

УДК 57.01+577

РОЛЬ МЕХАНОЗАВИСИМЫХ КЛЕТОЧНЫХ ДВИЖЕНИЙ В УСТАНОВЛЕНИИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ОСЕВЫХ ЗАЧАТКОВ У ЗАРОДЫШЕЙ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ

© 2017 г. Д. В. Бредов*, А. Ю. Евстифеева

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет
119234 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*E-mail: d2707bredov@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.08.2016 г.

Картировали траектории движений индивидуальных клеток и паттерны дифференцировки осевых зачатков в супрабластопоральных областях (СБО) целых зародышей шпорцевой лягушки, искусственно растянутых на стадии ранней гаструлы в поперечном направлении до 120–200% от начальной длины. Наблюдали нарушение свойственных СБО анизотропных клеточных движений продольного растяжения и латеро-медиальной конвергенции. Осевые зачатки возникали во всех случаях, но при умеренном (120–140%) растяжении их расположение было полностью разупорядочено и резко отличалось от нормальной топологии. Более сильное растяжение вызывало частичное упорядочение всего осевого комплекса и его реориентацию в направлении растяжения. Делается вывод, что сами по себе индукционные факторы определяют в СБО ближний порядок в их расположении, тогда как для установления дальнего порядка необходимы анизотропные клеточные движения любого направления. Умеренное поперечное растяжение разрушает нормально ориентированную анизотропию, но недостаточно для установления анизотропии, ориентированной перпендикулярно нормальной. Этим и объясняется беспорядок при малых растяжениях. Главный вывод работы состоит в том, что анизотропные натяжения эмбриональных тканей играют роль параметров дальнего порядка в клеточной дифференцировке.

Ключевые слова: гаструляция, морфогенетические движения клеток, механические напряжения, *Xenopus laevis*

DOI: 10.7868/S0475145017010037

ВВЕДЕНИЕ

Формирование плана строения осевых органов в развитии позвоночных животных является одной из центральных проблем биологии развития. В основе современных представлений на этот счет лежит модель диффузии сигнальных факторов, участвующих в первичной индукции (Kiecker and Niehrs, 2001; DeRobertis, 2009). При этом, хотя роль клеточных движений в разметке осевых зачатков (Stern et al., 2006) равно как и в региональной экспрессии *Hox* генов (Mallo et al., 2010) никоим образом не отрицается, принято считать, что сами по себе движения дифференцировку не определяют, а только правильно размещают уже коммитированные клетки. Однако в общепринятой модели имеется ряд неясностей и противоречий. Например, неясно, в какой мере региональное распределение различных типов осевых дифференцировок определяется локальными концентрациями морфогенетически активных веществ (морфогенов). Хотя в опытах *in vitro* такие зависимости показаны (Uochi and

Asashima, 1996), использованные концентрации морфогена (активина) значительно превышали физиологические (Furusawa and Kaneko, 2006).

Мы предполагаем, что механозависимые морфогенетические движения могут не только определять правильное размещение предварительно дифференцированных клеток, но и оказывать более глубокое влияние на клеточную дифференцировку. Об этом косвенно свидетельствует динамика свободного Ca^{2+} при дифференцировке осевых органов (Freisinger et al., 2008). Более прямые данные о дифференцировочной роли деформации зачатков получены в работе Корниковой с соавт. (Kornikova et al., 2010), где показано, что пан-нейральные гены экспрессируются в относительно сжатых, а гены мышечного актина — в растянутых областях экплантатов СБО.

Целью данной работы было более подробное исследование дифференцировочной роли механозависимых клеточных движений. Подвергая на стадии ранней гаструлы область зародыша, компетентную к формированию осевых зачатков по-

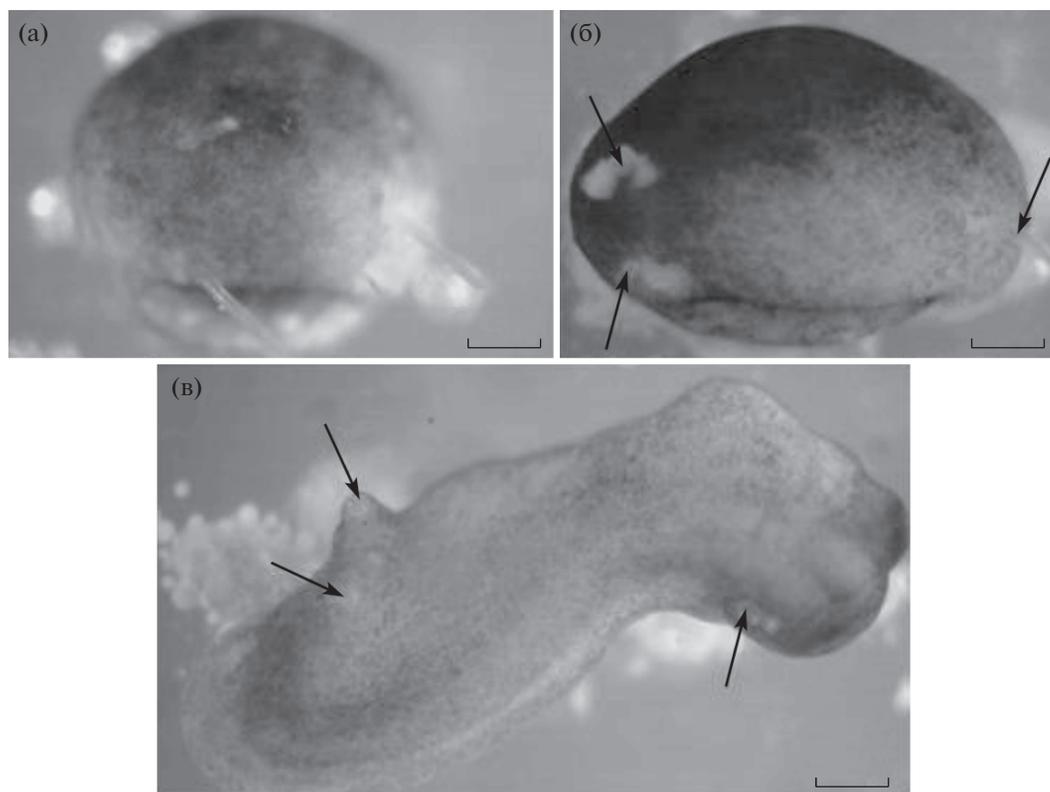


Рис. 1. Зародыш *X. laevis* на стадии 10.5 непосредственно перед поперечным растяжением (а), сразу после него (б) и через 20 ч (в). Стрелки указывают расположение тянущих игл, видимых в данной плоскости. Масштабные линейки по 300 мкм.

перечному растяжению, мы подавляли в ней нормальные морфогенетические движения и в результате получали хаотически расположенные зоны разных дифференцировок. Это показывает, что механозависимые клеточные движения играют более важную роль в “дифференцировочной разметке” зародыша, чем это представлялось раньше, а определяющие их механические натяжения – роль параметров порядка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Инкубация и растяжение образцов. Икру *X. laevis*, полученную методом гормональной стимуляции, культивировали в термостате при 14°C в 0.1 MMR. По достижении зародышами стадии ранней гастролы (10–10.5 по Nieuwkoop and Faber (1954)) их переносили в заливую 3% агаром чашку с однократным MMR (Ubbels et al., 1983), снимали с помощью двух металлических пинцетов желточную оболочку и растягивали вручную с помощью четырех стеклянных игл, размещая их по краям СБО. Растяжение проводили в направлении, поперечном передне-задней (антеро-постериорной, AP) оси зародыша (то есть перпендикулярно направлению естественного растяжения зародыша) в два приема с интервалом 5–10 мин.

Степень растяжения варьировала от 120 до 200%, принимая исходное расстояние между иглами за 100% (рис. 1, ср. а и б). Образцы содержали в растянутом состоянии при температуре 24–25°C в течение 19–24 ч, что соответствовало 15–18 стадии нормального развития. Типичный результат, полученный к этому сроку, показан на рис. 1в. Обратим внимание на то, что растянутый образец изогнут и его полярные области заходят за растягивающие иглы более чем на 40% общей длины. Это означает, что в тканях растянутого образца генерируется внутреннее давление, ориентированное в направлении растяжения (см. Belousov et al., 2000).

Измерение и картирование траекторий индивидуальных клеток. С помощью бинокля Olympus SZX9 и камеры DCM-130 в течение 240 мин проводили с интервалом в 1 мин цейтраферную микروفотосъемку дорсальной стороны интактных и растянутых зародышей. Обработку полученных серий изображений проводили в программе ImageJ, плагин MTrackJ. С помощью данной программы вручную отмечали положение *выбранных клеток через 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

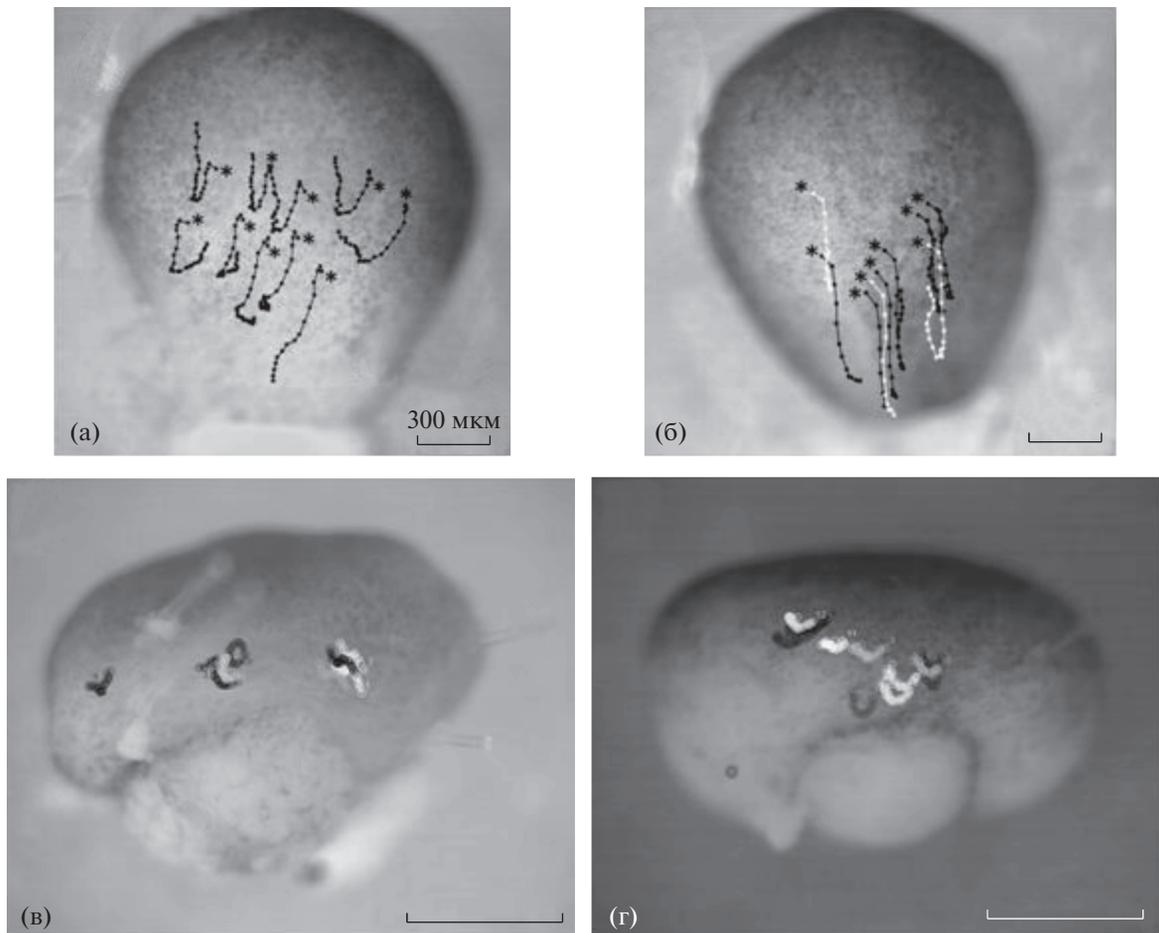


Рис. 2. Траектории клеточных движений на дорсальной поверхности нормальных (а, б) и поперечно растянутых (в, г) образцов, отслеженные в течение 4 часов.

данной клеткой. По отмеченным точкам программа строила траектории движения клеток и выдавала положения отмеченных точек в прямоугольной системе координат по осям X , Y . Для каждого зародыша прослеживали траектории не менее 10 клеток.

Гистология. По окончании инкубации зародыши фиксировали в жидкости Буэна и обрабатывали по стандартной методике для заливки в парафин. Изготавливали серии срезов толщиной 7 мкм, ориентированных параллельно растянутой дорсальной поверхности зародыша. Срезы окрашивали гематоксилином Эрлиха. Всего было исследовано 9 образцов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнение траекторий движений отдельных клеток в нормально развивающихся и поперечно растянутых образцах. В нормальных образцах, регистрируемых начиная со стадии 10.5, в течение первых 1.5–2 часов все клетки дорсальной области смещаются в сторону бластопора со скоростью

ми, обратно пропорциональными их начальным расстояниям до бластопора. В последующий период времени движения удаленных от бластопора клеток меняются на противоположные, так что их траектории выглядят как сильно сжатые петли (рис. 2а, 2б). В результате расстояние вдоль продольной оси зародыша между приближенными к бластопору и удаленными от него клетками возрастает в течение всего 4-часового периода наблюдений, причем с некоторым ускорением. Это соответствует удлинению зародыша в передне-заднем направлении. Одновременно те же клетки сближаются вдоль поперечных направлений, что соответствует латеро-медиальной конвергенции (рис. 2а). В соответствующих областях поперечно растянутых образцов (рис. 2б, 2в) продольная компонента клеточных движений почти полностью подавлена, но петлеобразность клеточных траекторий сохраняется, хотя петли сильно “раскрыты”.

Рис. 3 иллюстрирует анизотропию клеточных движений на дорсальной поверхности нормальных и поперечно растянутых зародышей. Ее оцени-

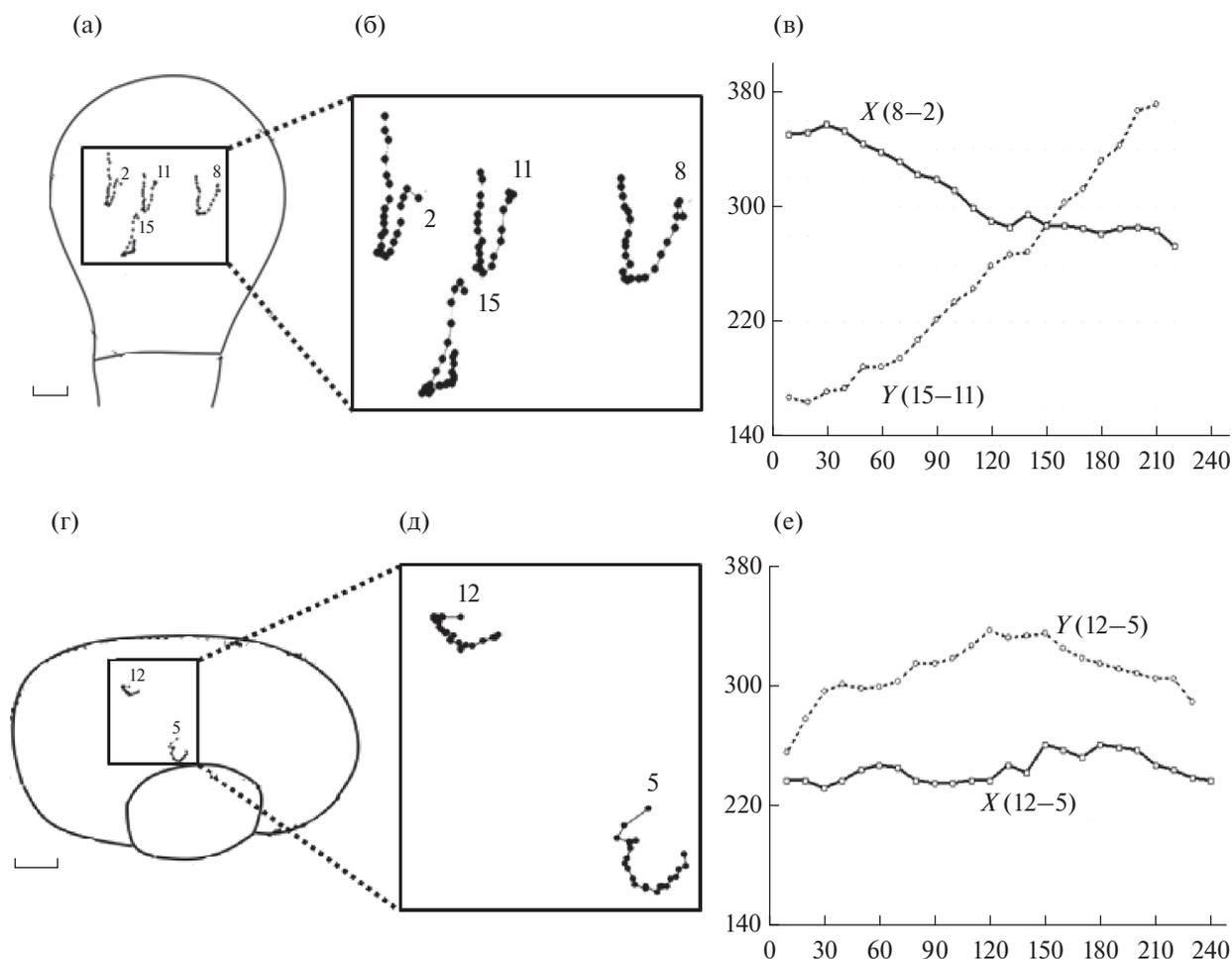


Рис. 3. Анизотропия клеточных движений на дорсальной поверхности нормальных зародышей и ее отсутствие в гомологичных областях растянутых образцов, (а, г): схематические карты целых зародышей и их выноски (б, г) с указанием траекторий, использованных для измерений. (в, е): графики расстояний между клетками с указанными номерами вдоль поперечных и продольных осей (оси X и Y соответственно). Горизонтальные оси: время, минуты. Вертикальные оси: расстояния, микроны. Масштабные линейки по 200 мкм.

вали, сравнивая изменения расстояний между избранными клетками вдоль поперечной и продольной оси зародыша (оси X и Y соответственно) в течение 4 ч развития. Как видно из рис. 3в, 3е, у нормальных зародышей продольные расстояния возрастают, а поперечные уменьшаются, что указывает на постоянное возрастание анизотропии. В то же время у поперечно растянутых зародышей движения по обеим осям более вариабельны и их отношения в среднем остаются постоянными, то есть анизотропия отсутствует.

Паттерны расположения осевых зачатков в поперечно растянутых зародышах. Взаимное расположение и форма осевых зачатков отклонялась от нормальных показателей во всех растянутых образцах. При этом наблюдали два варианта нарушений. При относительно слабом поперечном растяжении (120–140%) основные зачатки располагались произвольно относительно друг друга и

главных морфологических осей (рис. 4). Контактующие в норме зачатки хорды и нервной ткани были разобщены слоем недифференцированных клеток (рис. 4а). Серии сомитов могли располагаться вплотную к слуховому пузырьку (рис. 4б). Зачатки хорд были местами подковообразно изогнуты, и в этом случае сомиты располагались только на их выпуклой (растянутой) стороне, а нервная ткань — на вогнутой (рис. 4г). Нейральные зачатки были смещены из нормального дорсо-медиального положения и представлены двумя–тремя разобщенными доменами, вытянутыми вдоль поперечной оси зародышей. У одного образца наблюдали комплексное образование переднеголовных структур (присоски, нейральных тканей и зачатков глаза или слуховых пузырьков) в двух различных участках, расстояние между которыми составляло треть длины целого зародыша (рис. 4в, показана одна такая группа). Участки

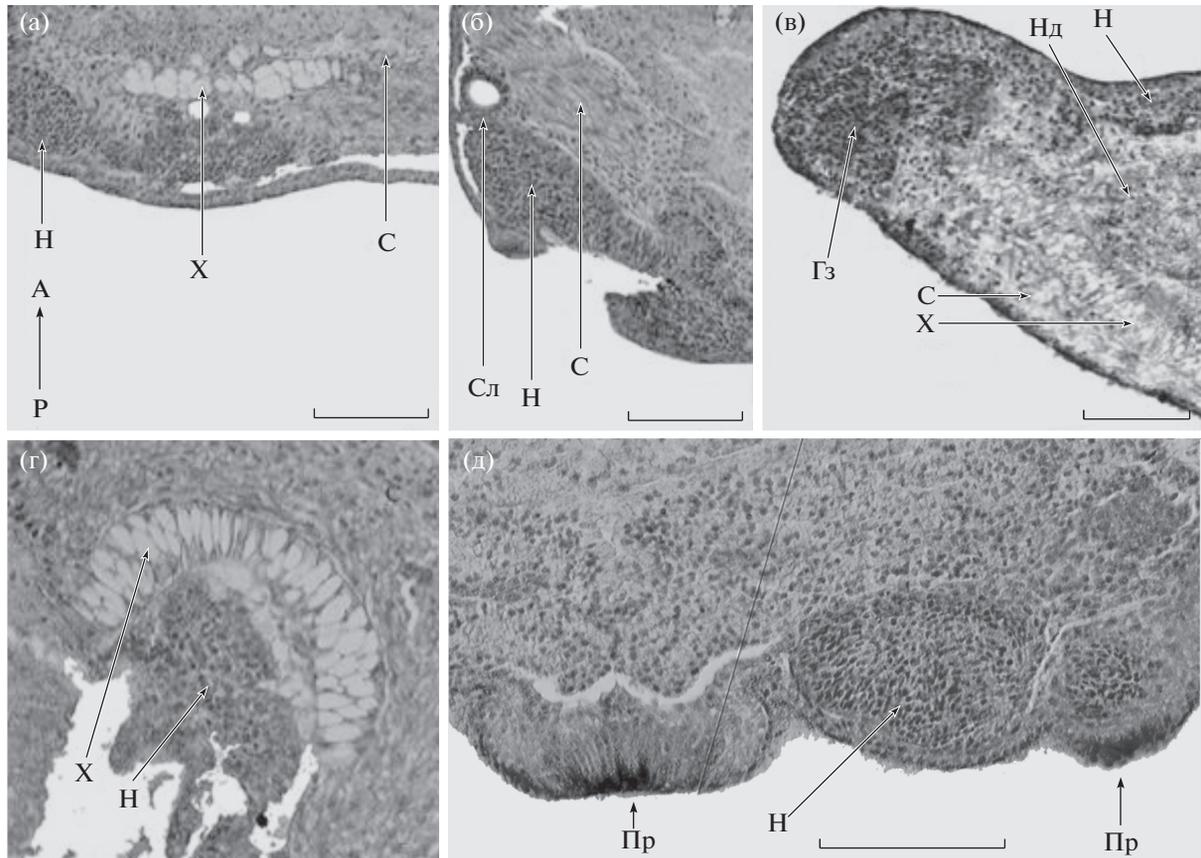


Рис. 4. (а–д) Варианты взаимного расположения морфологических структур в СБО зародышей шпорцевой лягушки через 20–24 ч поперечного растяжения. АР – антеро-постериорная ось. Гз: глазной зачаток. Н: нервная ткань. Нд: ткань неустановленной дифференцировки. Пр: присоски. С: сомиты. Сл: слуховой пузырек. Х: хорда. Масштабные линейки по 200 мкм.

нервной ткани могли располагаться между аномально удвоенными присосками (рис. 4д).

Сравнение паттернов осевых зачатков у образцов разной степени растяжения показало, что у сильно растянутых зачатков (>150%), ось которых переориентирована в направлении растяжения, морфологический порядок частично восстанавливается (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

В этой работе получено два основных результата. Первый из них состоит в том, что на стадии ранней гастрюлы весь комплекс осевых органов зародыша может быть переориентирован искусственным растяжением на 90° , причем это сопровождается генерацией внутреннего давления в направлении растяжения. Во-вторых, обнаружено, что относительно слабое растяжение в направлении, перпендикулярном нормальному, приводит к глубоким нарушениям взаимного расположения осевых зачатков в масштабах целого зародыша (т.н. дальнего пространственного порядка осевых зачатков). Каждый из этих выводов означает, что располо-

жение осевых зачатков к данной стадии развития не является строго predetermined gradientом морфогенов и может быть изменено механическими воздействиями. Также полученные данные ставят под сомнение ведущую роль упомянутых градиентов в установлении топологии осевых зачатков, поскольку непонятно, как последние могут модулироваться указанными воздействиями и привести к наблюдаемым результатам. Оценить роль каждого из факторов (механических и химических), а особенно взаимодействие между ними в целом организме сложно, но, несмотря на некоторую степень упрощения, подобную возможность предоставляют клеточные культуры. Имеются данные о влиянии различных механических параметров, в частности геометрии клетки (Ben-Zéve, 1991; Ingber et al., 1994; Opas, 1994; Davies, 1995; Reusch et al., 1996; цит. по Белоусов и др., 2000) и жесткости субстрата (Discher, Mooney and Zandstra, 2009, цит. по Farge, 2011) на экспрессию и направление дифференцировки клеток в культуре. Учитывая эти данные и также полученные нами результаты (см. особенно рис. 3 и пояснения к нему), можно выдвинуть гипотезу, что простран-

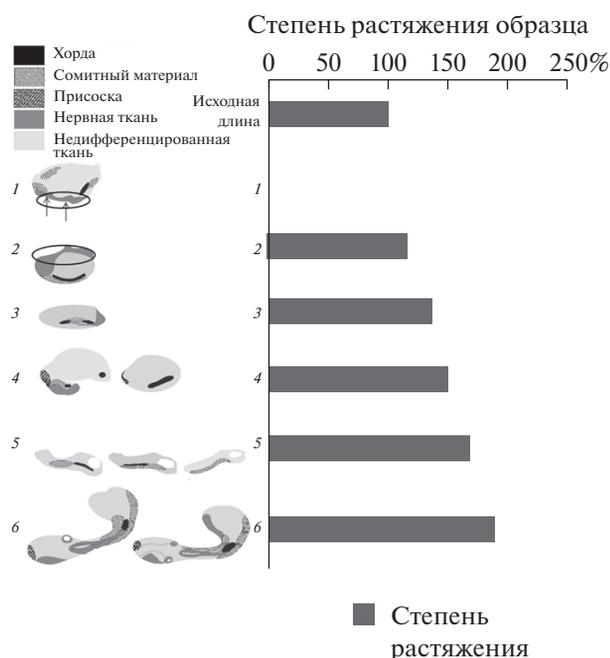


Рис. 5. Зависимость расположения зачатков (схемы в левой части рисунка) от степени поперечного растяжения образцов (столбцы в правой части). При растяжении более 150% образцы приобретают осевую.

ственная разметка клеточной дифференцировки может быть основана на анизотропных клеточных движениях, приводящих к взаимно перпендикулярному растяжению-сжатию материала дорсальной области зародыша.

Мы предполагаем, что роль диффундирующих морфогенов состоит не в предоставлении позиционной информации, а в расширении (по сравнению с неиндуцированными клетками) совокупности возможных направлений клеточных дифференцировок (проспективных потенций). Остановимся более подробно на эффекте утраты дальнего пространственного порядка, поскольку он не интерпретируем в рамках традиционных концепций современной эмбриологии, но хорошо описывается фундаментальными понятиями физики нелинейных систем.

То, что принято обозначать как “факторы развития”, изучение которых считается основным предметом эмбриологии, точно соответствуют понятию “причин” в их классическом линейном понимании, а именно как “on-off” переключатели, действие которых либо стимулирует, либо подавляет развитие той или иной закладки. Именно такая роль приписывается индукторам, генам и т.п. Обычно их рассматривают как носителей специфической информации для последующих стадий развития. Весь эмбриогенез понимается как цепь таких переключений.

Но эффекты упорядочения–разупорядочения явным образом не подпадают под эту схему. Ведь использованные механические воздействия специально не ингибируют и не стимулируют дифференцировку осевых зачатков – все типы дифференцировок осуществляются примерно с одинаковой вероятностью как при нормальных паттернах напряжений, так и при их нарушениях: последние влияют только на пространственный порядок. Отсутствует также прямая связь между изменениями геометрии клеточных движений и расположением основных дифференцировок: если бы роль первых состояла только в деформации уже predetermined “карты дифференцировок” (обычно ее называют картой презумптивных зачатков), то изменения взаимных расположений зачатков были бы гомеоморфными. Это означает, что их нормальная топология сохранялась бы, и наблюдаемых в экспериментах разрывов и транслокаций зачатков не должно было быть. Точно так же не могло бы ожидать восстановления порядка при увеличении растяжений, когда, казалось бы, деформации должны быть наибольшими. Мы объясняем это тем, что сильные растяжения могут частично восстановить анизотропию клеточных движений – в данном случае перпендикулярно нормальному направлению – тогда как более слабые только разрушают нормальную анизотропию.

Смена порядка на беспорядок и обратно – это коллективное явление, которое не может быть описано какой-либо комбинацией однозначных линейных причинно-следственных связей – для этого необходимо использовать понятие параметрического управления, связанного, в данном случае, с так называемым параметром порядка. Параметр – термин, используемый в математическом моделировании для описания величин, изменяющихся на порядок медленнее динамических переменных (т.е. за время наблюдения системы изменяющихся незначительно). Проиллюстрируем это простыми физическими примерами. В таких средах как вязкие жидкости или химические смеси для реакции Белоусова–Жаботинского движение молекул при относительно низких температурах беспорядочно; однако при повышении температуры возникают закономерно расположенные направленные конвекционные потоки (ячейки Бенара) или области повышенной концентрации молекул (см. например Николис и Пригожин, 1979). И то, и другое – проявления дальнего порядка, характерные масштабы которого на много порядков величин превышают масштабы межмолекулярных взаимодействий. В данных примерах в роли параметра порядка выступает температура, в которой понятным образом никак не может содержаться какая-либо “информация” или “инструкции” о дальнем порядке. Поля механических на-

пряжений — это другой физический фактор, играющий аналогичную роль.

Конечно, описанные выше эффекты — далеко не единственные, указывающие на необходимость введения в эмбриологию понятия параметрического управления вообще и параметра порядка — в частности. Высказанное выше предположение, что морфогены определяют делокализованные дифференцировочные потенции также означает, что они выполняют функции параметров. Вообще достаточно глубокий анализ любой последовательности процессов развития приводит к необходимости ввести такие понятия. Однако эффекты нарушения и восстановления пространственного порядка свидетельствуют об этом с наибольшей наглядностью.

Работа поддержана грантами РФФИ 14-04-32085 и 16-01-00504.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белоусов Л.В., Штейн А.А., Лучинская Н.Н., Копылова Н.В., Моисеева И.Н. Механические аспекты морфогенеза эпителиальных пластов. М.: Изд-во Московского университета, 2000. 412 с.
- Евстифеева А.Ю., Белоусов Л.В. Микродеформации поверхности и регуляция клеточных движений в развитии шпорцевой лягушки // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 1. С. 3–14.
- Николис Г., Пригожин И. Самоорганизация в неравновесных системах. М.: Мир, 1979. 512 с.
- 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.
- Ben-Zéve A. Animal cell shape changes and gene expression // *Bioessays*. 1991. V. 13. № 5. P. 207–212.
- Davies P.F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction // *Physiological Reviews*. 1995. V. 75. № 3. P. 519–560.
- De Robertis E.M. Spemann's organizer and the self-regulation of embryonic fields // *Mech. Dev.* 2009. V. 126. P. 925–941.
- Discher D.E., Mooney D.J., Zandstra P.W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells // *Science*. 2009. V. 324. № 5935. P. 1673–1677.
- Farge E. Mechanotransduction in development // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2011. V. 95. P. 243–265.
- Freisinger I., Schneider T., Westfall A., Slusarski D.C. Calcium dynamics integrated into signaling pathways that influence vertebrate axial patterning // *Phil. Trans. R. Soc.* 2008. V. 363. P. 1377–1385.
- c. Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis // *International Review of Cytology*. 1994. V. 150. P. 173–224.
- Kiecker C., Niehrs C. A morphogen gradient of Wnt/ β -catenin signaling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus* // *Development*. 2001. V. 128. P. 4189–4201.
- Mallo M., Wellik D.M., Deschamps J. Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan // *Dev. Biol.* 2010. V. 344. P. 7–15.
- Opas M. Substratum mechanics and cell differentiation // *International Review of Cytology*. 1994. V. 150. P. 119–137.
- Reusch P. et al. Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells // *Circulation Research*. 1996. V. 79. № 5. P. 1046–1053.
- Stern et al. Head-tail patterning of the vertebrate embryo: one, two or many unresolved problems // *Int. J. Dev. Biol.* 2006. V. 50. P. 3–15.
- Ubbels G.A., Hara K., Koster C.H., Kirschner M.W. Evidence for a functional role of the cytoskeleton in determination of the dorsoventral axis in *Xenopus laevis* eggs // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1983. V. 77. P. 15–37.

Role of Mechano-Dependent Cell Movements in the Establishment of Spatial Organization of Axial Rudiments in *Xenopus laevis* Embryos

D. V. Bredov* and A. U. Evstifeeva

Department of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: d2707bredov@yandex.ru

Received August 28, 2016

Trajectories of individual cell movements and patterns of differentiation in the axial rudiments in suprablastoporal areas (SBA) in whole embryos of *Xenopus laevis* artificially stretched in the transverse direction up to 120–200% from the initial length at the early gastrula stage were mapped. We observed the impairment of anisotropic cell movements of longitudinal stretching and latero-medial convergence inherent for SBA. Axial rudiments occurred in all cases, but their location was completely impaired and dramatically different from the normal topology for moderate (120–140%) stretching. Stronger stretching caused a partial ordering of the whole axial complex and its reorientation toward stretching. We concluded that induction factors determine short-range order in their arrangement in SBA, whereas anisotropic cell movements in any direction are needed for long-range order. Moderate transverse stretching destroys normally oriented anisotropy, but it is not enough for establishment of the anisotropy oriented perpendicular to the normal. This explains the disorder at light stretching. The main conclusion of this study is that anisotropic tensions of embryonic tissues play role of long-range order parameters of cell differentiation.

Keywords: gastrulation, morphogenetic cell movements, mechanical stresses, *Xenopus laevis*