин-Павловская Е.Г., Черданцев В.Г. Пространственно-временная динамика морфогенетических потенциалов бластодермы в раннем морфогенезе вьюна // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 5. С. 355–371.
- Черданцев В.Г. Морфогенез и эволюция. М.: Изд-во КМК, 2003. 360 с.
- Черданцев В.Г., Цветкова Н.В. Динамика и изменчивость морфогенеза вьюна по данным наблюдений за индивидуальными траекториями развития // Онтогенез. 2005. Т. 36. С. 211–221.
- Черданцева Е.М., Черданцев В.Г. Детерминация дорсо-вентральной полярности у костистой рыбы *Brachidanio rerio* // Онтогенез. 1985. Т. 16. № 4. С. 270–280.
- Ballard W.W. Morphogenetic movements and fate maps of Vertebrates // Am. Zool. 1981. V. 21. P. 391–399.
- Belousov L.V. Morphomechanics of Development. Springer, 2015.
- Chen S., Kimelman D. The role of the yolk syncytial layer in germ layer patterning in zebrafish // Development. 2000. V. 127. 4681–4689.
- Cherdantseva E.M., Cherdantsev V.G. Geometry and mechanics of teleost gastrulation and the formation of primary embryonic axes // Int. J. Devel. Biol. 2006. V. 50. P. 157–168.
- Cherdantsev V.G., Grigorieva O.V. Morphogenesis of active shells // BioSystems. 2012. V. 109. P. 114–128.
- Cherdantsev V.G., Scobeyeva V.A. Morphogenetic origin of natural variation // BioSystems. 2012. V. 109. P. 299–313.
- Cherdantsev V.G. Generic oscillation patterns of the developing systems and their role in the origin and evolution of ontogeny // BioSystems. 2014. V. 123. P. 37–53.
- Gerhart J. Evolution of the organizer and the chordate body plan // Int. J. Dev. Biol. 2001. V. 45. P. 133–153.
- Gore A.V., Sampath K. Localization of transcripts of the zebrafish morphogen Squint is dependent on egg activation and the microtubule cytoskeleton // Mech. Dev. 2002. V. 112. P. 153–156.
- Gore A.V., Maegawa S., Cheong A., Gilligan P.C., Weinberg E.S., Sampath K. The zebrafish dorsal axis is apparent at the four-cell stage // Nature. 2005. V. 438. P. 1030–1035.
- Jaeger J., Surkova S., Blagov M., Janssens H., Kosma D., Kozlov K.N., Manu, Myasnikova E., Vanario-Alonso C.E., Samsonova M., Sharp D.H., Reinitz J. Dynamic control of positional information in the early *Drosophila* embryo // Nature. 2004. V. 430. P. 368–371.

- Hong S.K., Levin C.S., Brown J.L., Wan H., Sherman B.T., Huang D.W., Lempick R.A., Feldman B. Pre-gastrula expression of zebrafish extraembryonic genes // *Dev. Biol.* 2010. V. 10: 42.
- Kimmel C.B., Warga R.M., Schilling T.F. Origin and organization of the zebrafish fate map // *Development*. 1990. V. 108. P. 581–594.
- Lerchner W., Latinkic B.V., Remacle J.E., Huylebroeck D., Smith J.C. Region-specific activation of the *Xenopus* Brachyury promoter involves active repression in ectoderm and endoderm: a study using transgenic frog embryos // *Development*. 2000. V. 127. P. 2729–2739.
- Melby A.E., Warga R.M., Kimmel C.B. Specification of cell fates at the dorsal margin of the zebrafish gastrula // *Development*. 1996. V. 122. P. 2225–2537.
- Myers D.C., Sepich D.C., Solnica-Krezel L. Bmp activity gradient regulates convergent extension during zebrafish gastrulation // *Dev. Biol.* 2002. V. 243. P. 81–98.
- Schmitz B., Campos-Ortega J. Dorsoventral polarity of the zebrafish embryo is distinguishable prior to the onset of gastrulation // *W. Roux' Arch. Dev. Biol.* 1994. V. 203. P. 374–380.
- Stern C.D. Evolution of the mechanisms that establish the embryonic axes // *Current Opinion in Genetics & Development*. 2006. V. 16. P. 413–418.
- Tran D.L., Hino H., Quach H., Lim S., Shindo A., Mimori-Kiyosue Y., Mione M., Ueno N., Winkler C., Hibi M., Sampath K. Dynamic microtubules at the vegetal cortex predict the embryonic axis in zebrafish // *Development*. 2012. V. 139. P. 3644–3652.
- Trinkaus J.P. The yolk syncytial layer of *Fundulus*: Its origin and history and its significance for early embryogenesis // *J. Exp. Zool.* 1993. V. 265. P. 258–284.
- Warga R.M., Kimmel C.B. Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish // *Development*. 1990. V. 108. P. 569–580.

Variability of Quantitative Morphogenetic Parameters during Early Morphogenesis of the Loach, *Missgurnus fossilis* L.

V. G. Cherdantsev and E. G. Korvin-Pavlovskaya

Faculty of Biology, Moscow State University, 119991 Moscow, Russia
e-mail: vgcherdantsev@yandex.ru

Received October 7, 2014; in final form, March 25, 2015

Analysis of normal variation in quantitative morphological characters during the early embryonic development of the loach, based on fixed material and individual developmental trajectories of living embryos, shows that the dorsoventral differentiation of the blastoderm proceeds in two stages. Initially, at the onset of epiboly, the sagittal (short) and transverse (long) blastoderm meridians are marked off, and only then, upon germ ring (GR) formation, differentiation between the opposite poles of the sagittal meridian takes place. The embryonic shield (ES) usually appears in the segment of the blastoderm where the radius of its external curvature reaches a maximum and, therefore, the active surface tension at the blastoderm boundary with the YSL (periblast) and yolk is the highest. In this case, the convergence of inner cells toward the future dorsal segment (leading to ES formation) is a mechanical consequence of surface tension anisotropy. The normal course of epiboly is associated with periodic changes in the curvature of the blastoderm external surface, with new structures (the dorsal segment, GR, and ES) are marked off only when the surface curvature becomes maximally uniform. Although the ES in most embryos appears within the initial dorsal segment, individual developmental trajectories have been traced where the GR starts to form at the dorsal pole of the blastoderm but the ES develops on its opposite site, at the point of GR closure. In both cases, GR formation is initiated at the point of convergence of centrifugal cell migration flows that arise in the marginal zone of the blastoderm upon GR initiation or closure.

Keywords: morphogenesis, dorsoventral polarity, variation, quantitative morphological characters, individual developmental trajectories, loach