

УДК 591

МИКРОДЕФОРМАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ И РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ДВИЖЕНИЙ В РАЗВИТИИ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ

© 2016 г. А. Ю. Евстифеева, Л. В. Белоусов

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

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

E-mail: alyona-evst@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.03.2015 г.

Окончательный вариант получен 30.06.2015 г.

Измеряли скорости и направления движений индивидуальных клеток эпиктодермы зародышей шпорцевой лягушки при нормальном развитии от бластулы до ранней хвостовой почки, а также после релаксации механических натяжений на стадии ранней гастролы. Обнаружено чередование периодов направленных движений обширных масс клеток с их локальными блужданиями. И в том, и в другом случае траектории отдельных клеток состоят преимущественно из ортогональных отрезков. Клеточные движения измеряли в двух масштабах. При мелкомасштабном рассмотрении (времена порядка нескольких часов, расстояния порядка десятков микрон) выявлены относительно небольшие линейные деформации растяжения и сжатия, имеющие вид пологих плавных градиентов, вверх по которым направлены морфогенетические движения клеток. При крупномасштабном рассмотрении (времена порядка десятков минут, расстояния порядка микрон) обнаружены не полностью коррелированные по времени квазипериодические флуктуации скоростей движения отдельных клеток. Разности этих скоростей порождают микродеформации, которые достигают нескольких десятков процентов и устанавливаются за времена, не превышающие 10 мин. Измерения относительных величин механических сил, действующих на клеточные стенки, позволяют предположить, что микродеформации порождают локальные напряжения растяжения и сжатия, модулирующие более плавные градиенты напряжений.

Ключевые слова: гастрюляция, морфогенетические движения клеток, механические напряжения.

DOI: 10.7868/S0475145016010043

Хотя морфогенетические движения при гастрюляции и нейруляции зародышей позвоночных давно описаны (Keller and Tibbetts, 1989; Shih and Keller, 1992), механизмы их пространственно-временной регуляции остаются недостаточно исследованными. В предыдущих работах (Belousov et al., 1990; Kornikova et al., 2009) сообщалось, что для запуска и последующей регуляции направлений и скоростей морфогенетических движений необходимы механические напряжения (МН), локализованные у бесхвостых амфибий в поверхностном слое (в эпиктодерме), состоящем из прочно связанных клеток. Показано, что при нормальном развитии МН порождаются деформациями, вызванными движениями гастрюляции и нейруляции. Однако кинетика клеточных ответов на МН изучена недостаточно. В частности неизвестно, образуют ли движущиеся в определенном направлении клетки ламинарные потоки, или они перемещаются “турбулентно”, с существенно различными скоростями. В первом случае клеточные движения не должны сопровождаться существенными деформациями, тогда как при втором

варианте в механически связанном клеточном пласту такие деформации могут возникать.

Излагаемые ниже данные склоняют нас к последней версии. Мы показываем, что наряду с протяженными и плавными градиентами МН при достаточно детальном анализе (выявляются существенные квази-периодические флуктуации скоростей движений отдельных клеток, достоверно, но не стопроцентно коррелирующие между собой. Отклонения от идеальных корреляций создают разности скоростей, которые делают возможными локальные деформации эмбриональных тканей (микродеформации). Мы обсуждаем их морфогенетическое значение и показываем, что флуктуации скоростей сохраняются в те периоды развития, когда плавные градиенты МН отсутствуют и усиливаются в механически релаксированных зародышах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Получение икры и подготовка объектов к центральной микрофотосъемке. Икру получали ме-

тодом гормональной стимуляции самок *Xenopus laevis*. Зародышей с удаленными студенистыми и желточными оболочками помещали в $1 \times \text{MMR}$ в чашку Петри с 3% агаровым покрытием в вырезанную в агаре небольшую лунку. В агаровой лунке стеклянными палочками ориентировали зародыши боковой стороной к бинокюляру. Цейтраферную микрофотосъемку начинали примерно через 30 мин и проводили под бинокюляром Olympus SZX9 на камеру DCM-130 с интервалом в 1 мин в течение 120 или 240 мин на стадиях поздней бластулы (9 стадия, Nieuwkoop, Faber, 1956), поздней гастрюлы (12 стадия), ранней нейрулы (13–14 стадии), средней нейрулы (15 стадия) и ранней хвостовой почки (19 стадия). Чтобы проконтролировать роль случайных сдвигов, проводили контрольные съемки на зародышах, фиксированных в формалине.

Релаксация механических напряжений. МН на поверхности зародышей на стадии ранней гастрюлы релаксировали путем вставления в вегетативную область клина из энтодермального материала, взятого от другого зародыша той же стадии (подробности см. Belousov et al., 1990).

Оценка относительных величин механических сил на стенках клеток. Согласно общепринятому (Odell et al., 1981; Forgacs, 1995; Kozlov and Mogilner, 2007) условию механического равновесия в узлах схождения нескольких сил, относительные величины этих сил находятся в прямой зависимости от углов схождения стенок, к которым эти силы приложены. Исходя из этого условия и приняв величину некоторой начальной силы F_0 за единицу, мы можем, последовательно измеряя углы схождения клеточных стенок в непрерывном ряду клеток, получить значения сил, приложенных к этим стенкам, в единицах F_0 . Мы принимаем, что значения МН, установившихся к данному моменту времени, пропорциональны этим силам. Оценку проводили с использованием компьютерной программы на конфокальных изображениях эпизктодермы гастрюлы шпорцевой лягушки (стадия 11), окрашенных на F-актин. Полученные данные представлены в виде развертки сил, приложенных к стенкам ряда клеток, расположенных вдоль характерных для данной стадии траекторий их движений.

Прорисовка траекторий движения клеток и получение численных данных. Обработку полученных серий изображений проводили в программе ImageJ, плагин MTrackJ. С помощью данной программы вручную отмечали положение выбранных клеток каждые 10 мин, стараясь каждый раз попасть в центр отслеживаемой области клетки. Положение выбранной клетки визуально определяли либо по ее видимым границам, либо по пигментной грануле, связанной с данной клеткой. По отмеченным точкам программа рисова-

ла траектории движения клеток и выдавала их положения в прямоугольной системе координат по осям X , Y . Ось X совпадала с передне-задней, а ось Y соответствовала анимально-вегетативному или, позже, дорсо-вентральному направлению зародыша. Пути, пройденные репрезентативными клетками на последовательных стадиях развития, полностью изображены на рис. 1 и схематически – на рис. 2.

Измерения и статистическая обработка данных. Статистическую обработку проводили в программе Statistica. Определяли:

– длины путей (S), проходимых индивидуальными клетками вдоль координат X или Y за продолжительные отрезки времени (2–4 часа);

– скорости движений отдельных клеток (V) как пути (выраженные в линейных единицах), проходимые ими за 10-минутные отрезки времени вдоль каждой из координат;

– разности (ΔV) скоростей одновременных движений двух репрезентативных клеток и линейные деформации как отношения ΔV к среднему расстоянию между данными клетками. Заметим, что полученные значения деформаций являются их нижними пределами, так как нельзя исключить получения тех же или даже больших значений ΔV для ближе расположенных клеток.

– проценты клеток образцов разных стадий развития, коэффициенты корреляции между скоростями движений которых превышали пороги достоверности.

– временные периодичности по V (методом Фурье-анализа);

– направления движений отдельных клеток и значения V в угловой системе координат, нормированной относительно осей зародыша.

Всего было обработано свыше 100 двух- и четырехчасовых клеточных треков на 15 различных объектах.

Поскольку размеры структур, выбранных нами для маркировки положения клеток, превышают диаметр перекрестия измерительного устройства, возможны субъективные ошибки, связанные с выбором положения точки, отмечающей данную клетку. Для оценки ошибки мы провели для 10 двухчасовых клеточных треков по две и для одного трека – три независимые серии измерений. При этом во всех случаях воспроизводился характерный для данного трека колебательный паттерн значений V . В программе Statistica 7.0 по полученным данным для каждого 10-минутного отрезка времени вычисляли стандартное отклонение V по каждой из координат X , Y . В качестве ошибки измерений мы взяли самое большое стандартное отклонение из полученных – 3 мкм. При оценке значений ΔV порог ошибки был повышен до 5 мкм, потому что таковы были макси-

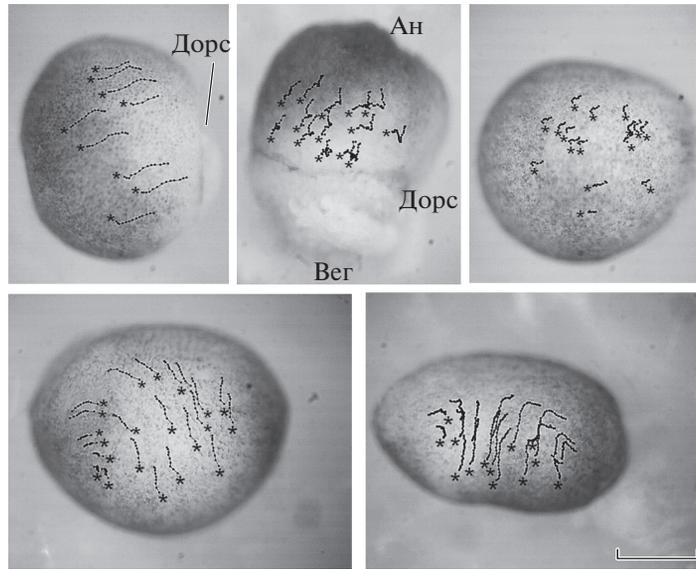


Рис. 1. Пути, пройденные репрезентативными клетками за 2 (а, в, г) или 4 (б, д) часа на последовательных стадиях развития. Каждая кривая соответствует траектории одной клетки. Крест – начало траектории. Ан – анимальный, Вег – вегетативный полюс, Дорс – дорсальная сторона. На в–д передний конец слева, дорсальная сторона сверху. а – стадия 12 (интактная гастрюла); б – механически релаксированная гастрюла, вегетативный конец срезан; в – стадия 13 (переход от гастрюлы к нейруле); г – стадия 14 (ранняя нейрула); д – стадия 19 (ранняя хвостовая почка). Фотографии зародышей сделаны в конце съемки клеточных траекторий. Мерная линейка равна 500 μm .

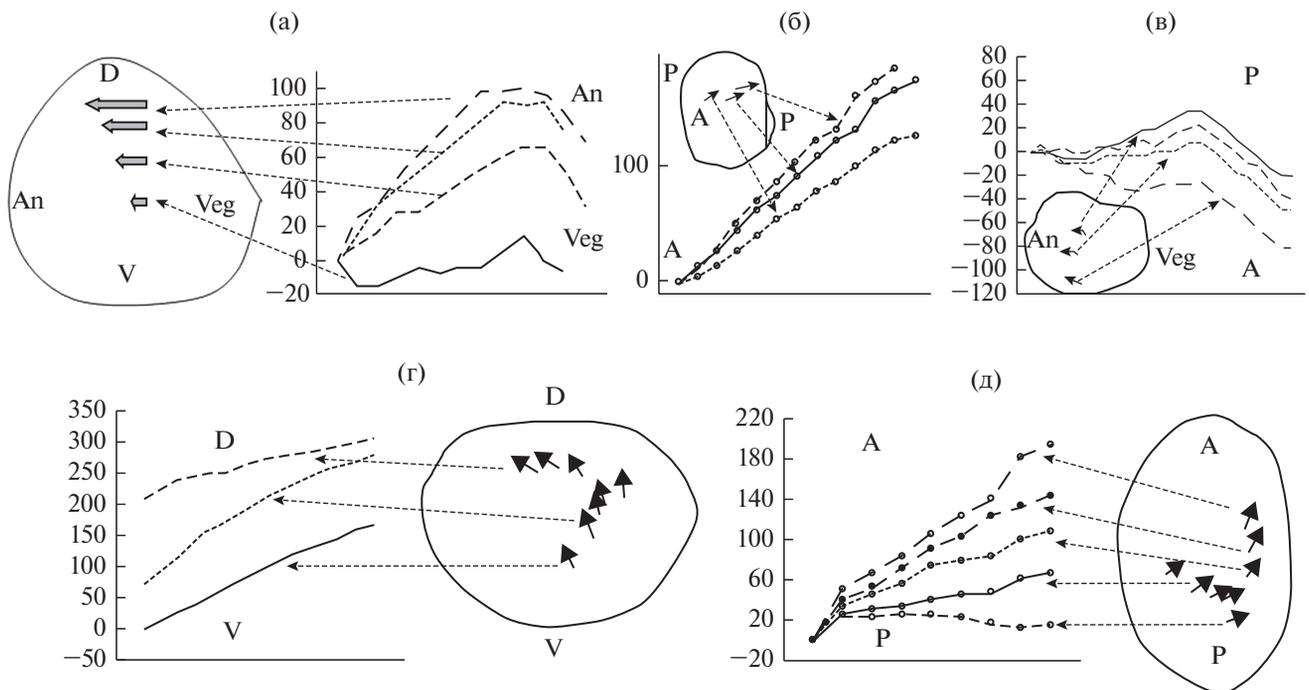


Рис. 2. Графики движений репрезентативных клеток и прорисовки соответствующих стадий развития и векторов клеточных движений. На графиках по горизонтальным осям отложено время, деления отмечают десятки минут. Вертикальные оси – пути, пройденные клетками (в микронах) в вегето-анимальном (Veg-An), дорсо-вентральном (DV) или антеро-постериорном (AP) направлениях (отмечены на схемах и графиках). а – стадия поздней бластулы; б – стадия ранней гастрюлы; в – та же стадия, зародыш механически релаксирован. г, д – стадия 14 (ранняя нейрула), представлены вентро-дорсальные (г) и передне-задние (д) градиенты клеточных движений.

мальные артефактные отклонения ΔV от нуля, вызванные ошибками при измерениях V . Мы учитывали только $\Delta V \geq 5$ мкм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Градиенты клеточных скоростей и деформации поверхности зародышей в период развития от поздней бластулы до поздней нейрулы (мелкомасштабное рассмотрение)

На стадии поздней бластулы (9 стадия) клетки дорсальной области зародыша движутся в анимальном направлении, причем чем ближе к дорсальной стороне данная клетка, тем больший путь она проходит. Таким образом, возникает дорсо-вентральный градиент скоростей движения клеток, перпендикулярный направлениям их движений (рис. 2а). В то же время клетки вентральной области зародыша совершают локальные движения с почти нулевыми суммарными смещениями.

В период гастрюляции (стадии 10–12) клетки всей боковой поверхности зародышей перемещаются с относительно большей скоростью строго в сторону бластопора (рис. 1а, 2б). По мере приближения к бластопору скорости движений плавно нарастают (в среднем на $2.5 \mu\text{m}/\text{мин}$ на каждые $100 \mu\text{m}$ пройденного пути). В результате образуется единый градиент клеточных скоростей, ориентированный вдоль векторов клеточных движений, а не перпендикулярно им, как на предыдущей стадии. При условии механической связности клеточного пласта этот градиент растягивает поверхность зародыша в передне-заднем направлении в среднем на 12–14% за 2 часа. В то же время клетки, расположенные поблизости от бластопора, сближаются (конвергируют) в дорсо-вентральном направлении со средней скоростью $\approx 18 \pm 7.6 \mu\text{m}/10 \text{ мин}$, которая в середине данного периода возрастает до $30 \mu\text{m}/10 \text{ мин}$. В результате за 2 часа происходит 25% поперечное сжатие расположенного между ними участка поверхности.

Релаксация МН на стадии ранней гастрюлы существенно нарушает нормальные паттерны клеточных движений. Хотя клетки, расположенные поблизости от инактивированного релаксацией бластопора, в течение первых 2 часов наблюдений продолжают смещаться к бластопору, они двигаются с меньшими, нежели в норме, скоростями, а затем поворачивают в сторону анимального полюса (как в нормально развивающихся зародышах предыдущей стадии) (рис. 1б, 2в). Клетки более удаленных от бластопора районов почти с самого начала наблюдений начинают двигаться в анимальном направлении. В результате на границе обеих зон возникают аномально высокие деформации (см. ниже).

По завершении гастрюляции (ст. 13+) клеточные движения существенно замедляются и часть из них теряет направленность (рис. 1в). На следующей (14-й) стадии в туловищной области начинают доминировать движения в вентро-дорсальном (VD) направлении (рис. 1г, 2г). В то же время клетки дорсальной области движутся косо вверх и вперед со скоростью, убывающей в передне-заднем (AP) направлении (рис. 2д). Возникающие в этот период мелкомасштабные деформации порождаются неравенствами скоростей этих движений. А именно, в туловищной области из-за плавного убывания VD-скоростей в дорсальном направлении возникает вентро-дорсальный градиент сжатия, достигающий $\geq 20\%$ за 90 мин. Перпендикулярно ему в дорсальной области образуется градиент растяжения, имеющий величину того же порядка. В головной области происходят обе деформации: наиболее дорсально расположенные клетки смещаются вперед, осуществляя продольное растяжение, а более вентрально расположенные клетки смещаются в VD-направлении, генерируя сжатие (рис. 1г). За 2 часа деформации сжатия-растяжения достигают 50–70%.

На последующих стадиях (рис. 1д) господствуют те же тенденции: наиболее вентрально расположенные клетки сначала движутся в дорсальном направлении, а затем круто разворачиваются в переднем и заднем направлениях. Особенности клеточных движений на этих стадиях обсуждаются ниже, при крупномасштабном рассмотрении.

Тенденция к ортогональности клеточных движений

Уже из приведенных выше данных видно, что клеточные движения в эмбриональных тканях собраны в почти прямолинейные потоки, разделенные углами, близкими к прямым. Статистическая обработка, основанная на более детальном (крупномасштабном) рассмотрении показала, что это справедливо не только для направленных клеточных движений (рис. 3б, 3д), но и для фаз клеточных блужданий: “розы траекторий” расщеплены на дискретные угловые кластеры (рис. 3а, 3г). С другой стороны, у механически релаксированных зародышей кластеризация заменяется более диффузным распределением траекторий (рис. 3в), хотя преобладание траекторий, направленных к бластопору (на рисунке вправо), над противоположно направленными сохраняется. Все диаграммы, снятые с живых зародышей, резко отличаются от полностью изотропных распределений, присутствующих в фиксированных образцах (рис. 3е).

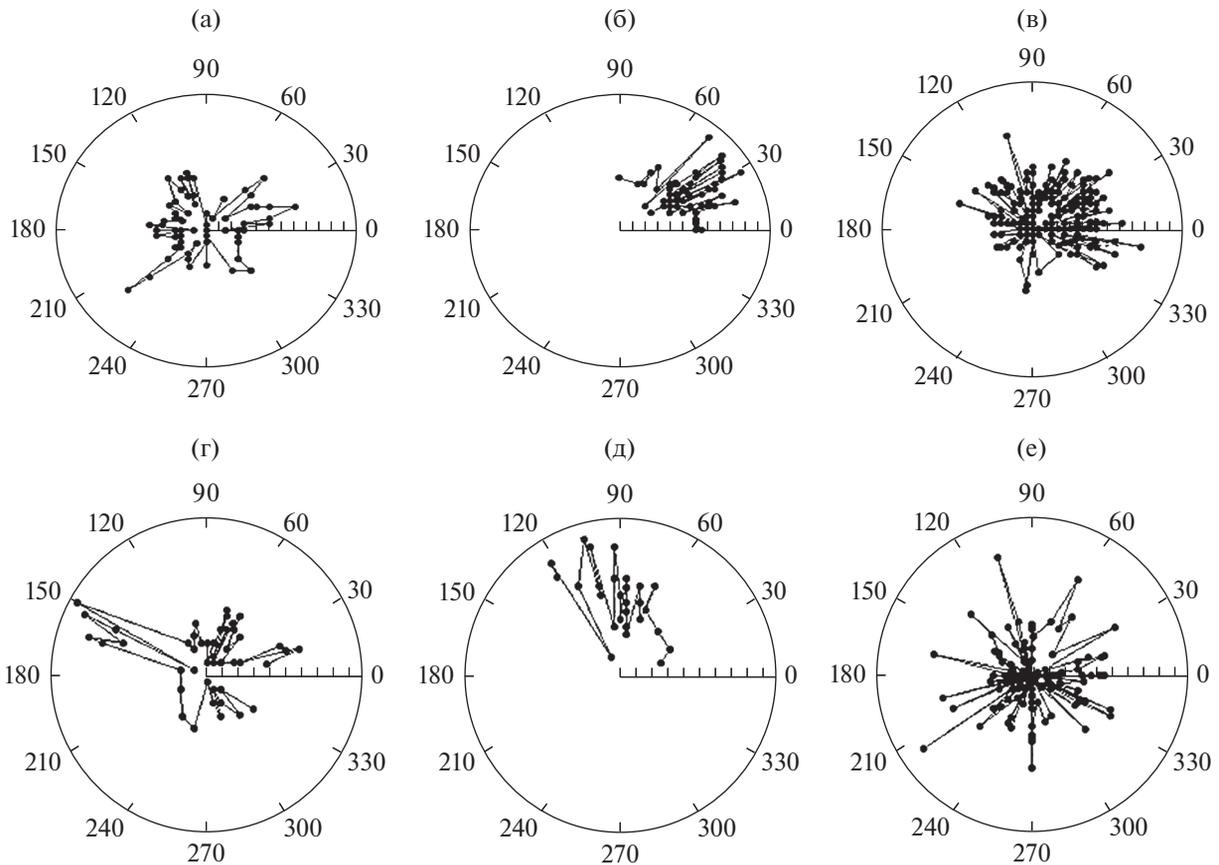


Рис. 3. Угловые диаграммы клеточных движений в зародышах различных стадий развития (а–д) и в контрольном образце (фиксированная формалином гастрюла) (е). Радиусы пропорциональны путям, пройденным клетками в данном направлении за 10-минутные отрезки времени. Оси 180°–0° соответствуют передне-задней, 90°–270° – дорсо-вентральной оси зародыша. а – поздняя бластула, б – интактная гастрюла, в – механически релаксированная гастрюла, г – стадия 14, ненаправленное блуждание, д – вентро-дорсальная миграция клеток того же зародыша, что и на г.

Крупномасштабное рассмотрение клеточных движений и деформаций поверхности зародышей

В предыдущих разделах приводились оценки деформаций поверхности зародышей исходя из различий в клеточных скоростях, усредненных за времена порядка часов. Такие оценки полезны для выявления *макроскопических* градиентов деформаций и напряжений, однако более детальные исследования показали, что при этом упускаются из виду весьма значительные, хотя и кратковременные отклонения значений V от средних. При использовании 10-минутных временных разрешений такие отклонения были обнаружены на всех исследованных стадиях развития, включая механически релаксированных зародышей (рис. 4а–4е). Как видно из рисунка и подтверждается подсчетами, у значительного количества (но далеко не у всех) клеток одного и того же образца, временные паттерны достоверно коррелируют между собой (таблица). Области зародышей, охваченные такими корреляциями, достаточно широки, достигая к стадии 19 более 600 μm в AP направ-

лении и более 100 μm в DV направлении. Из рис. 4 видно, что корреляции определяются хорошим фазовым соответствием пиков, тогда как абсолютные величины пиков могут сильно различаться. Именно неполнота корреляций обеспечивает наличие ΔV (рис. 5). Видно, что во всех случаях, включая ненаправленные блуждания клеток (рис. 5а), разности скоростей, возникающие за времена не более 10 мин, сопоставимы по величине или даже превышают 2-часовой поступательный сдвиг данной пары клеток (обозначен на рис. 5а вертикальной линейкой справа). На рисунке приведены различные паттерны неравенств:

- примерно равные отклонения ΔV по обе стороны от нулевой линии. Это означает, что обе клетки поочередно обгоняют одна другую в направлении основного движения (рис. 5а, 5б);
- односторонний импульсный “толчок” (рис. 5в);
- длительный, модулированный малыми импульсами и резко обрывающийся период одностороннего давления в VD направлении (рис. 5г);

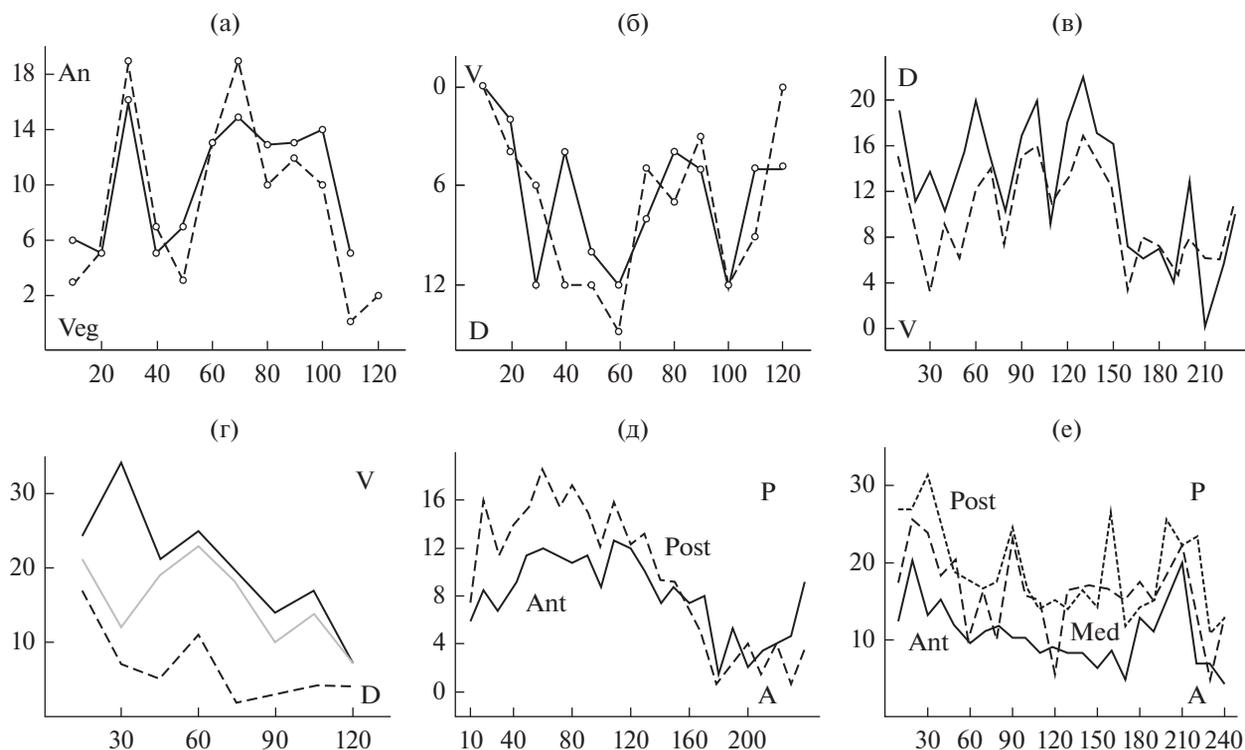


Рис. 4. Графики одновременных движений двух (а–в, д) или трех (г, е) репрезентативных клеток поздней бластулы (а), интактной (б) и механически релаксированной (в) ранней гастролы и зародышей 14 (г), 15 (д) и 19 (е) стадий. Горизонтальные оси: здесь и на рис. 5, 6 – время, минуты. Вертикальные оси здесь и на рис. 5, 6 – микроны. DV – дорсо-вентральное, AP – антеро-постериорное направление. На (г) представлены клетки дорсального (dors), промежуточного (med) и вентрального (vent) уровней, на (д) клетка переднего (ant) и заднего (post) уровня, на (е) кроме того представлена траектория клетки промежуточного между ними уровня.

– периодические односторонние импульсы к растяжению в VD направлении, исходящие от задних уровней туловищной области и действующие на более передние (рис. 5д);

– у механически релаксированных зародышей наблюдаются наибольшие по величине и хаотические по времени неравенства (рис. 5е), соответствующие 120% деформациям.

Проценты клеточных треков одних и тех же образцов, коррелирующие между собой по скоростям движений за одни и те же 10-минутные отрезки времени. Без скобок – пары треков, для которых коэффициент корреляции превышает 0.6; в скобках – превышает 0.8

| № | Стадии развития | Направление движений клеток | | Суммарный процент корреляций в обоих направлениях |
|---|--------------------------------|--|--|---|
| | | к бластопору (1–4) или в передне-заднем направлении (5, 6) | к анимальному полюсу (1–4) или вентро-дорсально (5, 6) | |
| 1 | Поздняя бластула | 43(3) | 16(8) | 59(11) |
| 2 | Ранняя гастролла | 22(4) | 52(14) | 74(18) |
| 3 | Ранняя гастролла релаксирована | 5(0) | 62(26) | 67(26) |
| 4 | Средняя гастролла | 22(7) | 9(1) | 31(8) |
| 5 | Ранняя нейрула | 14(1) | 73(18) | 87(19) |
| 6 | Ранняя хвостовая почка | 53(18) | 53(0) | 106*(18) |

* Превышение 100% связано с тем, что некоторые клеточные треки коррелируют в обоих направлениях.

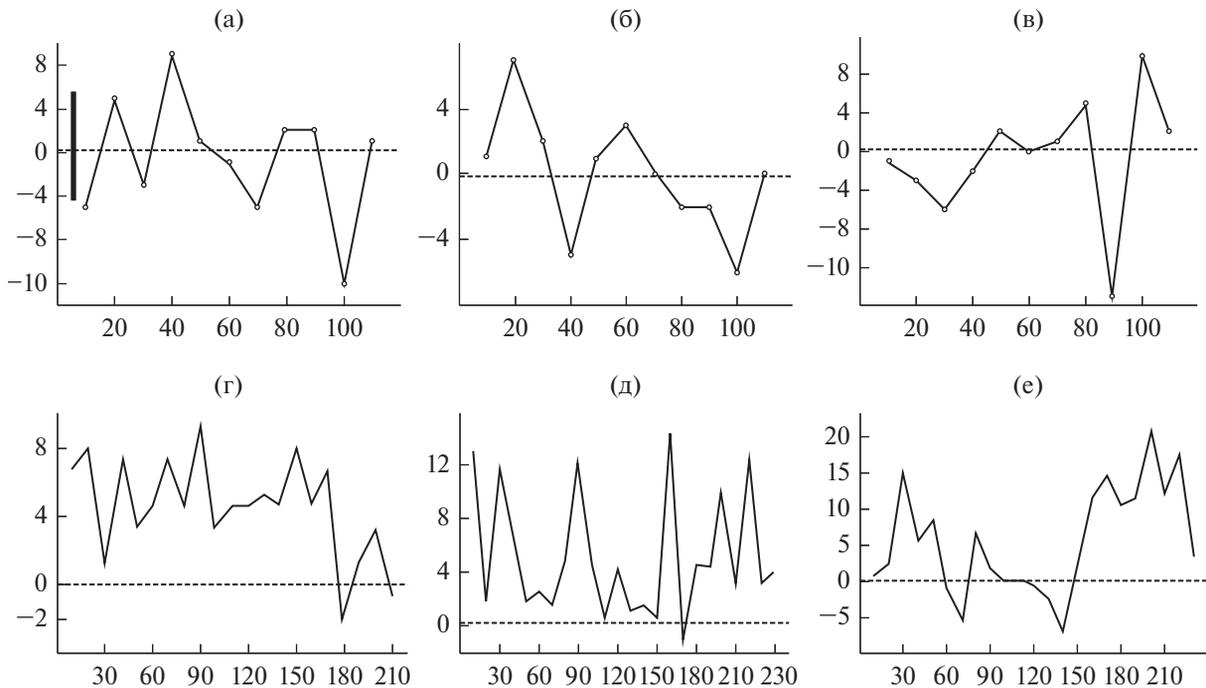


Рис. 5. Разности (в микронах) между путями, пройденными одновременно за 10-минутные отрезки времени близко расположенными клетками одних и тех же образцов (вертикальная ось). Горизонтальные пунктиры обозначают нулевые разности. а – стадия поздней бластулы, б, в – стадия гастроты, г – стадия 15, головная область, д – стадия 19, туловищная область зародыша, е – механически релаксированная гастроты. а, б, е – движения относительно передне-задней, в, г, д – относительно дорсо-вентральной оси зародыша. Вертикальная линейка на (а): поступательное смещение клеток за 2 часа.

На рис. 6 представлены более подробные данные по анализу взаимных смещений одновременно движущихся клеток. На рис. 6а показан график движения клетки 1, двигающейся на стадии гастроты в сторону бластопора, а также графики разностей ее скорости со скоростями клеток 7 и 10 (1–7, 1–10), расположенных на той же линии соответственно спереди и сзади. На рис. 6б отложен трек той же клетки и разности ее скорости со скоростями клеток 9 и 13, (1–9 и 1–13), двигающихся параллельно клетке 1 дорсальнее и вентральнее. Видна четкая периодичность движения клетки 1 к бластопору, причем фазы ее максимальной скорости (вертикальные стрелки на рис. 6а) наступают, когда скорости либо одной, либо обеих других клеток ее превышают. Это означает, что на фазах максимальной скорости клетка 1 либо “подтягивается” передней клеткой 7 (фаза с), либо “подталкивается” задней клеткой 10 (фаза б), либо подтягивается и подталкивается одновременно с равными скоростями (фаза а). Только в последнем случае растяжение клетки 1 клеткой 7 уравновешивается сжатием клетки 1 клеткой 10, так что деформации вдоль траектории движения клетки 1 не возникает. С другой стороны, в первом случае между 7 и 1 возникает деформация растяжения, а во втором – деформация сжатия.

Наконец, на минимуме между а и б клетка 1 “подталкивает” клетку 7, а на минимуме между б и с “подтягивает” клетку 10. Рис. 6б показывает соотношение скоростей трех смежных клеток (9, 1 и 13), двигающихся к бластопору по параллельным траекториям. Клетки 1 и 13 ведут себя примерно симметрично, поочередно подтягивая и подталкивая одна другую (соответственные разности флуктуируют относительно нулевой линии), а клетки 1 и 9 – резко асимметрично: последняя движется существенно быстрее, так что между 9 и 1 возникают деформации растяжения. Поскольку за начальный 20-минутный период расстояние между клетками 9 и 1 возрастает на 10 μm при исходном расстоянии $\approx 17 \mu\text{m}$ – величина деформации превышает 50%. Благодаря тому, что установленная между данными клетками разность скоростей сохраняется, эта деформация будет постоянно поддерживаться.

На рис. 6в, 6г отложены в одном масштабе траектории параллельно движущихся к бластопору клеток 12 и 3 и их разности соответственно вдоль оси X (совпадающей с AP направлением) и вдоль оси Y. Видно, что треки обеих клеток вдоль оси Y (рис. 6г) совпадают друг с другом значительно лучше, чем по оси X (рис. 6в), из-за чего деформации вдоль AP направления в несколько раз превы-

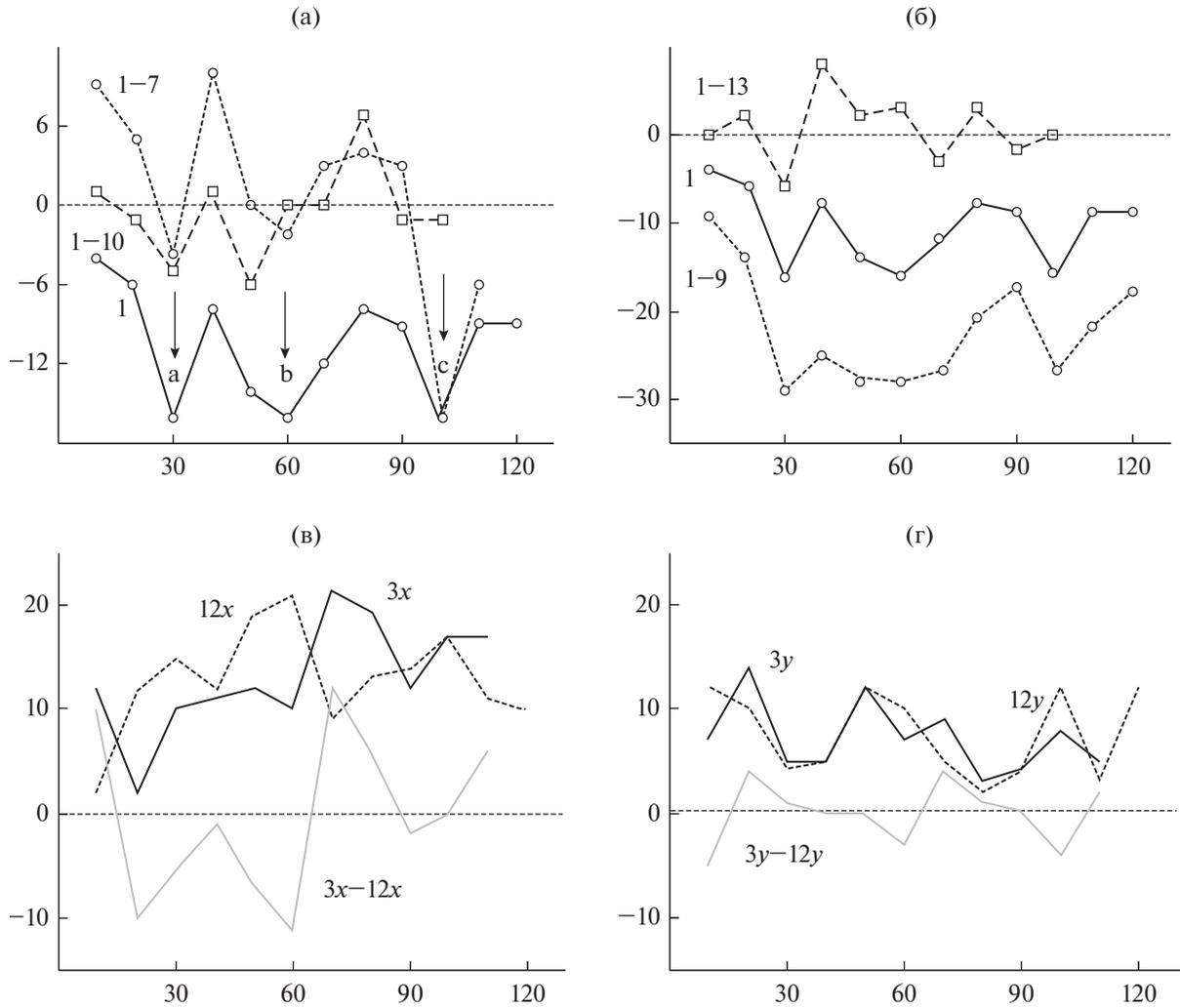


Рис. 6. Сопоставление треков индивидуальных клеток на стадии 12 (гастрюла) с разностями между ними. а – трек клетки 1 (сплошная линия) и его разности с треками клетки 7 (1–7, заточкован) и клетки 10 (1–10, пунктир). Все треки ориентированы вдоль одной линии, направленной к бластопору. б – трек клетки 1 (сплошная линия) и его разности с треком клетки 9 (1–9, заточкован) и клетки 13 (1–13, пунктир). Клетки 9, 1, 13 расположены друг над другом в дорсо-вентральном направлении. В обоих случаях представлены разности по оси X . в, г – сопоставление разностей скоростей дорсо-вентрально расположенных клеток 3 и 12 вдоль осей X (в) и Y (г).

шают таковые вдоль перпендикулярного к нему DV направления. Интересно, что эта тенденция сохраняется и в механически релаксированной гастрюле: движение по направлению к рудиментарному бластопору – хотя и сохраняющееся лишь у клеток, наиболее близких к бластопору и то лишь вначале – связано с меньшими микродеформациями, нежели “новый” для клеток путь к анимальному полюсу. Мы видим, что микродеформации имеют анизотропную структуру.

Фурье-анализ клеточных движений

Фурье-анализ выявил характерный и более или менее постоянный для всех изученных ста-

дий развития набор периодов как при движениях одной и той же клетки, так и в ΔV . Периоды чаще всего группируются вокруг 20–27-мин. Кроме того, часто повторяются периоды 40–50 мин (приблизительно кратные предыдущим), и реже – периоды 30–35 мин и 72–75 мин. Вторые и четвертые наборы периодов отстают примерно на октаву от первого и третьего наборов соответственно, то есть образуют гармоники. Обратим внимание, что поскольку частотные спектры для ΔV представляют собой разности исходных спектров отдельных клеток, они лишены трендов, которые, как правило, присущи последним. Кроме того, из-за интерференции спектр для ΔV , как правило, имеют более короткие периоды, нежели спектры,

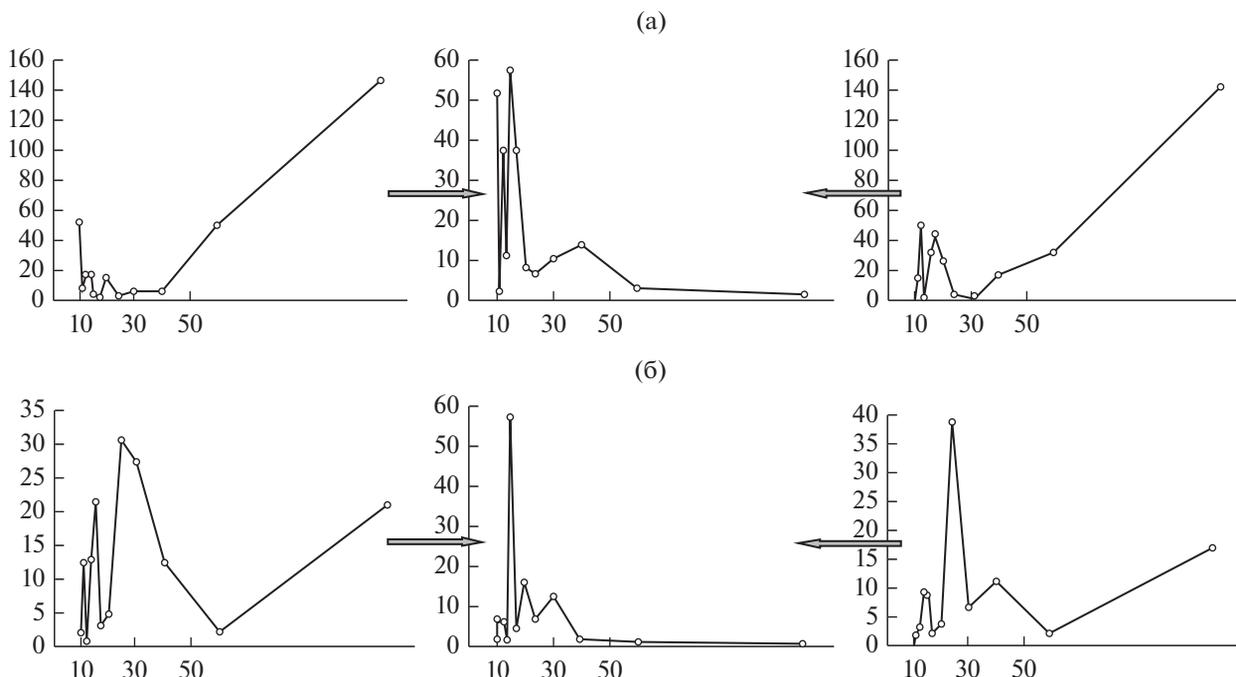


Рис. 7. Периодограммы разностей скоростей (10-минутных путей) двух пар клеток (центральные диаграммы) и периодограммы исходных траекторий, вычитанием которых они получены. Периодограммы разностей лишены трендов, их пики сдвинуты в стороны меньших периодов.

из которых он составлен (рис. 7). Эти обстоятельства обсуждаются ниже.

Развертка механических сил, приложенных к стенкам ряда клеток эпиктотермы на стадии средней гаструлы. Рис. 8а показывает идущий от бластопора дорсо-вентрально ориентированный ряд из 68 клеток, для стенок которых были просчитаны значения приложенных механических сил, отнесенные к таковой наиболее близкой к бластопору клетке. На рис. 8б показана развертка относительных значений сил в направлении от бластопора, а на рис. 8в – так же ориентированная развертка разностей значений этих сил для смежных узлов данного клеточного ряда. Видно, что распределение значений сил для избранного клеточного ряда обладает по меньшей мере двухуровневой структурой: при мелкомасштабном рассмотрении выявляется относительно плавное их возрастание в дорсо-вентральном направлении (огibaющая кривая на рис. 8б), а при рассмотрении в более крупном масштабе – резкие перепады значений сил на малых расстояниях (вплоть до расстояний между соседними клетками). Эти данные обсуждаются ниже.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной вывод из приведенных выше данных состоит в том, что регуляция морфогенетических клеточных движений в тканях зародышей

шпорцевой лягушки по меньшей мере двухуровневая. Верхний уровень регуляции представлен “классическими”, подробно описанными ранее направленными движениями обширных клеточных коллективов в сторону бластопора в период гаструляции и в вентро-дорсальном направлении в период нейруляции. В этих областях возникают градиенты скоростей клеточных движений, направленные либо вдоль (при гаструляции), либо поперек (на стадиях поздней бластулы и нейрулы) доминирующих движений. В любом случае доминирующие движения направлены в сторону наименьшей плотности клеточного расположения, которые являются также областями наибольших натяжений. Это соответствует ранее описанному (Белоусов с соавт., 1999) механизму тензотаксиса, получившему в последнее время новые подтверждения (Mansurov et al., 2012).

С другой стороны, в данной работе описаны такие периоды развития и районы зародышей, где закономерные градиенты клеточных скоростей отсутствуют (они либо еще не сформировались, как в вентральных областях поздней бластулы, либо находятся в стадии перестройки, как между концом гаструляции и началом нейруляции). В этих областях движения клеток ограничены локальными блужданиями, состоящими из взаимно ортогональных отрезков. Наиболее простое объяснение ортогональности состоит в том, что движущаяся клетка подавляет образование новых ла-

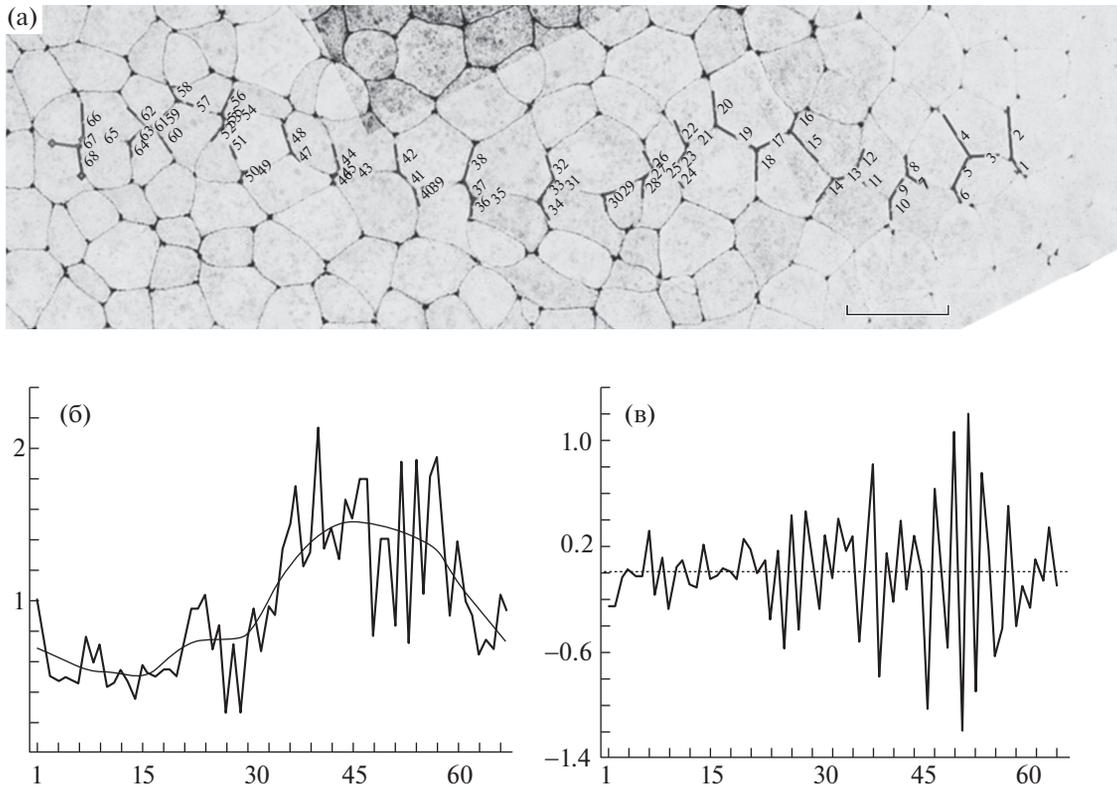


Рис. 8. Относительные величины механических сил, приложенных к стенкам клеток эпиэктодермы гастрюлы *Xenopus laevis* (стадия 11). а – конфокальное изображение ряда клеток, на которых проводили измерения. Справа – контур бластопора. б – относительные величины сил (ордината) для ряда из 68 последовательных узлов клеточных стенок (считая от бластопора). Огибающая кривая – усредненные значения. в – разности сил (ордината), приложенных к смежным ребрам клеток. Пунктир соответствует нулевой разности. Масштабная линейка – 50 μm .

меллоподий под малыми углами к ее ведущему краю (Gauthier et al., 2012; Houk et al., 2012).

В работе показано, что данный тип клеточных движений, лишенных дальнего порядка, является также и элементом направленных клеточных потоков. Он проявляется в нерегулярных и кратковременных относительных сдвигах клеток, нарушающих кажущуюся на первый взгляд очевидной ламинарность клеточных потоков. Наличие этих сдвигов (ненулевых значений ΔV) заставляет обратиться к вопросу о степени корреляции между клеточными движениями внутри одного и того же образца. Действительно, мы видим, что значительная часть клеточных движений достоверно коррелирует (таблица), причем на некоторых стадиях (стадия 19) корреляции охватывают обширные территории. Эти корреляции, а также характерные периоды, выявляемые Фурье-анализом, позволяют предположить наличие пейсмекеров, изучение которых должно стать предметом дальнейших исследований. С другой стороны, именно неполнота корреляций (определенное “несовершенство” предполагаемых пейсмекеров) и создает ненулевые значения ΔV . Отметим следую-

щие их особенности: (1) значения ΔV мало зависят от абсолютных значений клеточных скоростей, или от трендов скоростей – а значит, и от любых факторов, влияющих на скорость развития; (2) интерференция двух пейсмекеров с регулярными, но разными периодами породит нерегулярную ритмику с меньшими периодами. Например, синхронно запущенные пейсмекеры с периодами 4 и 5 единиц времени будут порождать последовательность сигналов с периодами $4 - 0 = 4$, $5 - 4 = 1$, $2 \times 4 - 5 = 3$, $2 \times 5 - 2 \times 4 = 2$ и т.д. (ср. рис. 7).

Мы предполагаем, что нерегулярные сдвиги клеточных скоростей порождают локальные и в основном кратковременные МН растяжения и/или сжатия. Действительно, чтобы подобные сдвиги протекали в ненапряженном режиме, необходимо, чтобы клетка за весь период своего перемещения относительно соседней образовывала с ними менее двух контактных зон, то есть либо вообще не имела бы контактов, либо имела один контакт. Такая ситуация для столь плотного клеточного слоя как эпиэктодерма представляется невероятной: практически любая клетка, незави-

симо от того, меняет она своих соседей или нет, имеет многочисленные контакты с другими клетками и перемещается путем чередующихся сокращений-растяжений (см. напр. Belousov et al., 2000), неизбежно порождая МН. К тому же наличие локальных паттернов МН прямо подтверждается измерениями относительных величин механических сил, приложенных к клеточным стенкам (см. рис. 8 и комментарии к нему).

Роль локальных кратковременных МН может быть особенно важной в те периоды развития и в тех областях зародышей, где создающие МН макроскопические градиенты отсутствуют: хорошо известно, что при невозможности активного натяжения в клетках включается программа апоптоза (Chen et al., 1997). Однако и при наличии макроскопических источников МН нерегулярные кратковременные сдвиги взаимных скоростей могут способствовать распространению активных клеточных движений в относительно далекие от них области. Причем именно импульсные воздействия могут оказаться в этих условиях наиболее эффективными (Трошина с соавт., 2011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белоусов Л.В., Дорфман Я.Г., Черданцев В.Г. Архитектура механических напряжений на последовательных стадиях раннего развития лягушки // Онтогенез. 1976. Т. 7. С. 115–122.
- Белоусов Л.В., Лучинская Н.Н., Зарайский А.Г. Тензотаксис – коллективное движение эмбриональных клеток вверх по градиентам механических натяжений // Онтогенез. 1999. Т. 30С. 220–228.
- Трошина Т.Г., Глаголева Н.С., Белоусов Л.В. Статистическое исследование быстрых механозависимых клеточных движений в деформированных эксплантатах эмбриональных тканей шпорцевой лягушки // Онтогенез. 2011. Т. 42. № 5.
- Belousov L.V. Morphomechanics of Development, 2005. Springer. 195 P.
- Belousov L.V., Lakirev A.V., Naumidi I.I., Novoselov V.V. Effects of relaxation of mechanical tensions upon the early morphogenesis of *Xenopus laevis* embryos // Int. J. Dev. Biol. 1990. V. 34. P. 409–419.
- Belousov L.V., Luchinskaia N.N., Stein A.A. Tension-dependent collective cell movements in the early gastrula ectoderm of *Xenopus laevis* embryos // Devel. Genes and Evolution. 2000. V. 210. P. 92–104.
- Chen C.S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G.M., Ingber D.E. Geometric control of cell life and death // Science. 1997. V. 276. P. 1425–1428.
- Forgacs G. On the possible role of cytoskeletal filamentous networks in intracellular signaling: an approach based on percolation // J. Cell Sci. 1995. V. 108. P. 2131–2143.
- Gauthier N.C., Masters T.A., Sheetz M.P. Mechanical feedback between membrane tension and dynamics // Trends in Cell Biol. 2012. V. 22. P. 527–536.
- Houk A.R., Jilkine A., Mejean C.O., Boltysansky R., Dufresne E.R., Angenent S.B., Altshuler S.J., Wu L.F., Weiner O.D. Membrane tension maintains cell polarity by confining signals to the leading edge during neutrofil migration // Cell. 2012. V. 148. P. 175–188.
- Keller R., Tibbetts P. Mediolateral cell intercalation in the dorsal, axial mesoderm of *Xenopus laevis* // Dev. Biol. 1989. V. 131 (2). P. 539–549.
- Kornikova E.S., Korvin-Pavlovskaya E.G., Belousov L.V. Relocations of cell convergence sites and formation of pharyngula-like shapes in mechanically relaxed *Xenopus* embryos // Development, Genes and Evolution. 2009. V. 219. P. 1–10.
- Kozlov M.M., Mogilner, A. Model of polarization and bistability of cell fragments // Biophys. J. 2007. V. 93. P. 3811–3819.
- Mansurov A.N., Stein A.A., Belousov L.V. A simple model for estimating the active reactions of embryonic tissues top a deforming mechanical force // Biomech. Mod. Mech.-Biol. 2012. V. 11. P. 1123–1136.
- Odell G.M., Oster G., Alberch P., Burnside B. The mechanical basis of morphogenesis. I. Epithelial folding and invagination // Devel Biol. 1981. V. 85. P. 446–462.
- Shih J., Keller R. Cell motility driving mediolateral intercalation in explants of *Xenopus laevis* // Development. 1992. V. 116 (4). P. 901–914.

Surface Microdeformations and Regulation of Cell Movements in *Xenopus* Development

A. Yu. Evstifeeva and L. V. Belousov

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

Received March 24, 2015; in final form, June 30, 2015

The velocities and directions of movements of individual outer ectodermal cells of *Xenopus* embryos in the course of normal development from the blastula to the early tail-bud stage, as well as after mechanical relaxation in the early gastrula, were measured. An alternation of the periods of directed movements of large cell masses and local cell wanderings was detected. In both cases, the trajectories of individual cells consisted primarily of orthogonal segments. Cell movements were measured on two scales. At a small-scale consideration (time intervals of the order of several hours and distances of the order of tens of microns), fairly slight linear stretching and compressive deformations were detected, which looked like gentle smooth gradients along

which the upward morphogenetic movements of cells were directed. At a large-scale consideration (time intervals of the order of tens of minutes and distances of the order of microns), quasi-periodic fluctuations of velocities of individual cells partly correlated in time were found. The differences between these velocities generated microdeformations, which reached several tens of percent and developed within time intervals not more than 10 min. Measurements of relative magnitudes of mechanical forces influencing the cell walls suggests that microdeformations generate local stretching and compressive deformations modulating smoother tension gradients.

Keywords: gastrulation, morphogenetic cell movement, mechanical tension