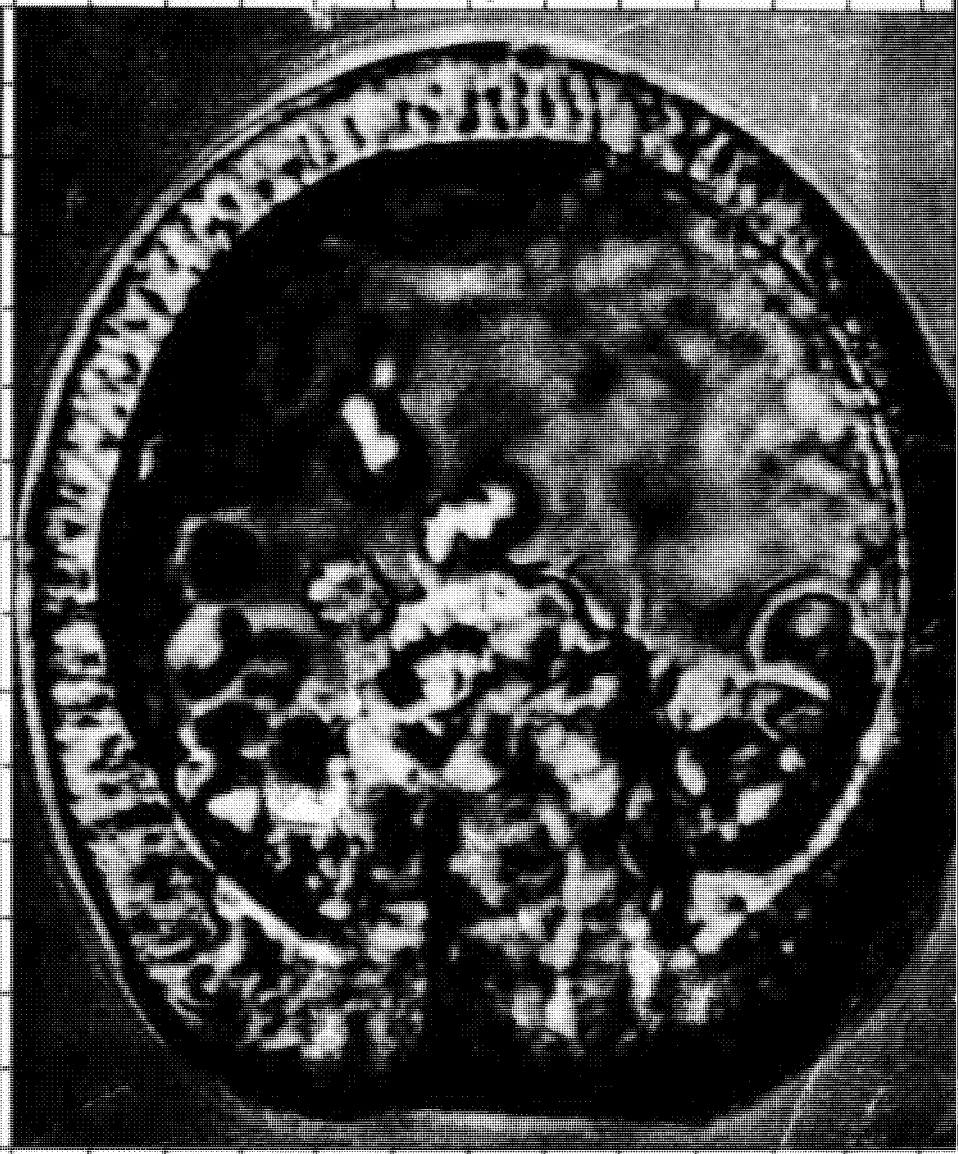
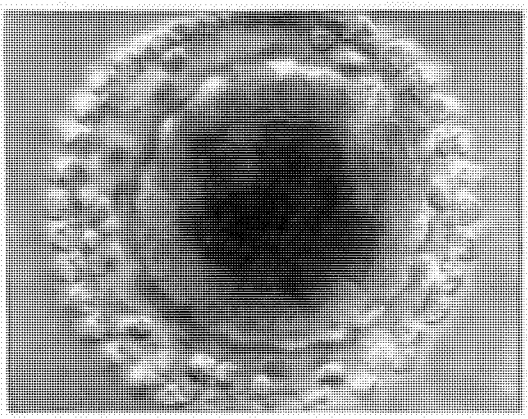
С. Гилберт

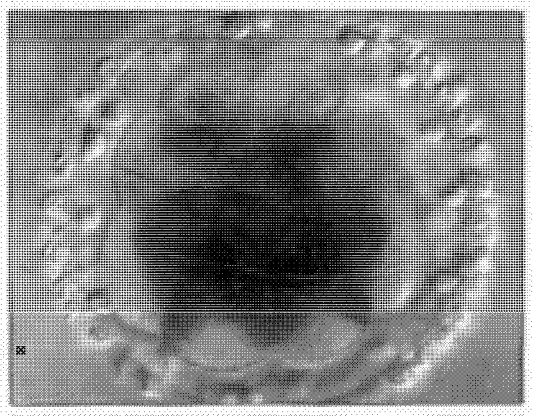
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

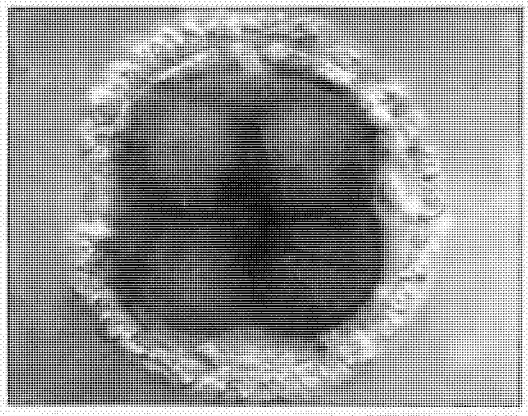
Издательство «Мир» Москва

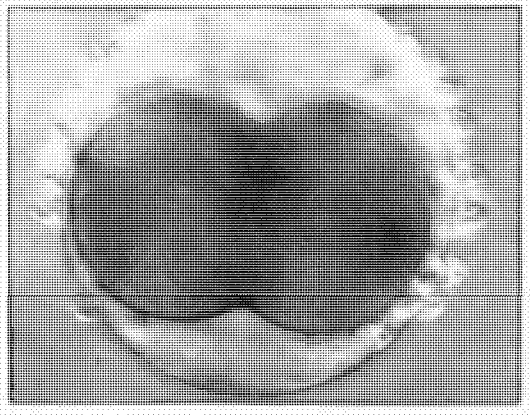
1

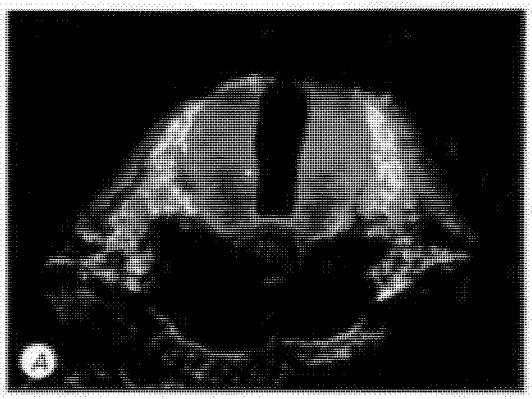












***Миграция** клеток нервного гребня у куриного зародыша*

Миграцию клеток нервного гребня у куриного зародыша можно проследить, окрашивая эти клетки флуоресцирующими антителами. Было обнаружено, что клетки нервного гребня (светло-зеленые) мигрируют через передние, а не через задние области сомитов. Такой особый характер миграции клеток нервного гребня играет какую-то роль в определении местоположения периферических нейронов. Глава 5. (Фотография любезно предоставлена M. Bronner-Fraser.)

***Цитоплазматическая** локализация у зародышей оболочников*

В процессе дробления цитоплазма яйца разделяется на отдельные клетки. В области желтого серпа у зародышей *Styela* локализуется небольшая группа клеток, которая дает начало мускулатуре личинки. Глава 3. (Фотографии 2-, 4-, 16- и 64-клеточных зародышей любезно предоставлены J. R. Whittaker.)

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Developmental Biology

Second Edition

SCOTT F. GILBERT
SWARTHMORE COLLEGE

Sinauer Associates, Inc. • Publishers
Sunderland, Massachusetts

С. Гилберт

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

В 3-х томах

Перевод с английского
д-ра биол. наук А. С. Гинзбург,
д-ра биол. наук Г. М. Игнатьевой

под редакцией
д-ра биол. наук С. Г. Васецкого,
д-ра биол. наук Т. А. Детлаф

1

«Мир» Москва
1993

ББК 28.0
Г47
УДК 57

Гилберт С.
Г47 Биология развития: В 3-х т. Т. 1: Пер. с англ.—М.: Мир, 1993.—228 с., ил.
ISBN 5-03-001831-X

Фундаментальное учебное и справочное пособие по относительно новой, быстро развивающейся дисциплине — биологии развития. На русском языке выходит в 3-х томах. В первом томе описаны оплодотворение, дробление, гаструляция и раннее развитие позвоночных.

Для эмбриологов, молекулярных биологов, генетиков, цитологов и др. специалистов-биологов, а также студентов биологических факультетов.

1907000000
Г 1909000000—264 подписное
041 (01)—93

ББК 28.0

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-001831-X (русск.)
ISBN 5-03-001830-1
ISBN 0-87893-248-8 (англ.)

© 1988 by Sinauer Associates, Inc.
© перевод на русский язык, Гинзбург А. С., Игнатьева Г. М., 1993

Предисловие редакторов перевода

Биология развития — относительно молодая междисциплинарная наука, возникшая на основе достижений экспериментальной эмбриологии и цитологии, молекулярной биологии и молекулярной генетики, а также физиологии. Уже одно это показывает, сколь трудна и на первый взгляд неосуществима задача совместного анализа результатов перечисленных наук и осмысливания на их основе закономерностей индивидуального развития. Между тем такая синтетическая наука возникла, и объем доступных ее рассмотрению процессов развития все более расширяется, а число научных статей, журналов и книг по этим вопросам во всем мире лавинообразно увеличивается. В этих условиях написать учебник, в котором хотя бы выборочно были представлены достижения этой бурно развивающейся науки, не просто и в то же время очень важно. Скотт Ф. Гилберт успешно решил эту задачу.

Книга Гилберта во многих отношениях представляет собой уникальное руководство. Оно отличается широтой охвата явлений и комплексным подходом к их освещению. Рассматривая тот или иной процесс или период развития, автор использует данные, полученные при изучении развития зародыша разнообразными методами на всех уровнях его организации — от организменного до молекулярного. При этом пониманию приводимого в книге материала, во многом нового и трудного не только для студентов, которым автор адресует свою книгу, но и для специалистов, работающих в разных областях биологии развития, чрезвычайно способствуют ясность и логичность изложения, в частности принятое автором правило — разъяснять происхождение и значение любого малоизвестного или недавно введенного термина и кратко суммировать содержание отдельных глав, обосновывая переход от одной главы к следующей. Важную роль играют многочисленные иллюстрации, обстоятельные подписи к которым существенно дополняют текст.

Когда читаешь книгу Гилберта, то, несмотря на присущую ему строгость изложения научного материала, ощущаешь его взволнованность по поводу описываемых явлений, поразительного множества и сходства лежащих в их основе молекулярно-генетических процессов. Увлеченность автора не может оставить равнодушными и его читателей. Некоторые разделы книги будут с таким же увлечением читаться и начинающими, и опытными исследователями. Тот факт, что в книге изложены не только решенные вопросы, но и вопросы, требующие дальнейшего изучения, должен, как пишет автор, пробудить творческую инициативу читателя и привлечь молодых исследователей к участию в разработке проблем биологии развития.

Если заглянуть в предысторию современной биологии развития, то в нашей стране она связана с именами крупнейших ученых — Н. К. Кольцова, И. И. Шмальгаузена, И. А. Филипченко, Д. П. Филатова и М. М. Завадовского, труды которых заложили основы изучения причинных механизмов индивидуального развития уже в первые десятилетия XX века. В долысенковские и довоенные годы у нас возникли целые школы и большие коллективы научных сотрудников, разрабатывавших эти проблемы. Работы их пользовались мировой известностью. В военные и послевоенные годы, когда мировая наука сделала огромный скачок в область молекулярной биологии и молекулярной генетики, а позднее и в биологию развития, лишь немногим исследователям в нашей стране удавалось продуктивно работать в области экспериментальной зоологии, эмбриологии и генетики. К их числу принадлежит акад. Б. Л. Астауров, который при первой же возможности поставил вопрос о восстановлении исследований по проблемам индивидуального развития в нашей стране и в 1967 г. возглавил в системе Академии наук СССР Институт биологии развития, которому было присвоено имя Н. К. Кольцова. Институт издает журнал «Онтогенез» и серию обзорных монографий по разным проблемам биологии развития, а также отдельные статьи, книги и монографии в других отечественных и зарубежных изданиях.

В настоящее время биология развития как синтетическая наука изучается в разных научных учрежде-

ниях нашей страны и преподается в ряде университетов. Можно не сомневаться, что выход на русском языке прекрасно иллюстрированного и снабженного большими списками литературы учебника Гилберта окажется очень полезным не только для студентов и преподавателей, но и для широкого круга биологов и будет стимулировать дальнейший рост исследований в этой важной области знаний.

В заключение следует сказать, что на русском языке книга выходит в трех томах. Перевод сделан со второго издания. Однако ко времени редактирования нами третьего тома вышло уже третье переработанное и дополненное автором издание. С разрешения автора в третий том полностью включена новая 23-я глава, посвященная эволюционным аспектам эмбрионального развития; в остальные же главы третьего тома мы внесли авторские изменения и дополнения.

Детлаф Т. А., Васецкий С. Г.

Предисловие автора к русскому изданию

Биология развития — это, вероятно, наиболее широкая из всех биологических дисциплин. Исследователь, работающий в этой области, не ограничен каким-либо иерархическим уровнем организации: транскрипция глобиновых генов или возникновение жабер у аксолотля могут в равной степени привлекать его внимание. В своих исследованиях он не ограничен также какой-либо конкретной группой организмов или системой органов в организме. Можно сказать, что биология развития включает и интегрирует их все. Единственный путь возникновения всего лежит через развитие, и биология развития — ничто иное, как изучение каждой молекулы в клетке, клетки, ткани, органа и организма как функций времени. Теперь даже эволюцию рассматривают как функцию развития. Эволюция осуществляется путем наследственных изменений, происходящих в зародыше, и изменения, которые создали современную лошадь из ее пятипалого предка — это изменения, происходившие в зародыше. Таким образом, биология развития является наукой, охватывающей наибольший спектр биологических проблем.

Это также одна из самых своеобразных наук. Биология развития — наука о становлении, а не о существовании. Она свергает гегемонию взрослого организма. Взрослая особь — только конечная стадия длинного ряда взаимодействий, создавших ее. Для исследователя в области биологии развития процесс возникновения намного важнее и интереснее, чем процесс поддержания созданной формы. Биология развития является также областью (если можно назвать областью то, что объясняет все в живой природе), в которой постановка проблем имеет такое же большое значение, как и их решение. Нами исследована только незначительная часть процессов развития, и объяснять механизмы развития на основе этих знаний — примерно то же, что описывать жизнь океана, изучая оставшиеся после отлива лужи. Бо́льшую часть процесса развития еще предстоит познать.

На протяжении последних сорока лет биология развития накапливала новые, все более утонченные методы исследования. В частности, объединение эмбриологии с молекулярной биологией и иммунологией дало в руки ученых могущественные орудия. Моноклональные антитела, меченные флуоресцентными соединениями, являются красителями, которые способны различать в пептиде индивидуальные аминокислоты. Радиоактивная рекомбинантная ДНК может обнаружить в популяции клеток одну единственную молекулу мРНК. Эти новые методы используются теперь для того, чтобы ответить на вопросы о процессах индукции и дифференцировки, которые эмбриологи-экспериментаторы задавали шестьдесят лет тому назад. Но это только начало революции, включающей соединение генетики развития с эволюционной биологией для создания новой теории эволюции, которая могла бы объяснить макроэволюционные изменения.

Зависимость между развитием и видообразованием привлекала к себе особенно большой интерес русских исследователей, начиная с К. Э. фон Бэра и А. Ковалевского. В самом деле, вопросы о связи зародышевого развития с эволюцией были поставлены А. Н. Северцовым и И. А. Филипченко в 1920-х годах как вызов эволюционной биологии. Как указал историк Марк Адамс, Филипченко был первым, кто ввел понятия «макроэволюция» и «микроэволюция». Генетик Филипченко полагал, что генетика может объяснить микроэволюционные изменения, однако объяснения причин макроэволюционных изменений следует искать в развитии. Морфолог Северцов также отмечал, что хотя генетика и достигла больших успехов, она не объяснила морфологических различий между высшими таксонами. Ученик Северцова И. И. Шмальгаузен увидел в пластичности развития решающий фактор дальнейших эволюционных изменений и постулировал механизмы возникновения различий в морфологии животных на основе изменений процессов развития. Однако, хотя еще Вильгельм Ру упоминал о необходимости «механики развития филогении», первые шаги в этом направлении были предприняты только Д. П. Филатовым (1876—1943), который перенес эволюционные поня-

тия из морфологии в экспериментальную эмбриологию. И если в других странах эти вопросы в значительной степени были преданы забвению, то в Советском Союзе они остались важнейшим компонентом эмбриологических программ. Эту важную традицию сохраняли, в частности, Т.А. Детлаф и А.С. Гинзбург, чьи работы по механике развития проводились в филогенетическом аспекте. Биология развития в ближайшем будущем будет стремиться найти молекулярные основы тех изменений в развитии, которые обусловливают морфологическую эволюцию. Поэтому я ожидаю, что советские биологи развития будут применять новые молекулярные и иммунологические методы, чтобы приблизиться к решению этих вопросов — вопросов, которые были частью их исследовательских программ с того времени, когда фон Бэр и А. Ковалевский связали изменения в развитии с возникновением новых таксонов. Поэтому мне особенно приятно, что эта книга переводится на русский язык.

В настоящем руководстве я сознательно стремился стереть некоторые традиционные границы, отделявшие биологию развития от эволюционной биологии и генетики. Я уверен, что в течение ближайшего десятилетия такие границы будут постепенно стираться. В книге также делается попытка с одинаковым вниманием рассмотреть морфологические и молекулярные подходы к биологии развития. В первой части книги особое внимание уделено морфологическим подходам и заложены основы для понимания результатов излагаемых исследований с помощью молекулярных методов. Вторая часть книги посвящена проблеме клеточной дифференцировки; в ней показано, как методы молекулярного анализа позволили по-новому взглянуть на механизмы возникновения различий между клетками. В третьей части рассматриваются вопросы, связанные с интеграцией молекулярного и морфологического подходов при изучении морфогенеза.

Я старался расположить материал в таком порядке, чтобы предшествующие главы могли служить основой для понимания последующих. В результате некоторые главы занимают необычное для них место. Так, книга начинается с оплодотворения и заканчивается гаметогенезом. Глава, посвященная оплодотворению, содержит большой раздел о строении гамет, рассмотрение же деталей процесса гаметогенеза отложено до конца книги, когда студенты смогут понять сложные вопросы, связанные с генной активностью и межклеточными взаимодействиями. Изложение проблем гаметогенеза в конце книги не только позволяет использовать его как наиболее яркий пример процессов развития, но и возвращает книгу к предмету, послужившему ее началом.

Книга не претендует на то, чтобы быть последним словом в рассматриваемой области. Ее цель — стимулировать дальнейшие исследования. Как полагал фон Бэр, «поощрение и направление самостоятельных исследований даст для научного воспитания зрелой молодежи гораздо больше, чем чрезмерное регламентирование. Любовь к предмету исследования — это та почва, на которой прорастает семя и растение приносит плоды».

Скотт Ф. Гилберт

Предисловие

В предисловии к первому изданию этой книги я уподобил процесс ее создания эмбриогенезу. Работу над вторым изданием можно сравнить с метаморфозом — периодом резких изменений в организме. При сопоставлении обоих изданий у читателей может сложиться впечатление, что за прошедшие четыре года либо чрезвычайно быстро возрос объем наших знаний, либо чрезвычайно быстро эволюционировали животные.

Четыре года, прошедшие со времени публикации первого издания «Биологии развития», — это период реализации возможностей молекулярной биологии. Она начала играть роль связующего звена между генетикой и эмбриологией, роль, которая ей и предназначалась. Многие нерешенные вопросы, забытые на долгие годы, были поставлены вновь, чтобы решить их с помощью новой стратегии и новых методов. Этот период знаменателен также и тем, что помимо давно известных и ключевых объектов биологии развития, таких, как морской еж, лягушка и курица, появились и заняли достойное место в исследованиях новые объекты, а именно дрозофила и нематода *Caenorhabditis elegans*. За эти четыре года, кроме того, были достигнуты огромные успехи в понимании процессов роста как на макроскопическом, так и на микроскопическом уровнях. Прогресс в аллометрических исследованиях и исследованиях по онкогенезу привел к трансформации (непреднамеренный каламбур) науки о закономерностях роста в одну из наиболее интересных и увлекательных. Благодаря расширению наших знаний о молекулярных аспектах развития возросла и наша оценка значения явлений развития в эволюции и экологии. Исследования в любой области биологии стали невозможными без знания основ биологии развития.

Сохраняя верность избранной метафоре, можно сказать, что текст книги подвергся метаморфозу. Значительные изменения внесены в несколько глав, они были реконструированы и дополнены. Главы о детерминации развития зародышей были пересмотрены в свете новых данных о существовании цитоплазматических детерминантов даже у животных с выраженным регуляционным типом развития. Коренным образом пересмотрен материал в главах, касающихся транскрипции генов у эукариот. Теперь эти главы отражают новое понимание механизмов активации генов, что позволит учащимся обсуждать (если у них возникнет такое желание) значение регуляции активности генов у зародышей на уровне транскрипции (гл. 11), не вдаваясь в детали механизмов этого процесса (гл. 12). Из разделов «Дополнительные сведения и гипотезы» выросли (подобно органам из клеток имагинальных дисков) две совершенно новые главы. Первая из них (гл. 18) посвящена генетике развития зародыша у дрозофилы, во второй (гл. 20) — обсуждаются механизмы, контролирующие пролиферацию клеток при нормальном развитии и в процессе онкогенеза.

Еще две новые черты характеризуют второе издание. Во-первых, на внутренних сторонах обложки книги помещены цветные макро- и микрофотографии. Они отражают современные данные, для получения которых решающими явились различия в окраске (или естественные, или индуцированные экспериментально). Во-вторых, эпилог, посвященный некоторым аспектам развития, оставшимся нерешенными, является попыткой преодолеть «синдром учебников», когда научные знания стремятся представить как нечто полностью завершенное.

В процессе метаморфоза меняется многое, но организм не теряет своей идентичности. Сходным образом многое от формы и содержания первого издания сохранилось и в этой новой версии книги. Как и прежде, в ней я стремился расположить главы в такой последовательности, чтобы студент мог получить концептуальную основу, облегчающую ему понимание материала каждой последующей главы. Делается также попытка представить биологию развития как результат непрерывных настойчивых усилий исследователей, основанный на данных многократных наблюдений и строго контролируемых экспериментов. Поскольку данные всегда субъективны, я привожу в книге многочисленные ссылки на оригинальные работы, так что каждый, кто хочет

подробнее ознакомиться с той или иной проблемой, сможет прочесть эти работы.

Некоторым концепциям, изложенным в первом издании, в новом издании уделено больше внимания. Более чем когда бы то ни было, я убежден, что современная биология развития требует того, чтобы в ней были достойно представлены (разумеется избирательно) как организменный, так и молекулярный подходы к ее изучению. Наиболее интересные области исследований лежат, вероятно, на пересечении эти двух подходов, и я старался в разной степени интегрировать их в каждой главе. Я попыталась также сгладить некоторые границы, отделяющие биологию развития от эволюционной биологии и генетики, учитывая тот факт, что в течение прошедших четырех лет эти границы становились все менее и менее отчетливыми. Как и в первом издании, я увеличивал объем информации, включая разделы «Дополнительные сведения и гипотезы». Одни из этих разделов непосредственно относятся к материалу главы и связывают его с некоторыми сведениями из других областей биологии; другие же разделы содержат гипотезы и данные или слишком новые и неожиданные для биологов развития, или слишком противоречивые, чтобы включать их в основной текст.

Наконец, я бы хотел предостеречь студентов. В Лаборатории биологии моря в Вудс-Холе (шт. Массачусетс), где проводятся некоторые из наиболее важных эмбриологических исследований в США, можно увидеть написанный от руки плакат: «Изучай природу, не книги!». Этот призыв висит над главным входом в *библиотеку*, как напоминание о том, что мы пришли сюда, чтобы изучать развитие организмов, а не историю эмбриологических исследований. Этот призыв выдержан в том духе, что и афоризм Тзена, звучащий примерно так: если палец указывает на Луну, то только дурак может принять этот палец за Луну. Эту книгу и можно уподобить такому пальцу. Степень ее успеха будет оцениваться по тому, пробудит ли она у кого-нибудь желание отложить книгу в сторону и заняться изучением организмов.

Благодарности

Эта книга существенно выиграла от того, что многие исследователи нашли время внимательно прочитать черновую рукопись и сделать ценные замечания. К числу этих стойких и мужественных людей я отношу: P. Alberch, R. Auerbach, B. Baker, S. Black, H. и P. Bode, M. Bronner-Fraser, C. Buck, S. Carroll, B. Clark, J. Copeland, K. Crawford, C. Croce, K. Edwards, J. Fallon, G. Gilbert, M. Groudine, G. Grunwald, G. Guild, M. Hollyday, L. A. Jaffe, R. Keller, J. Lash, J. Lilien, A. Lopo, G. Loring, B. Migeon, S. Murphy, J. Newport, M. Oster-Granite, G. Philips, R. Raff, U. Rutishauser, R. Schultz, B. Shur, R. Tuan, W. Wood.

Кроме того, я не смог бы закончить книгу, если бы огромное число исследователей не согласились любезно предоставить мне фотографии, опубликованные на ее страницах.

Это издание, подобно предшествующему, в большой степени обязано своим появлением многочисленным предложениям и замечаниям студентов, слушавших мои лекции по биологии развития и генетике развития. Поддержка, оказанная мне сотрудниками Свартморского колледжа, также сыграла большую роль в появлении этой книги. Я должен поблагодарить E. Horikawa и M. Spenser, ученых-библиотекарей, доставлявших и хранивших для меня некоторые недавние издания, которые они должны были бы отдать в переплет. G. Flickinger помогал мне в проявлении фотографий, когда это требовалось. D. Stasiunas и L. Lee записали мою рукопись на магнитные диски, а T. Blackburn — сотрудник кафедры английской литературы — находил способы перехитрить неизбежные импульсные помехи.

Это издание — раритет среди современных учебников. Оно подготовлено тем же коллективом, который работал над первым изданием. Как и четыре года назад, Andy Sinauer сумел собрать тех же самых замечательных людей, работать с которыми было для меня большой честью. Мне хотелось бы выразить ему и C. Wigg, J. Vesely, J. Simpson, J. и B. Woolsey и R. Albrecht благодарность за проявленные ими мудрость и творческий подход.

Я благодарю также членов моей семьи и друзей за их терпимость, которую они проявляли по отношению ко мне все время, пока писалась эта книга. Теперь труд завершен!

Скотт Ф. Гилберт

Часть I

Как происходит развитие

Глава 1

Введение в изучение развития животных

Я прекрасно помню то острое чувство удовлетворения и восторга, с которым я часами слушал фуги Баха... и мне часто приходило в голову, что наслаждение, получаемое от музыкальных произведений такого рода... созвучно с тем, что я получаю при изучении очень многих морфологических проблем: перед вами проходит тема из произведения старого мастера, которая прослеживается во всех своих бесконечных вариациях, появляется вновь и вновь и напоминает о том, что в многообразии есть единство.

ТОМАС ХАКСЛИ (1895)

Счастлив человек, способный распознать причины явлений.

ВЕРГИЛИЙ (37 до Р.Х.)

Введение

Аристотель, первый из известных нам эмбриологов, писал, что наука начинается с того момента, когда вы испытываете чувство изумления. «Именно это чувство побудило человека заняться философией, и именно оно лежит в основе познания». На протяжении всей истории своего существования человек не переставал изумляться, наблюдая события, которые происходят в процессе развития животных; эти события, столь удивительные и в то же время такие обычные, неизменно побуждали искать их причины. Простая процедура — вскрывание куриных яиц день за днем на протяжении 3-недельного периода инкубации — позволяет увидеть, как тонкий валик клеток постепенно превращается в сложный организм птицы. Аристотель проделал этот опыт и проследил за формированием основных органов. Это явление может поражать воображение практически любого человека, но только ученый пытается ответить на вопрос, как именно протекает развитие. Более углубленное понимание этого процесса не рассеивает ощущения чуда, но лишь усиливает его.

Многоклеточные организмы не возникают полностью сформированными. Напротив, они формируются в результате сравнительно медленного процесса прогрессивных изменений, который мы называем **развитием**. Почти во всех случаях развитие многоклеточного организма начинается с одной клетки — оплодотворенного яйца, или **зиготы**, которая митотически делится и дает начало всем клеткам организма. Наука, изучающая развитие животных, по традиции называется **эмбриологией**, поскольку развивающийся организм на стадиях от оплодотворенного яйца до рождения носит название **эмбриона** или **зародыша**. Однако развитие не останавливается в момент рождения, не останавливается оно даже по достижении взрослого состояния. У большинства организмов развитие не прекращается на протяжении всей их жизни. У человека каждый день происходит замена более одного грамма клеток кожи (более старые клетки слущиваются) и ежеминутно в течение жизни в костном мозге образуются миллионы новых эритроцитов. Поэтому в последние годы о биологии развития принято говорить как о науке, включающей изучение не только эмбриогенеза, но и других процессов развития.

В настоящее время биология развития представляет собой одну из наиболее захватывающих и быстро прогрессирующих областей биологической науки. Привлекательность биологии развития связана отчасти с ее проблематикой, поскольку именно теперь мы приближаемся к пониманию молекулярных механизмов развития животных. Другой причиной является объединяющая роль в отношении разных биологических наук, которую биология развития на-

чинает принимать на себя. Она создает основу для интеграции молекулярной биологии, физиологии, биологии клетки, анатомии, онкологии, иммунологии и даже эволюционных и экологических исследований. Изучение эмбрионального развития организмов стало необходимым для понимания любой другой области биологии.

Основные особенности развития

Развитие выполняет две основные функции. Во-первых, в процессе развития создается разнообразие клеток и определяется последовательность событий в пределах каждого поколения и, во-вторых, обеспечивается непрерывность жизни при переходе от одного поколения к другому. Первая функция включает образование в организме всех разнообразных типов клеток и их организацию. Одна-единственная клетка — оплодотворенное яйцо — дает начало мышечным клеткам, клеткам кожи, нейронам, лимфоцитам, клеткам крови и клеткам всех других типов. Возникновение клеточного разнообразия называют **дифференцировкой**; процессы организации дифференцированных клеток в ткани и органы называют **морфогенезом** (создание формы и структуры) и **ростом** (увеличение размеров). Вторая основная функция развития — это **размножение**: последовательное воспроизведение новых особей данного вида.

Основные стадии развития животных иллюстрирует рис. 1.1. Новый организм возникает в результате слияния генетического материала двух гамет — спермия и яйца. Это слияние, называемое **оплодотворением**, побуждает яйцо к развитию. Совокупность стадий, последовательно наступающих вслед за оплодотворением, носит название **эмбриогенеза**. В животном царстве существует удивительное разнообразие типов эмбриогенеза, однако бóльшая их часть представляет собой те или иные вариации четырех основных типов.

1. Непосредственно после оплодотворения происходит дробление. **Дробление** — это ряд чрезвычайно быстро протекающих митотических делений, в результате которых огромный объем цитоплазмы зиготы разделяется на многочисленные более мелкие клетки. Эти клетки называют **бластомерами**, и к концу дробления они обычно образуют шар, носящий название **бластулы**.

2. После уменьшения скорости митотических делений бластомеры совершают энергичные перемещения, в результате которых их положение относительно друг друга изменяется. Эту серию клеточных перемещений называют **гаструляцией**. В результате гаструляции у типичного зародыша обычно образуются три клеточных пласта, называемые **зародышевыми листками**. Из наружного листка — **эктодермы** — возникают эпидермис и нервная система; **внутренний листок — энтодерма** — образует выстилку пищеварительной трубки и принимает участие в образовании связанных с ней органов (поджелудочной железы, печени и др.), и органов дыхания; средний листок — **мезодерма** — дает начало нескольким органам (сердцу, почкам, гонадам), соединительной ткани (костям, мышцам, сухожилиям и форменным элементам крови).

3. После возникновения трех зародышевых листков клетки, взаимодействуя между собой и перемещаясь, образуют органы. Этот процесс носит название **органогенеза**. (У позвоночных органогенез инициируется взаимодействием эктодермы с подстилающими ее в определенной области мезодермальными клетками; в результате этого взаимодействия эктодерма образует нервную трубку, в дальнейшем преобразующуюся в головной и спинной мозг.) Во многих органах содержатся клетки, происходящие от разных зародышевых листков, и нередко наружную часть органа образуют клетки одного зародышевого листка, а внутреннюю — другого. Кроме того, при органогенезе некоторые клетки совершают длительные миграции от места, где они возникли, до места окончательной локализации. К таким мигрирующим клеткам относятся предшественники форменных элементов крови и лимфы, пигментные клетки и гаметы.

4. Как видно на рис. 1.1, часть цитоплазмы яйца дает начало клеткам-предшественникам гамет. Эти клетки называют **первичными половыми клетками**, и они обособляются для осуществления репродуктивной функции. Все остальные клетки тела называют **соматическими**. Это разделение на соматические клетки (дающие начало индивидуальному организму) и половые (обеспечивающие возникновение нового поколения организмов), как правило, представляет собой один из первых этапов дифференцировки, которая происходит при развитии животных. Первичные половые клетки в дальнейшем мигрируют в гонады, где они дифференцируются в гаметы — клетки, способные участвовать в оплодотворении, которое приводит к возникновению новой особи. Развитие гамет, называемое **гаметогенезом**, обычно завершается к моменту достижения организмом половой зрелости. В зрелом организме гаметы высвобождаются и после оплодотворения дают начало новой жизни. Тем временем взрослый организм постепенно стареет и умирает.

Наше эукариотическое наследие

Организмы разделяются на две основные группы по признаку наличия или отсутствия в их клетках ядерной оболочки. По одну сторону разделительной линии в этой классификации находятся **прокариоты** (от греч. karyon — ядро), включающие бактерий

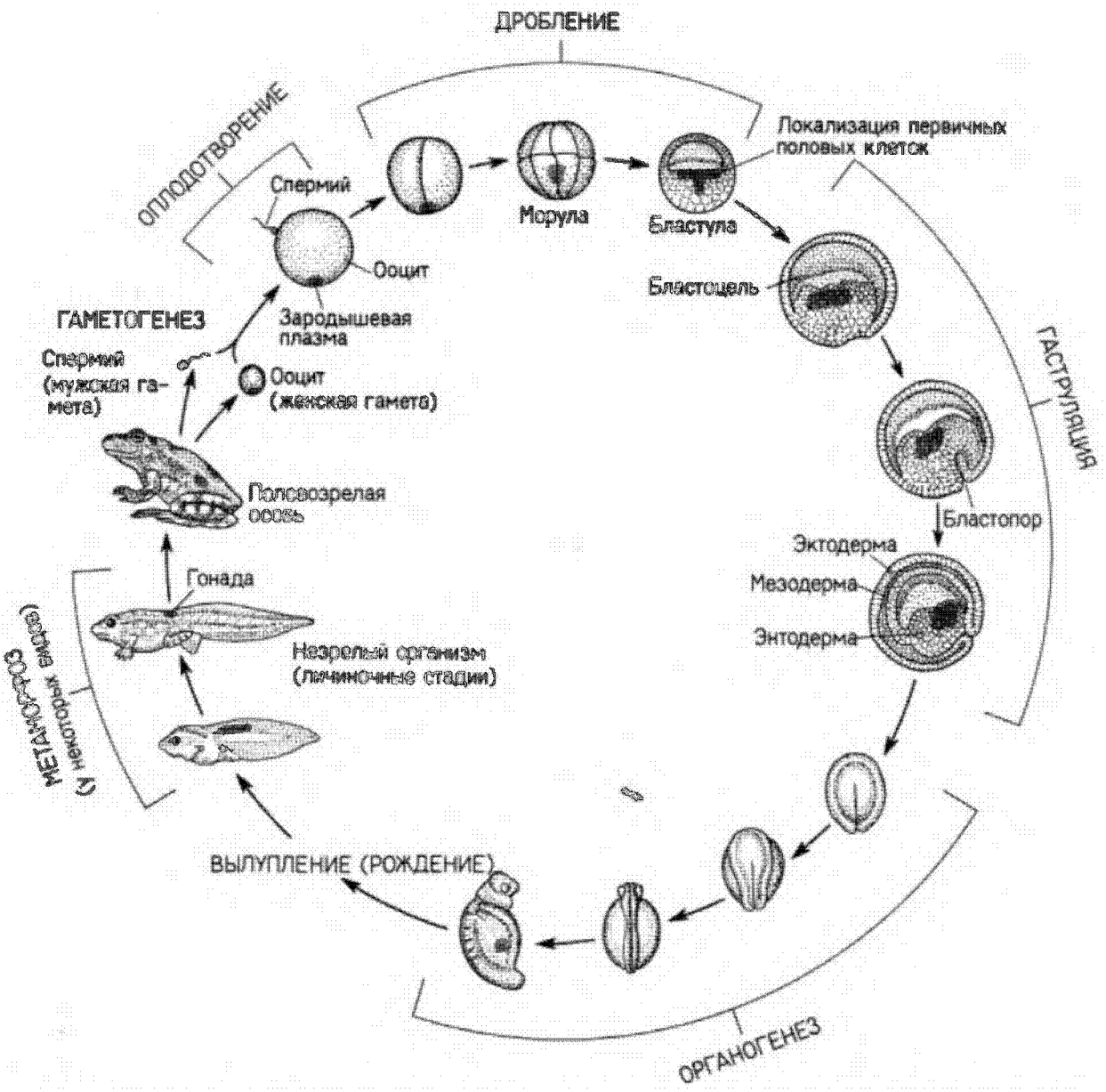


Рис. 1.1. Индивидуальное развитие животного на примере лягушки. Совокупность стадий от оплодотворения до вылупления (или рождения) называют эмбриогенезом. Область зародыша, из которой образуются половые клетки, выделена более темным цветом. Гаметогенез, завершающийся у половозрелого взрослого организма, у разных видов начинается на разных стадиях развития.

и сине-зеленые водоросли. Эти одноклеточные организмы лишены истинного ядра. По другую сторону находятся эукариоты, к которым относятся простейшие, животные, растения и грибы. Клетки эукариот имеют оформленное ядро, окруженное ядерной оболочкой и содержащее хромосомы. Это фундаментальное различие между эукариотами и прокариотами влияет на организацию и использование ими генетической информации. В обеих группах информация, необходимая для развития и осуществления обмена веществ, закодирована в последовательности нуклеотидов дезоксирибонуклеиновой кислоты хромосом (ДНК). Хромосома прокариот обычно представлена двойной спиралью ДНК кольцевой формы и небольшого размера — она содержит около миллиона пар оснований. В клетках эукариот обычно

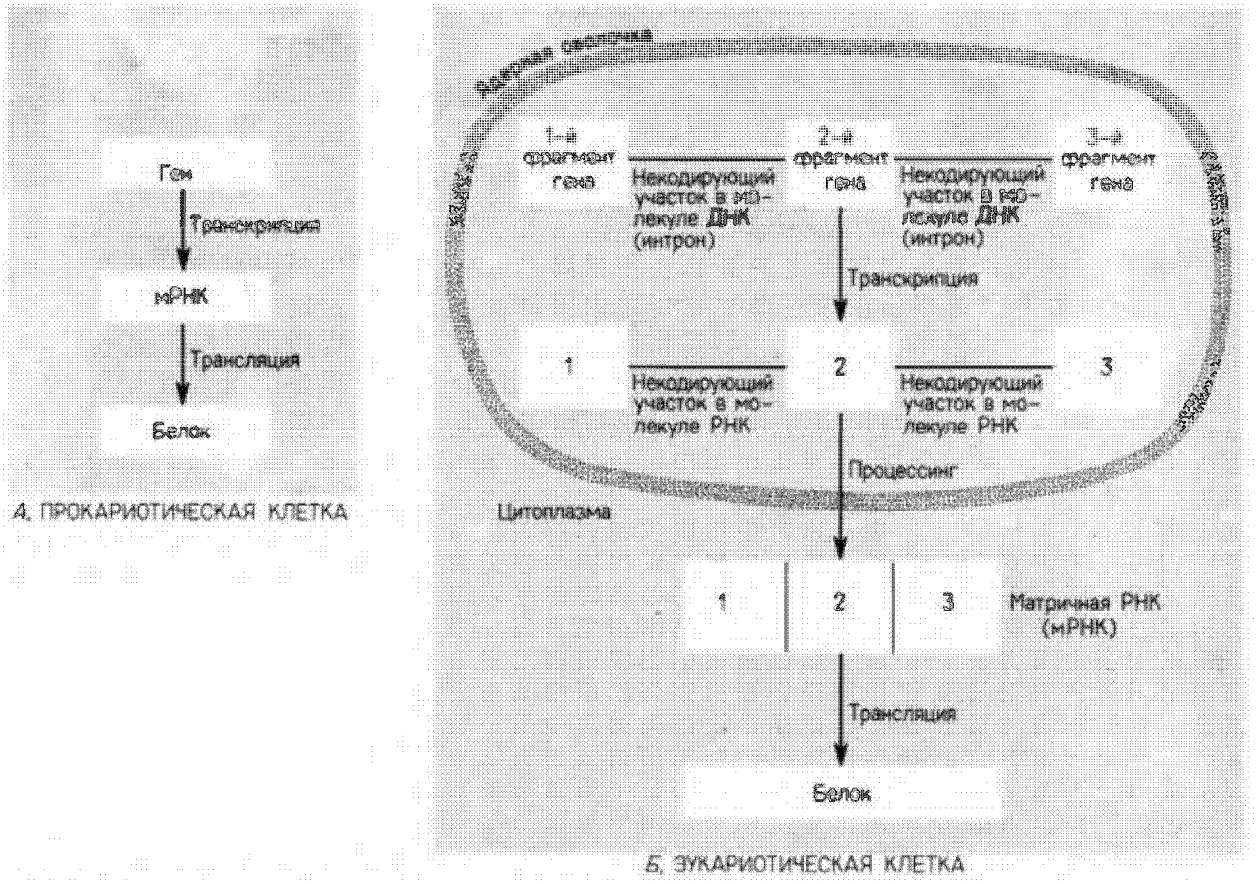


Рис. 1.2. Схема последовательных этапов синтеза белков. *А.* Экспрессия прокариотического (бактериального) гена: любой синтезируемый белковый продукт колинеарен кодирующим этот белок областям ДНК. *Б.* Экспрессия эукариотического гена: гены дискретны, ядерная оболочка отделяет ДНК от цитоплазмы.

имеется несколько хромосом, и количество ДНК даже у самых примитивных эукариотических простейших более чем в 10 раз превышает количество ДНК, имеющееся у наиболее сложно организованных прокариот. Кроме того, гены эукариот имеют более сложную структуру, чем гены прокариот. Последовательность аминокислот в белках у прокариот является прямым отражением нуклеотидной последовательности в молекуле их ДНК. В отличие от этого у эукариот кодирующая белок ДНК часто бывает разделена таким образом, что полная последовательность аминокислот в белке кодируется разобщенными ее участками (рис. 1.2). Принято считать, что вставочные некодирующие участки ДНК (интроны) необходимы для того, чтобы информационная рибонуклеиновая кислота (матричная РНК, или мРНК), кодирующая белок, могла пройти через ядерную оболочку (этот вопрос будет обсуждаться в гл. 13).

Эукариотические хромосомы также сильно отличаются от прокариотических. ДНК эукариот окружена специфическими белками, называемыми гистонами, благодаря которым она приобретает компактную структуру; у бактерий гистонов нет. Кроме того, в клетках эукариот в процессе митоза ядерная оболочка разрушается и два набора реплицированных хромосом равномерно распределяются между дочерними клетками (рис. 1.3). У прокариот клеточное деление происходит не по типу митоза: во-первых, не возникает митотического веретена, и, во-вторых, отсутствует ядерная оболочка, которая должна разрушаться при делении клетки. Дочерние хромосомы остаются прикрепленными к соседним участкам на клеточной мембране. Расстояние между этими участками увеличивается в результате роста клеточной мембраны между ними, так что хромосомы в конечном счете оказываются в разных дочерних клетках.

Механизмы генной регуляции у прокариот и эукариот различны. У обоих — и прокариот, и эукариот — РНК синтезируется путем транскрипции ДНК при участии ферментов, называемых РНК-

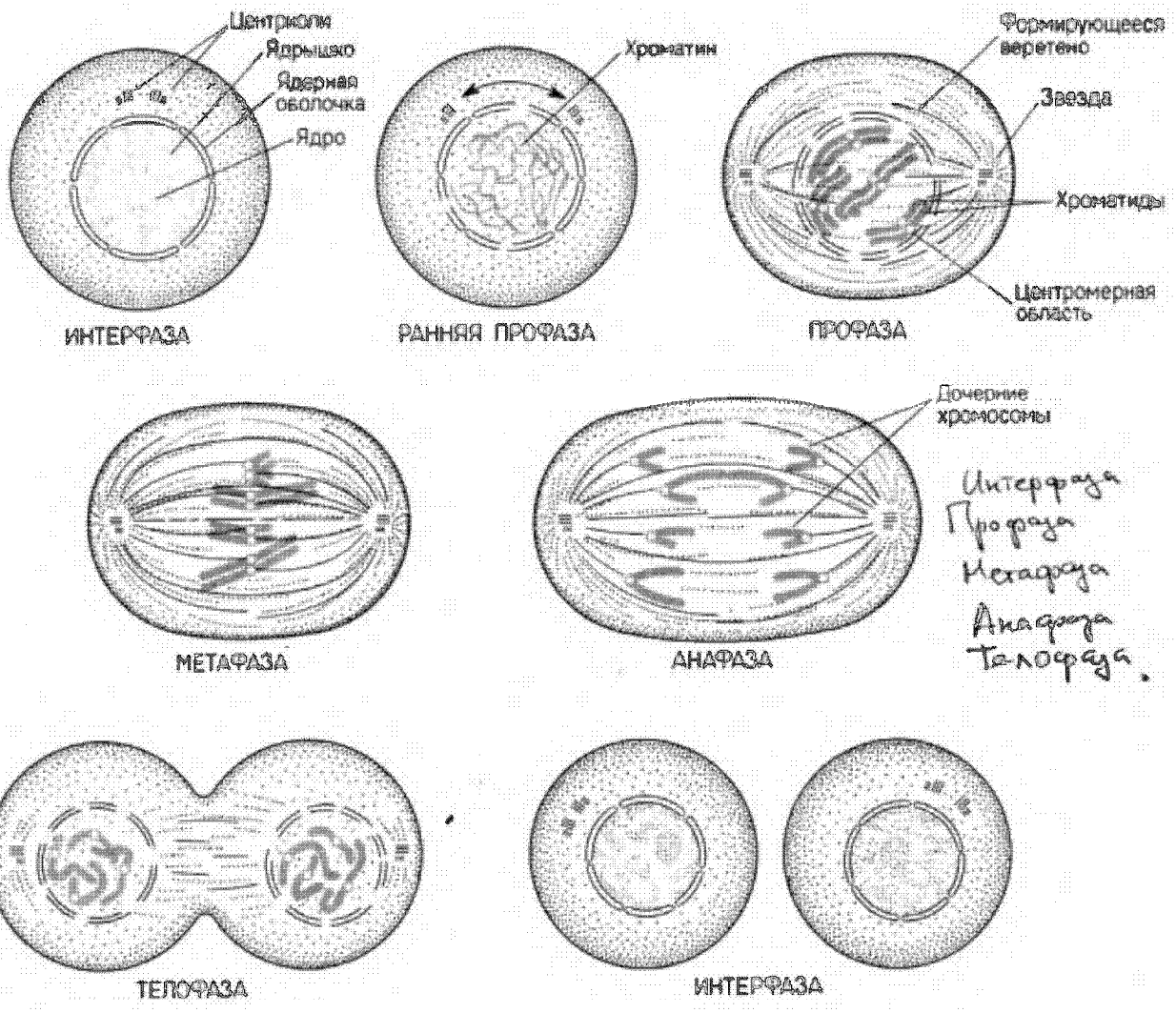


Рис. 1.3. Схематическое изображение митоза в животных клетках. Во время интерфазы при подготовке клетки к делению происходит репликация ДНК. Во время профазы ядерная оболочка разрушается и между двумя центриолями формируется веретено. На стадии метафазы хромосомы располагаются в экваториальной плоскости клетки. Когда наступает анафаза, удвоившиеся хромосомы (называемые хроматидами) расходятся. На стадии телофазы хромосомы достигают полюсов веретена, клетка начинает разделяться на две дочерние клетки. По числу и типу хромосом дочерние клетки идентичны материнской.

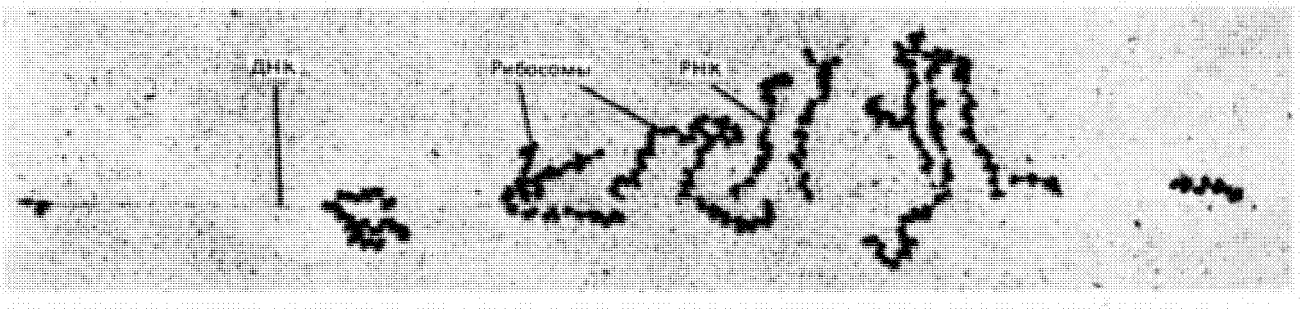


Рис. 1.4. Одновременность транскрипции и трансляции у прокариот. Участок ДНК *Escherichia coli* пересекает электронную микрофотографию по горизонтали. Транскрипты мРНК видны по обе стороны от нити ДНК. Рибосомы прикрепились к мРНК и синтезируют белки (которые не видны). Следует отметить, что длина синтезируемых мРНК увеличивается слева направо; это указывает на направление транскрипции. (С любезного разрешения O. L. Miller, Jr.)

полимеразами. У прокариот новосинтезированная мРНК немедленно начинает транслироваться с образованием белка, в то время как другой конец молекулы еще продолжает транскрибироваться с ДНК (рис. 1.4). Таким образом, транскрипция и трансляция у прокариот осуществляются одновременно и координированно. Существование ядерной оболочки у эукариот делает возможным совершенно новый тип клеточной регуляции. Рибосомы, ответственные за трансляцию, находятся по одну сторону ядерной оболочки, тогда как ДНК, а также РНК-полимераза, необходимые для транскрипции,— по другую ее сторону. В период между транскрипцией и трансляцией транскрибированная РНК должна претерпеть такие изменения, которые позволили бы ей пройти через ядерную оболочку. Регулируя выход мРНК в цитоплазму, клетка способна отобрать те из вновь синтезированных носителей информации, которые должны транслироваться. Таким образом, сложность организации достигает нового уровня, который, как мы увидим, чрезвычайно важен для развивающегося организма.

Развитие одноклеточных эукариот

Все многоклеточные эукариотические организмы произошли в процессе эволюции от одноклеточных простейших. У этих простейших впервые появились основные особенности, присущие развитию эукариот. Примитивные эукариоты дают первые примеры морфогенеза, контролируемого ядром, использования клеточной поверхности как посредника для кооперации отдельных клеток, появления полового размножения.

Регуляция морфогенеза при развитии ацетабулярии

В конце XIX в. еще не было доказано, что в ядре содержится информация, определяющая наследственность и направляющая развитие. Одним из лучших свидетельств в пользу такого представления были результаты опытов по разделению одноклеточных организмов на фрагменты, содержащие ядро, и безъядерные (Wilson, 1896). Когда различных простейших разрезали на множество частей, почти все эти части погибали. Однако фрагменты, содержащие ядро, оказывались жизнеспособными и регенерировали все сложные клеточные структуры (рис. 1.5).

Ядерный контроль клеточного морфогенеза и взаимодействие между ядром и цитоплазмой прекрасно иллюстрируют опыты на ацетабулярии (*Acetabularia*). Эта гигантская одиночная клетка (длиной в 2,5—5 см) состоит из трех частей: шляпки, стебелька и ризоида (рис. 1.6). Ризоид находится в основании клетки и прикрепляет ее к субстрату. Единственное клеточное ядро располагается в ризоиде. Большие размеры ацетабулярии и положение ее ядра позволяют исследователям удалить из клетки ядро и заменить его ядром другой клетки. В 30-х годах нашего века Геммерлинг (J. Hämmerling) воспользовался этими уникальными свойствами ацетабулярии и пересадил ядро одного вида (*Acetabularia mediterranea*) в энуклеированный ризоид другого (*A. crenulata*). Как видно из рис. 1.6, шляпки у этих видов очень сильно отличаются друг от друга. Геммерлинг обнаружил, что после того, как ядро одного вида трансплантировали в стебелек другого, новообразующаяся шляпка приобретала строение, свойственное

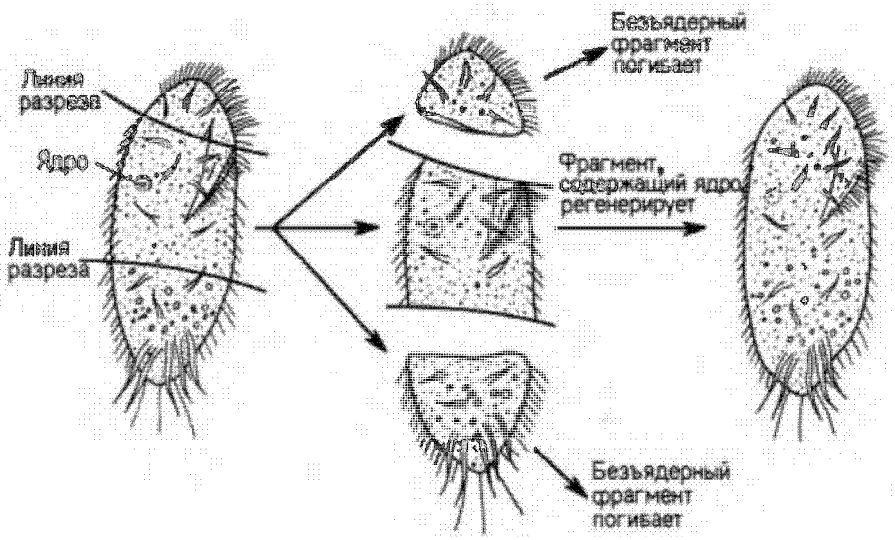


Рис. 1.5. Регенерация содержащего ядро фрагмента одноклеточного простейшего *Stylonychia*. Безъядерные фрагменты сохраняются в течение некоторого времени, но в конце концов погибают.

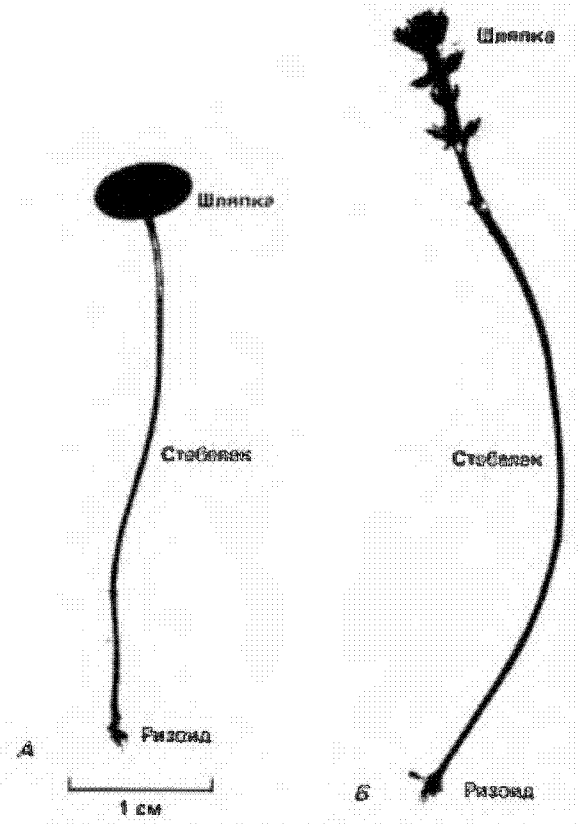


Рис. 1.6. Гигантская одноклеточная водоросль ацетабулярия. *А. Acetabularia mediterranea*. *Б. A. crenulata*. Ядро у этой водоросли располагается в ризоиде. (С любезного разрешения, H. Harris.)

виду-донору ядра (рис. 1.7). Таким образом было показано, что развитие ацетабулярии контролируется ядром.

Образование шляпки представляет собой сложный морфогенетический процесс, включающий синтез различных белков, которые должны распределиться между определенными частями клетки. Пересаженное ядро и в самом деле определяет образование видоспецифической шляпки, но для этого требуется несколько недель. Кроме того, если на ранней стадии развития ацетабулярии, до образования шляпки, удалить ядро, то через несколько недель образуется шляпка нормального строения, хотя организм в конце концов и погибнет. Это свидетельствует о том, что 1) ядро содержит информацию, определяющую тип образующейся шляпки (т. е. содержит генетическую информацию, которая обеспечивает синтез белков, ответственных за образование шляпки определенного типа), и 2) информация поступает в цитоплазму задолго до образования шляпки. Информация, поступившая в цитоплазму, не используется на протяжении нескольких недель.

Одна из гипотез, предложенных для объяснения этих наблюдений, заключалась в том, что ядро синтезирует стабильную мРНК, которая остается в цитоплазме в неактивном состоянии, пока не наступит время образования шляпки. Более поздние данные, опирающиеся на наблюдение Геммерлинга (опубликованное в 1934 г.), подтверждают эту гипотезу. Геммерлинг разрезал молодую ацетабулярию на несколько частей (рис. 1.8). Шляпка развивалась не только на том фрагменте, в котором содержалось ядро (как этого и ожидали), но, кроме того, на апикальном конце стебелька. На средней части стебелька шляпка не развивалась. Исходя из этого, Геммерлинг постулировал (примерно за 30 лет до того, как узнали о существовании мРНК), что инструкции для образования шляпки каким-то образом сохраняются в концевой части стебелька. Результаты более новых исследований (Kloppstech, Schweiger, 1975) показали, что мРНК ядерного происхождения накапливаются именно в этой области. Прибавление к морской воде, в которой растет ацетабулярия, рибонуклеазы (фермента, расщепляющего РНК) полностью подавляет образование шляпки. В случае энуклеированных клеток это — окончательный результат, коль скоро РНК разрушена, образования шляпки не происходит. Однако если в клетках ядро имеется, то после отмывания рибонуклеазы шляпка может обра-

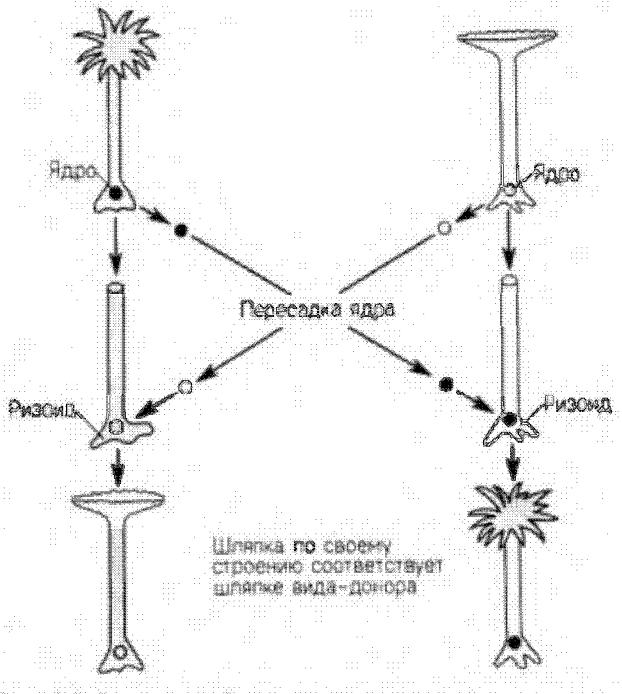


Рис. 1.7. Результат обмена ядрами между двумя видами ацетабулярии; шляпка удалена, ядра пересажены в энуклеированные ризоиды. Структуры, принадлежащие *A. crenulata*, выделены серым цветом.

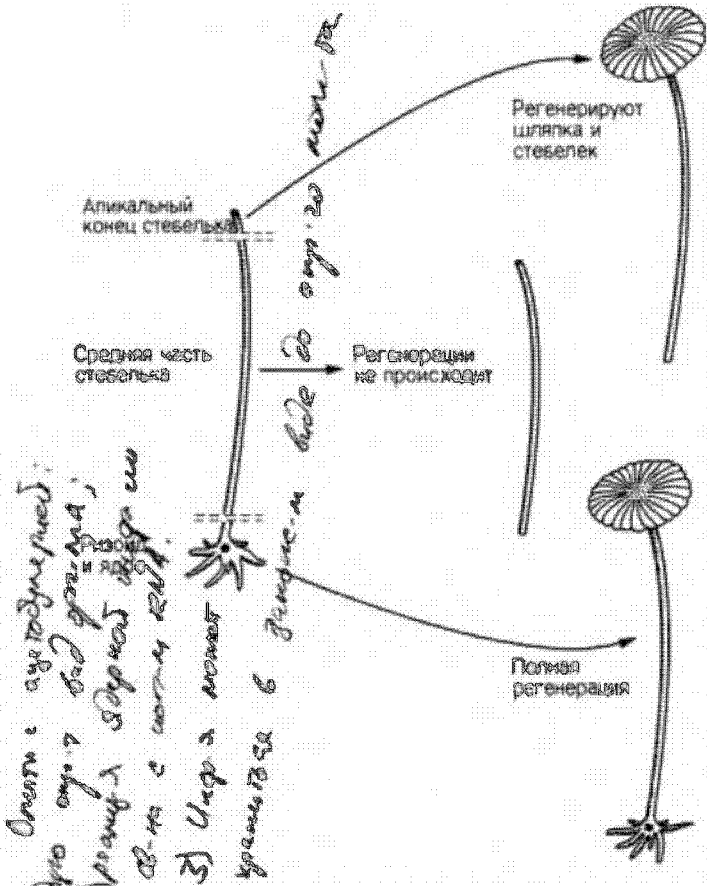


Рис. 1.8. Регенеративная способность различных фрагментов *Acetabularia mediterranea*.

зоваться; происходит это, по-видимому, в результате синтеза в ядре новой мРНК. Показано также (Garcia, Dazy, 1986), что синтез белка происходит особенно интенсивно в вершинной части клеток.

Из предыдущего обсуждения очевидно, что в формировании шляпки у ацетабулярии ядерная транскрипция играет важную роль. Следует отметить, однако, что цитоплазма также играет существенную роль в этом процессе. Хотя мРНК и находятся в цитоплазме, они не транслируются на протяжении недель. Что-то в цитоплазме регулирует использование поступившей информации. Следовательно, экспрессия шляпки контролируется не только транскрипцией ДНК в ядре, но также и цитоплазматическими факторами, влияющими на трансляцию.

Таким образом, у этого одноклеточного организма «развитие» контролируется как на транскрипционном, так и на трансляционном уровнях.

Дифференцировка у амебофлагелляты *Naegleria*

Одним из наиболее замечательных случаев «дифференцировки» у простейших является развитие *Naegleria gruberi*. Этот организм занимает особое место в систематике простейших, так как он имеет строение то амебы, то жгутиконосца (рис. 1.9). На протяжении большей части своего жизненного цикла *N. gruberi* представляет собой типичную амебу, питающуюся почвенными бактериями и размножающуюся путем простого деления. Однако, когда суспензия бактерий оказывается разбавленной (будь то дождевой водой или водой, добавленной экспериментатором), каждая особь *N. gruberi* быстро приобретает обтекаемую форму, и на переднем конце ее развиваются два длинных жгутика. Таким образом, вместо того чтобы иметь в одном организме несколько дифференцированных клеточных типов, одна эта клетка обладает разными клеточными структурами и биохимическими особенностями в разные периоды своей жизни.

Превращение амебы в жгутиконосца осуществляется за один час (рис. 1.10). За это время в амебе должны возникнуть как кинетический аппарат, который служил бы базальными тельцами для жгутиков, так и сами жгутики. Жгутики построены из многих белков, среди которых преобладает тубулин. Молекулы тубулина организованы в виде микротрубочек, которые объединены в структуру, способную обеспечивать движение жгутиков (рис. 1.11). Фултон и Уолш (Fulton, Walsh, 1980) обнаружили, что на стадии амебы тубулин для жгутиков у *Naegleria* отсутствует. Он образуется de novo после начала транскрипции ДНК в ядре. Чтобы показать это, исследователи воздействовали на транскрипцию на разных стадиях актиномицином D — антибиотиком, который избирательно подавляет синтез РНК. Если добавлять этот антибиотик до разбавления пищи, то он предотвращает синтез тубулина. Однако если актиномицин D добавить через 20 мин после разбавления, то тубулин все же синтезируется. Следовательно, можно предположить что мРНК для тубулина образуется в первые 20 мин после разбавления пищи и используется вскоре после этого. Такое предположение подтвердилось, когда было показано, что в суммарной мРНК, выделенной из амебоидной формы, не содержится определяемых количеств мРНК для тубулина жгутиков, а в препарате из дифференцированных клеток ее содержится много (Walsh, 1984).

В этом случае мы имеем прекрасный пример контроля развития на уровне транскрипции: ядро *Naegleria* отвечает на изменения окружающей среды, синтезируя мРНК для тубулина жгутиков. Мы здесь встречаемся с еще одним процессом, который играет

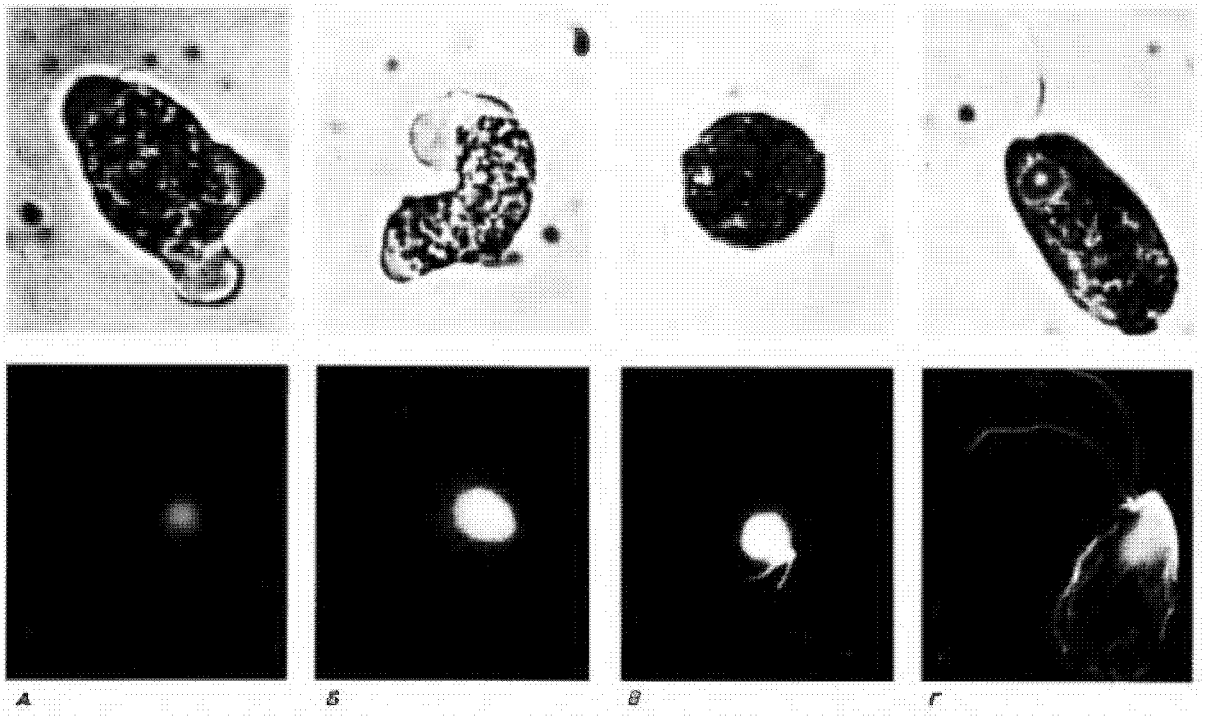


Рис. 1.9. Превращение амебоидной формы *Naegleria* в жгутиконосную. *Верхний ряд:* окрашивание раствором Люголя; *нижний ряд:* окрашивание флуоресцирующими антителами к тубулину микротрубочек. *А.* 0 мин. *Б.* Через 25 мин; начинается синтез нового тубулина. *В.* Через 70 мин; возникают различимые жгутики. *Г.* Через 120 мин; жгутики полностью сформированы; организм приобретает обтекаемую форму. (Из Walsh, 1984; с любезного разрешения C. Walsh.)

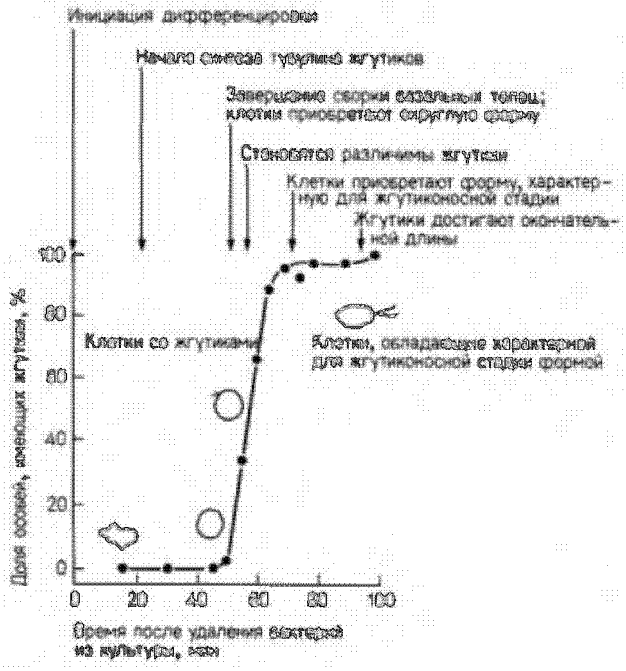


Рис. 1.10. Дифференцировка фенотипа жгутиконосца у *Naegleria*. Амеб, выращенных в обогащенной бактериями среде, в момент 0 отмывали от бактерий. Через 80 мин почти у всех особей популяции развились жгутики.

важную роль при развитии других животных и растений, а именно со сборкой молекул тубулина для образования жгутика. Этот процесс, при котором тубулин полимеризуется в микротрубочки, а микротрубочки собираются в упорядоченную структуру, встречается в природе повсеместно. У млекопитающих он наблюдается при образовании жгутика спермия и ресничек в клетках спинного мозга и дыхательного тракта. Контроль на посттрансляционном уровне, когда белки взаимодействуют между собой, создавая в клетке организованные структуры, будет более подробно рассмотрен позднее. Итак, мы видим, что развитие одноклеточных эукариот регулируется на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях.

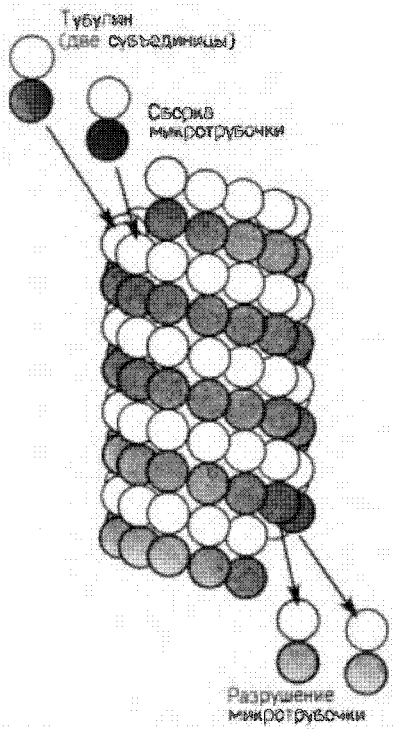


Рис. 1.11. Сборка и разрушение микротрубочек путем полимеризации и деполимеризации димеров тубулина.

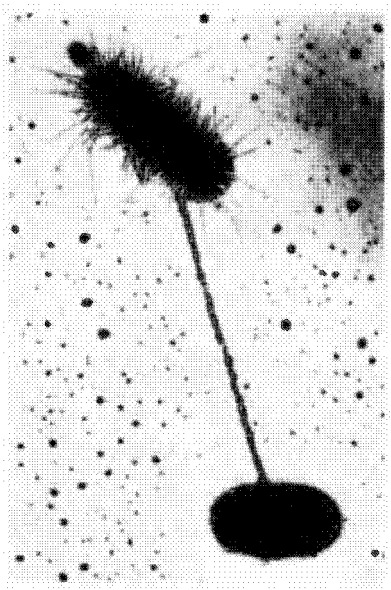
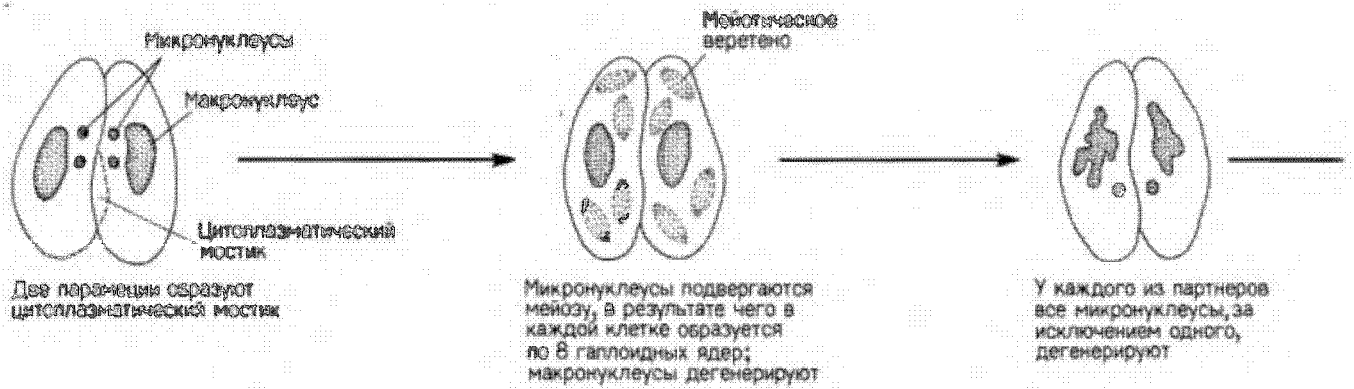


Рис. 1.12. Пол у бактерий. Некоторые бактериальные клетки покрыты многочисленными ворсинками, или пилями; с помощью специальных половых пилей, или фимбрий, они могут передавать свой генетический материал клетке-реципиенту, липкой этих образований. На этом рисунке половая ворсинка визуализирована вирусными частицами, которые специфическим образом связываются с ней. (С любезного разрешения C.C. Brinton, Jr. и J. Carnahan.)

Происхождение полового размножения

Половое размножение — это еще одно изобретение простейших, которое оказало глубокое воздействие на более сложные организмы. Необходимо отметить, что половой процесс и размножение — суть два различных явления, которые могут существовать отдельно друг от друга. Размножение — это возникновение новых особей, половой процесс — это создание новых комбинаций генов, происходящих от двух разных особей. Размножение при отсутствии полового процесса свойственно тем организмам, которые размножаются простым делением, когда происходит деление амебы или отпочковывание новых особей гидры, никакого перераспределения генов не наблюдается. У одноклеточных организмов нередко



встречается также половой процесс без размножения. Бактерии могут передавать гены от одной особи другой с помощью особых половых ворсинок, называемых **половыми пилями**, или **фимбриями** (рис. 1.12). Эта передача осуществляется независимо от размножения. Простейшие также способны перераспределять гены независимо от размножения. Так, например, у парамеций размножение происходит путем простого деления надвое, а половой процесс — путем **конъюгации** (рис. 1.13). Две парамеции соединяются своими ротовыми аппаратами, и между ними возникает цитоплазматический мостик. У обеих парамеций макронуклеус (осуществляющий регуляцию метаболических процессов) разрушается, тогда как микронуклеус подвергается мейозу, за которым следует митоз; возникает восемь гаплоидных микронуклеусов, из которых все, за исключением одного, разрушаются. Оставшийся микронуклеус делится снова и образует два микронуклеуса — стационарный и мигрирующий. Каждый мигрирующий микронуклеус перемещается по цитоплазматическому мостику в соседний конъюгант и сливается с его стационарным микронуклеусом («оплодотворяет» его), благодаря чему в обеих клетках возникает новое диплоидное ядро. Когда конъюгирующие партнеры расходятся, это диплоидное ядро делится, давая начало новому микронуклеусу и новому макронуклеусу. При этом парамеции не размножаются, происходит только половой процесс.

У одноклеточных эукариот наблюдается и объединение этих двух независимых явлений, полового процесса и размножения; в этом случае говорят о **половом размножении**. На рис. 1.14 представлен жизненный цикл хламидомонады (*Chlamydomonas*). Этот организм обычно существует в виде гаплоидной формы подобно гаметам млекопитающих, т. е. каждая хромосома у хламидомонады имеется в единственном числе. Однако особи каждого вида по поведению при спаривании подразделяются на две группы — *плюс* и *минус*. Когда особи разных групп встречаются, происходит объединение их цитоплазмы и слияние ядер с образованием диплоидной зиготы. Эта зигота является единственной диплоидной клеткой в жизненном цикле хламидомонады; осуществляя в конечном счете мейоз, она образует четыре новые клетки. Здесь мы имеем дело с половым размножением, поскольку в процессе мейоза происходит перераспределение хромосом, и вместе с тем возникает большее число особей. Обратите внимание, что при таком типе полового размножения простейших гаметы морфологически идентичны — различия между спермием и яйцом еще не возникло.

При возникновении в эволюции полового размножения прогресс был достигнут в двух отношениях. Во-первых, возник механизм мейоза (рис. 1.15), с помощью которого диплоидный набор хромосом редуцируется до гаплоидного состояния (этот процесс будет подробно обсуждаться в гл. 22). Во-вторых, возник механизм, благодаря которому особи двух типов, различающиеся по полу, узнают друг друга. Узнавание происходит первоначально на уровне мембран жгутиков (рис. 1.16; Goodenough, Weiss, 1975; Bergman et al., 1975). Агглютинация жгутиков делает возможным установление контакта между особыми участками на клеточных мембранах. Эти специализированные участки содержат специфические для особей разного типа компоненты, благодаря которым осуществляется слияние цитоплазмы этих особей. После агглютинации жгутиков *плюс*-особи инициируют слияние, образуя «трубку оплодотворения», сходную с той, которую мы встретим у спермиев. Эта трубка контактирует и сливается со специализированным участком на поверхности *минус*-особи. Интересно, что тот же механизм, который используется для выдвижения этой трубки, —

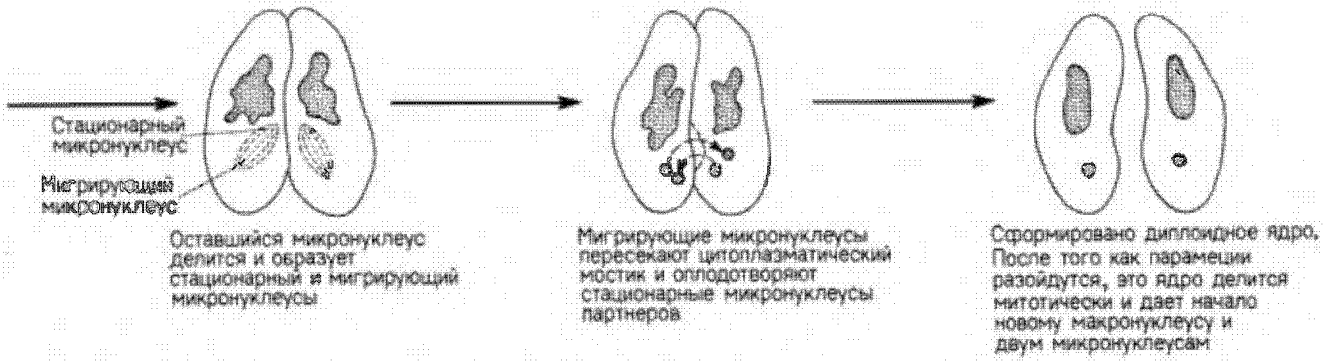


Рис. 1.13. Конъюгация у парамеций. Две парамеции могут обмениваться генетическим материалом; в результате у каждой из них набор генов становится отличным от того, с которым они приступили к конъюгации. (По Strickberger, 1985.)

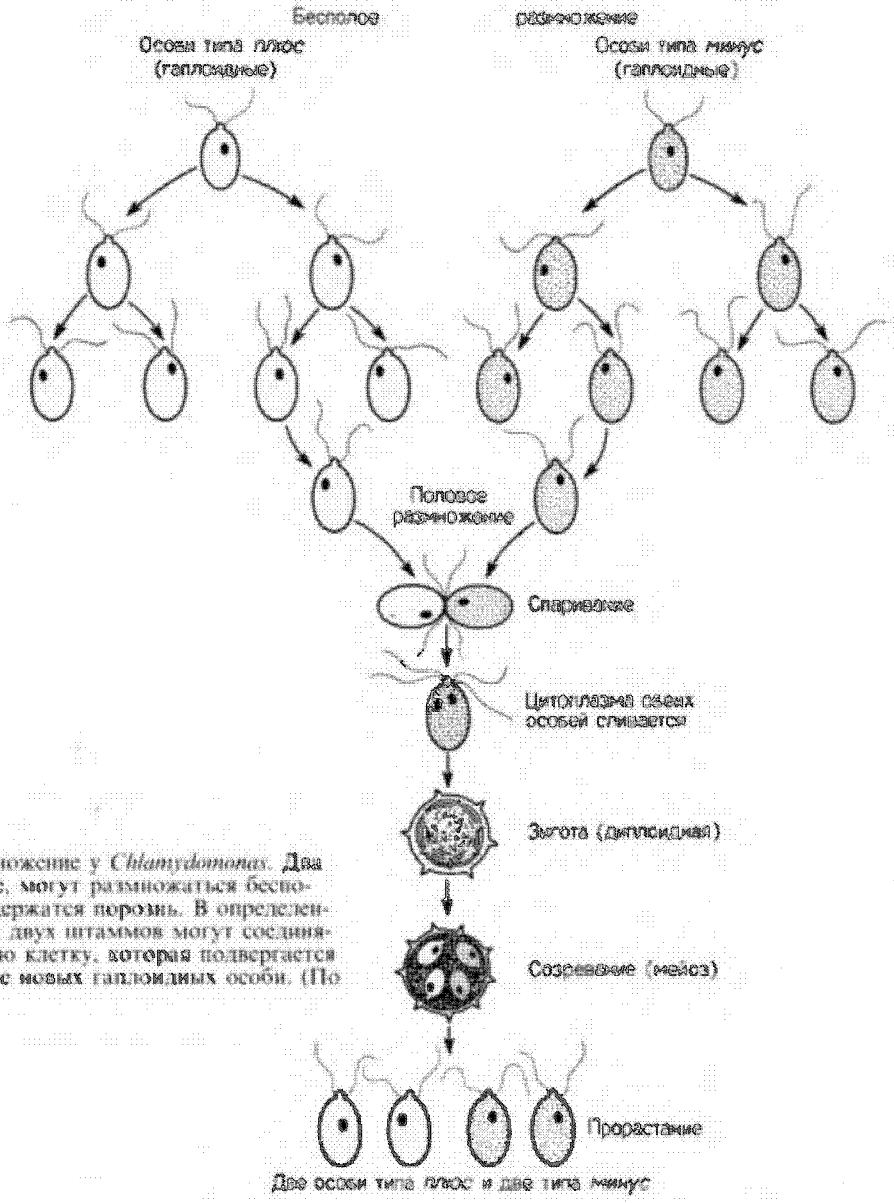


Рис. 1.14. Половое размножение у *Chlamydomonas*. Два штамма, оба гаплоидные, могут размножаться бесполым путем, если они содержатся порознь. В определенных условиях особи этих двух штаммов могут соединяться, образуя диплоидную клетку, которая подвергается мейозу и образует четыре новых гаплоидных особи. (По Strickberger, 1985.)

полимеризации белка актина — действует и при формировании выростов у спермиев и яиц морского ежа. В следующей главе мы увидим, что узнавание и слияние спермия с яйцом поразительно сходны с процессами, описанными у хламидомонад.

Для одноклеточных эукариот, по-видимому, характерны основные элементы процессов развития, которые свойственны более сложным организмам, относящимся к другим типам животных: 1) процессы синтеза в клетке контролируются на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях; 2) существует механизм, обеспечивающий выход РНК через ядерную оболочку; 3) присущее одноклеточным эукариотам строение отдельных генов и хромосом сохраняется на протяжении всей эволюции эукариот; 4) митоз и мейоз в процессе эволюции становятся более совершенными; 5) половое размножение включает кооперацию между отдельными клетками, которая у многоклеточных организмов приобретает даже большее значение.

Колониальные эукариоты: эволюция дифференцировки

Одним из наиболее важных экспериментов эволюции было создание многоклеточных организмов.

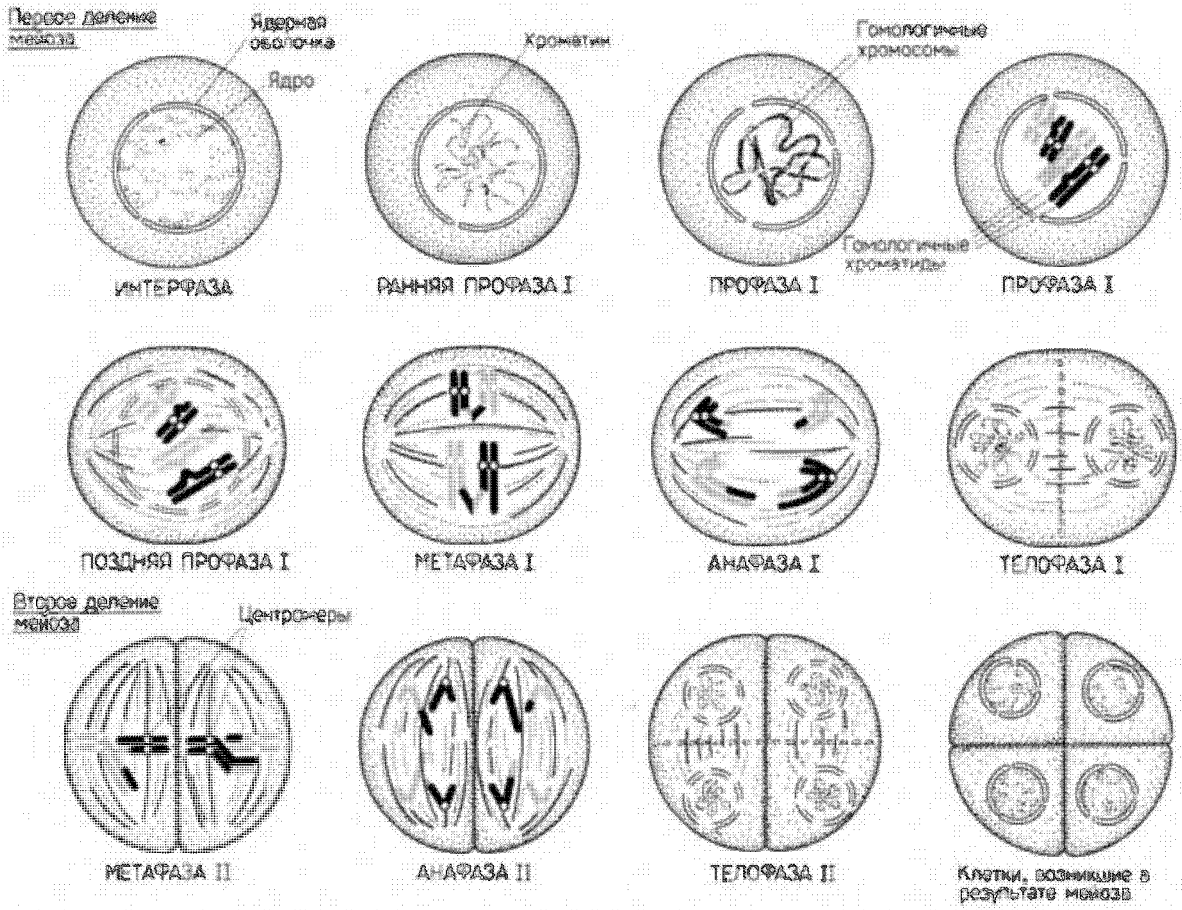


Рис. 1.15. Итоговая схема мейоза. ДНК и связанные с ней белки реплицируются во время интерфазы. Во время профазы ядерная оболочка разрушается и гомологичные хромосомы (каждая из которых состоит из двух хроматид, соединенных центромерой) располагаются попарно. В это время между четырьмя гомологичными хроматидами может происходить обмен участками. После метафазы I две исходно гомологичные хромосомы расходятся в разные клетки. При втором делении центромера расщепляется, и в результате в каждой новой клетке оказывается одна копия каждой хромосомы.

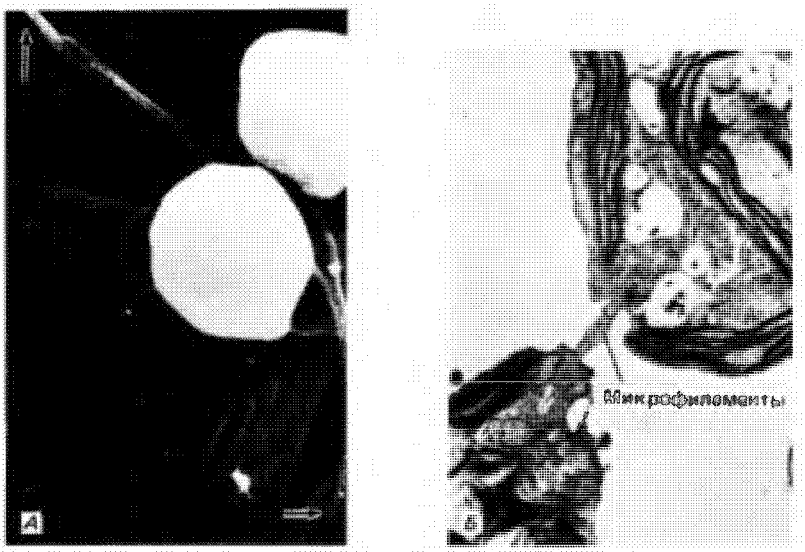


Рис. 1.16. Двухступенчатое узнавание при копуляции у *Chlamydomonas*. *А*. Микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа (× 7000), на которой видна копулирующая пара. Взаимодействующие жгутики обвиваются один вокруг другого, сливаясь концами (*стрелки*). *Б*. Микрофотография цитоплазматического мостика, соединяющего две особи, в просвечивающем электронном микроскопе (× 20 000). Микрофиламенты простираются от клетки-донора (*внизу*) к клетке-реципиенту (*наверху*). (Из Goodenough, Weiss, 1975; Bergman et al., 1975; с любезного разрешения U. Goodenough.)

Возникновение многоклеточности шло, по-видимому, несколькими путями; здесь мы рассмотрим только два из них. Первый путь заключается в упорядоченных делениях репродуктивной клетки и последующей дифференцировке новообразованных клеток. Этот путь возникновения многоклеточности можно проследить на замечательной серии организмов, относящихся к порядку Volvocales.

Volvocales

Наиболее просто устроенные организмы среди Volvocales представляют собой совокупность большого числа клеток, по строению напоминающих хламидомонад, однако у более высокоорганизованных членов этого порядка появились клетки совершенно иного типа. У единственного представителя наиболее примитивного рода вольвоксовых *Oltmannsiella* — четыре клетки, сходные с *Chlamydomonas*, расположены в ряд и заключены в студенистый матрикс. У другого рода (*Gonium*; рис. 1.17) в результате деления одной клетки образуется плоская пластинка, состоящая из 4—16 клеток, каждая из которых имеет собственный жгутик; все жгутики находятся на одной и той же стороне пластинки. У близкого рода *Pandorina* 16 клеток образуют шар, а у *Eudorina* подобный шар содержит 32 или 64 клетки, расположенные строго закономерно. Следовательно, у этих организмов выработалась очень важная особенность развития: упорядоченное деление одной клетки дает начало многим клеткам, расположение которых предсказуемо. Эта особенность развития является предвестником процесса дробления яйца у более высокоорганизованных животных.

Для следующих двух родов порядка Volvocales характерна другая важная особенность развития — дифференцировка клеток разных типов в пределах

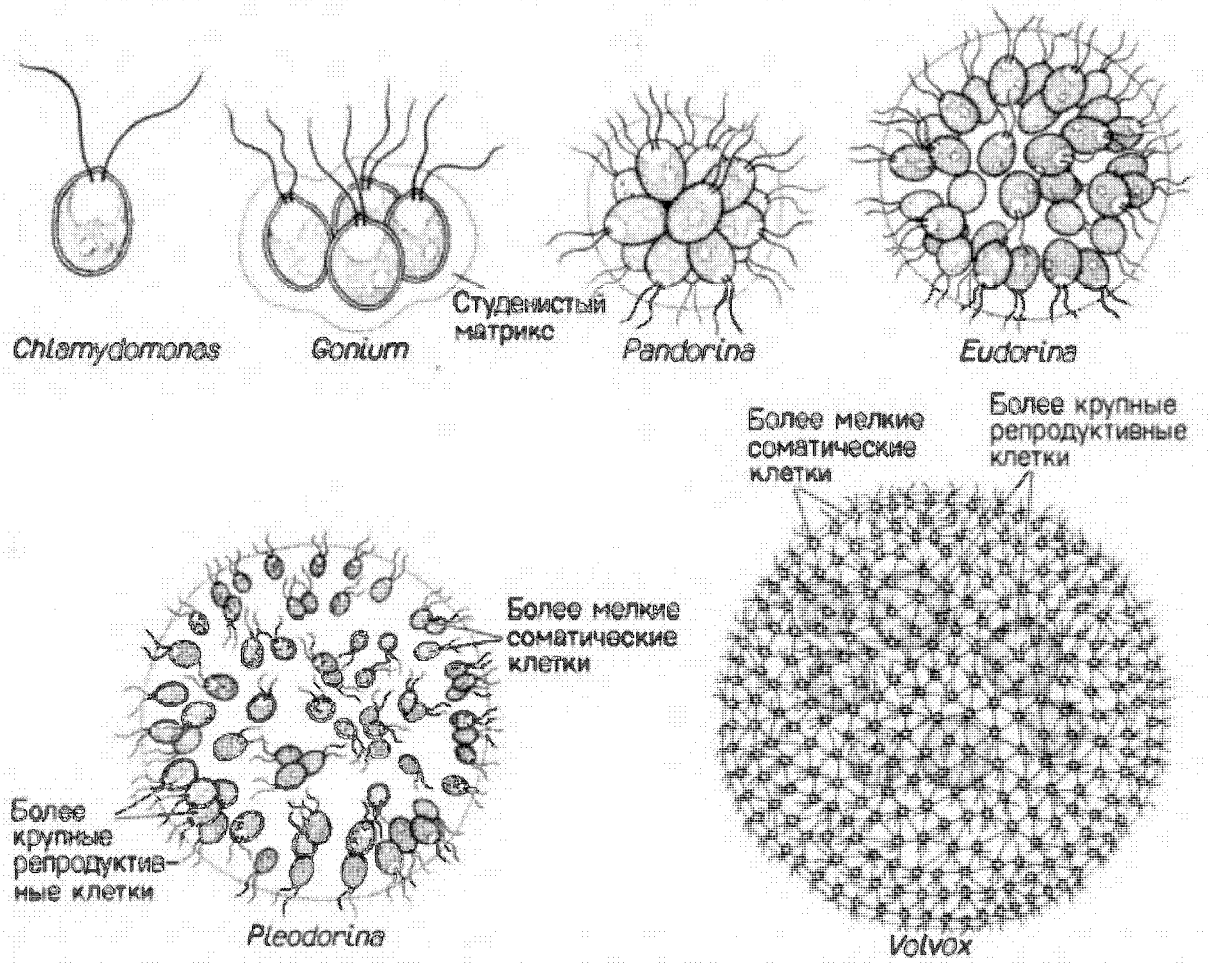


Рис. 1.17. Представители порядка Volvocales. Сложность организации возрастает от одноклеточной хламидомонады до многоклеточного вольвокса (*Volvox*).

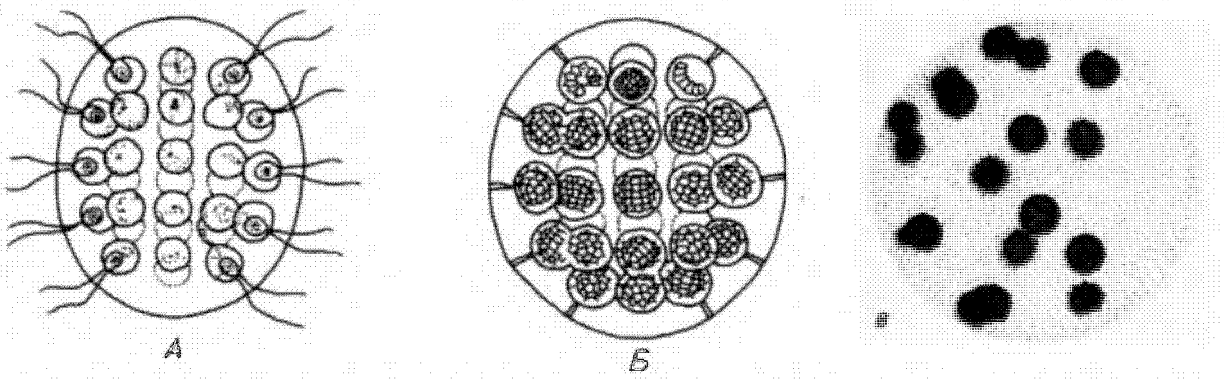


Рис. 1.18. Бесполое размножение у Volvocales. *А*. Зрелая колония *Eudorina elegans*. *Б*. Каждая из клеток *E. elegans* делится и образует новую колонию. *В*. Зрелый *Volvox carteri*. Большая часть клеток неспособна к размножению. Половые клетки (гонидии) начали делиться для образования нового организма. (*А* и *Б* — по Hartmann, 1921; *В* — из Kirk et al.; с любезного разрешения D. Kirk.)

одного организма, причем репродуктивные клетки дифференцируются из соматических. У *Eudorina*, например, каждая клетка способна образовать путем митоза (и в норме образует) полноценный новый организм (рис. 1.18, *А, Б*). Однако у представителей родов *Pleodorina* и *Volvox* лишь относительно небольшое число клеток обладает такой способностью. У *Pleodorina californica* клетки передней области выполняют только соматические функции и лишь клетки задней части участвуют в размножении. У *P. californica* колония обычно состоит из 128 или 64 (редко 32) клеток и отношение соматических и репродуктивных клеток, как правило, равно 3:5. Так, 128-клеточная колония имеет 48 соматических клеток, а 64-клеточная — 24.

У *Volvox* почти все клетки соматические и лишь очень немногие способны давать начало новым особям. У более примитивных видов рода *Volvox* репродуктивные клетки, так же как у *Pleodorina*, происходят от клеток, которые первоначально выглядят и функционируют как соматические; затем размеры этих клеток увеличиваются, и они делятся, образуя новые колонии. Однако у более сложно организованных представителей этого рода, как, например, у *V. carteri*, имеется полное разделение функций. Репродуктивные клетки, из которых позднее возникает новая генерация, обособляются во время деления клеток, формирующих новый организм. У репродуктивных клеток никогда не образуются функциональные жгутики и они не участвуют в движении или других соматических функциях индивидуума; они полностью специализированы для размножения. Таким образом, если более примитивных вольвоксовых можно рассматривать как колониальные организмы (поскольку каждая клетка в них способна к независимому существованию и воспроизведению вида), то в случае *V. carteri* мы имеем истинный многоклеточный организм с двумя четко обособленными и независимыми типами клеток (соматическими и репродуктивными), которые необходимы для того, чтобы поддерживать существование вида (рис. 1.18, *В*). Важно отметить, что обособление линии репродуктивных клеток от соматических произошло в эволюции рано. Это разделение на соматический и репродуктивный клеточный материал — одно из первых проявлений дифференцировки в процессе нормального развития. Даже у ресничных простейших часто имеются два ядра: соматическое (макронуклеус), осуществляющее регуляцию метаболизма, и генеративное (микронуклеус) — для размножения. В гл. 7 будет показано, что особенность развития *V. carteri* — обособление отдельной линии репродуктивных клеток на очень ранней стадии развития — присуща также зародышам большинства животных.

Как было описано ранее, многоклеточные вольвоксовые размножаются преимущественно бесполым путем (простым делением), однако они способны также к половому размножению, включающему образование гаплоидных гамет и их слияние (рис. 1.19). Отметим, что у Volvocales имеются гаметы двух различных типов: крупные яйца и мелкие подвижные спермии. Этот тип полового размножения носит название **гетерогамии** в отличие от **изогамии** *Chlamydomonas*. Здесь мы встречаемся с еще одним важным процессом в развитии — гаметогенезом. Преобразование клеток в спермии и яйца осуществляется строго определенным образом (см. разд. «Дополнительные сведения и гипотезы»). Оплодотворение у вольвокса сходно с оплодотворением у хламидомонады и завершается образованием диплоидной зиготы, которая подвергается мейозу и образует новую гаплоидную особь, отделяющуюся от родительского организма.

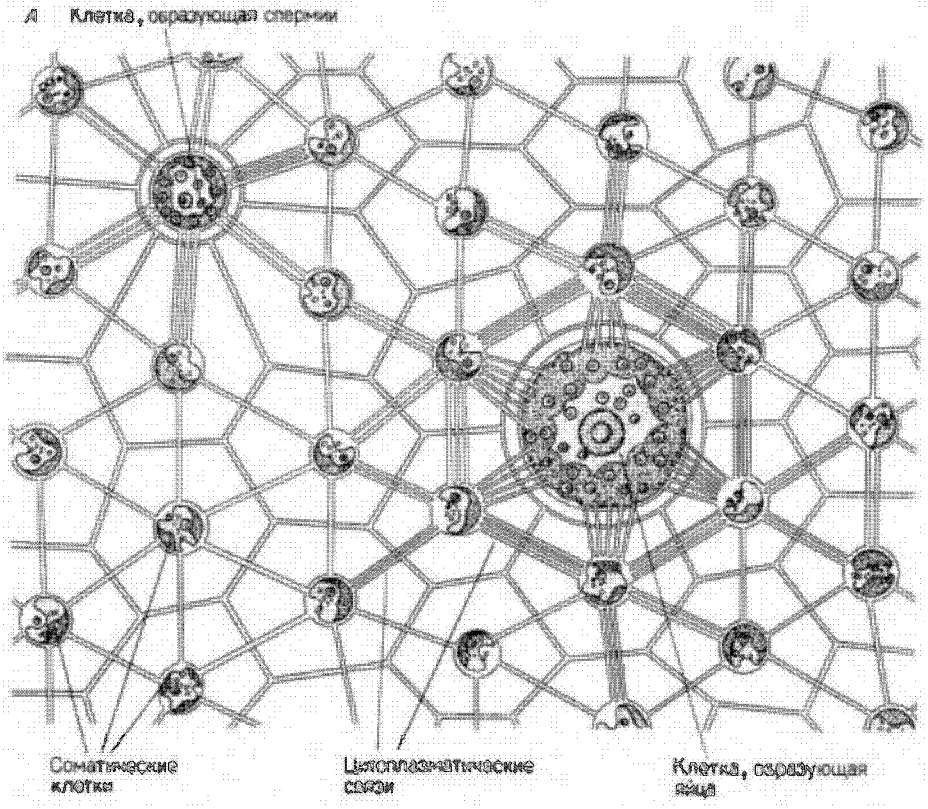


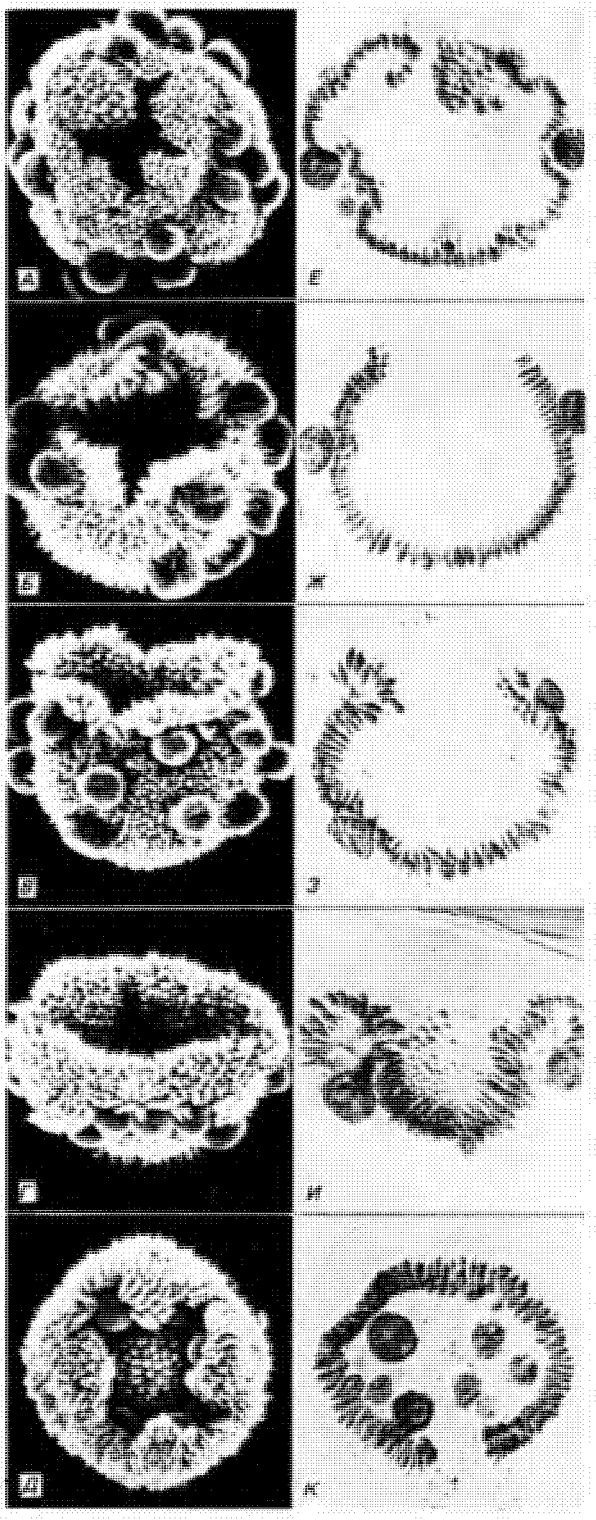
Рис. 1.19. Половое размножение у *Volvox*. *А*. Вид бисексуальной колонии вольвокса с поверхности; видны цитоплазматические связи между клетками. Показаны клетки, образующие спермии и яйца. *Б*. Образование гаплоидных половых клеток, при слиянии которых возникает зигота. Как и у хламидомонады, мейоз у вольвокса происходит после оплодотворения. (*А* — из Berrill, 1961.)

Дополнительные сведения и гипотезы

Пол и смерть у Volvocales

Представителей порядка Volvocales считают потомками некоторых из первых организмов, имевших мужские (продуцирующие спермии) и женские (продуцирующие яйца) особи. Считается также, что они являются одними из первых организмов, которые смертны. Если животные, размножающиеся исключительно путем митоза, потенциально бессмертны, то *Volvox* претерпевает изменения, характерные для процесса старения, которые приводят к гибели особи (Hagen, Ochert, 1980). Натуралист Джозеф Вуд Крач (Krutch, 1956) выразил это в более поэтической форме:

«Амебы и парамеция потенциально бессмертны... Но для вольвокса смерть является столь же неиз-



бежной, как для мыши или человека. Как умирает вольвокс, наблюдал еще Левенгук; произведя потомков, вольвокс должен умереть, поскольку сам он более уже не нужен. Когда приходит его время, он спокойно опускается на дно, присоединяясь к своим предкам. Хетнер, зоолог из Университета Джона Хопкинса, написал однажды: «Царство животных приобрело очередное новшество — пол; цена этого приобретения — неминуемая естественная гибель». И далее он спрашивает: «А не велика ли эта цена?»

Для вольвокса, несомненно, не велика. Недавние исследования (Kirk, Kirk, 1986), проведенные на *Volvox carteri*, пролили свет на связь между наличием пола и гибелью у этого вида. Особи *V. carteri* обычно бесполые. Каждая особь образована приблизительно двумя тысячами мелких соматических клеток, несущих по два жгутика; эти клетки располагаются по периферии шаровидного тела вольвокса; в центре его находится 16 крупных репродуктивных клеток, называемых **гонидиями**. Когда вольвокс достигает зрелости, каждая гонидия делится 11—12 раз (включая одно неравное деление для образования гонидий следующего поколения) и образует миниатюрное животное, сходное со взрослым (рис. 1.18, *В*). Однако в отличие от взрослых эти юные особи как бы «вывернуты наизнанку» — гонидии у них располагаются на поверхности шара, тогда как жгутики соматических клеток обращены внутрь. Молодой вольвокс исправляет эту несообразность: на вершине шара появляется отверстие (фиалопор), и шар выворачивается, как это показано на рис. 1.20. Этот процесс называют **инверсией**; он происходит путем изменения формы клеток, которое осуществляется с помощью цитоскелетных элементов и напоминает изменения, наблюдаемые у гаструлирующих зародышей. В молодых колониях возникают группы бокаловидных клеток. Суженные концы этих клеток соединяются между собой цитоплазматическими мостиками (рис. 1.21). Группы таких бокаловидных клеток создают натяжение, которое может быть ослаблено изгибанием клеточного пласта (Kirk et al., 1982). Когда процесс инверсии завершается, моло-

Рис. 1.20. Инверсия зародышей *Volvox carteri*, возникших при бесполом размножении. *А* — *Д*. Фотографии целых зародышей, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа. *Е* — *К*. Фотографии центральных сагиттальных срезов зародыша, полученные методом дифференциальной интерференционной микроскопии. До инверсии зародыш представляет собой полый шар, образованный связанными между собой клетками. Когда клетки изменяют свою форму, на вершине шара открывается фиалопор (*А*, *Б*, *Е*, *Ж*). Затем края клеточного пласта загибаются и смыкаются внизу (*В* — *Д*, *З* — *К*). (Из Kirk et al., 1982; фотографии с любезного разрешения D. Kirk.)

Рис. 1.21. «Бокаловидные клетки» вблизи отверстия фаллопора. Эти клетки остаются тесно связанными между собой цитоплазматическими мостиками поблизости от удлиненных апикальных концов; тем самым создается натяжение, вызывающее изгибание пласта связанных между собой клеток. (Из Kirk et al., 1982; фотография с любезного разрешения D. Kirk.)

дые колонии высвобождаются из родительской колонии, которая стареет и погибает.

Такой тип бесполого размножения характерен для данного вида. В течении большей части года в прудах и озерах трудно найти мужские или женские особи *Volvox carteri*. Однако «под ослепительным сиянием солнечных лучей Небраски в лужах дождевой воды не более чем через две недели появляются вольвоксы; число их быстро увеличивается, и они бурно предаются половому размножению» (Powers, 1908). Кирк и Кирк показали, что кратковременное воздействие на вольвоксов высоких температур (подобных тем, под воздействием которых эти организмы оказываются в прогреваемых солнцем лужах) приводит к синтезу и секреции соматическими клетками белка, являющегося **индуктором полового процесса**. Этот белок с молекулярной массой 30 000 дальтон является одним из наиболее сильнодействующих среди известных биологических молекул. Под воздействием этого белка даже в таких низких концентрациях, как $6 \cdot 10^{-17}$ М, бесполые организмы производят особей, продуцирующих гаметы: женская особь, размножавшаяся бесполым путем, — дочерей, производящих яйца, и мужская особь, размножавшаяся бесполым путем, — сыновей, производящих спермии. Возникшие в результате оплодотворения зиготы могут долго оставаться в анабиотическом состоянии, переживая длительный период высыхания. Так вольвокс нашел способ существовать во временных водоемах, образуемых весенними дождями и пересыхающих в жаркую погоду летом; под влиянием высоких температур появляются особи с половыми продуктами — гаметами; сливаясь, гаметы образуют зиготы, которые выживают в условиях, гибельных для взрослого организма. В этом случае мы видим также, что развитие жестко связано с экосистемой, к которой приспособился организм, чтобы выжить.

Слизевик Dictyostelium

Другой тип многоклеточной организации, ведущей свое начало от одноклеточных организмов, мы находим у слизевика *Dictyostelium discoideum*. Жизненный цикл этого необычного и вызывающего удивление организма приведен на рис. 1.22. Вегетативная стадия развития представлена одиночными гаплоидными амебами (называемыми миксамебами, чтобы отличать их от истинных амеб), которые живут на гниющих древесных остатках, питаются бактериями и размножаются простым делением. Когда источник питания истощается, десятки тысяч таких амеб образуют потоки клеток, устремляющихся к некой центральной точке. Здесь они сливаются в конический бугорок, который в конечном счете поглощает все мигрирующие клетки и изгибается, превращаясь в мигрирующего слизевика. Этот слизевик (которому часто присваивают более благозвучное название — **псевдоплазмодий**) обычно имеет в длину 2—4 мм и заключен в слизистый чехол. Псевдоплазмодий начинает мигрировать (во влажной среде и в темноте), клетка приподнив передний конец. Когда миграция заканчивается, расположенные впереди клетки, составляющие 15—20% всей клеточной популяции, сползают вниз, образуя ножку спороношения, тогда как клетки, ранее располагавшиеся сзади, перемещаются вверх. Клетки ножки погибают, а находившиеся сзади клетки, которые поднялись выше ножки, образуют споры. Споры рассеиваются, и каждая из них превращается в новую миксамебу. Помимо бесполого размножения у *Dictyostelium* может осуществляться и половой процесс. При этом две клетки сливаются в одну гигантскую клетку, которая переваривает все остальные клетки агрегата. Поглотив всех своих соседей, она преобразуется в цисту с толстой стенкой, и затем в ней происходят мейотические и митотические деления; в конце концов из цисты выходят новые миксамебы.

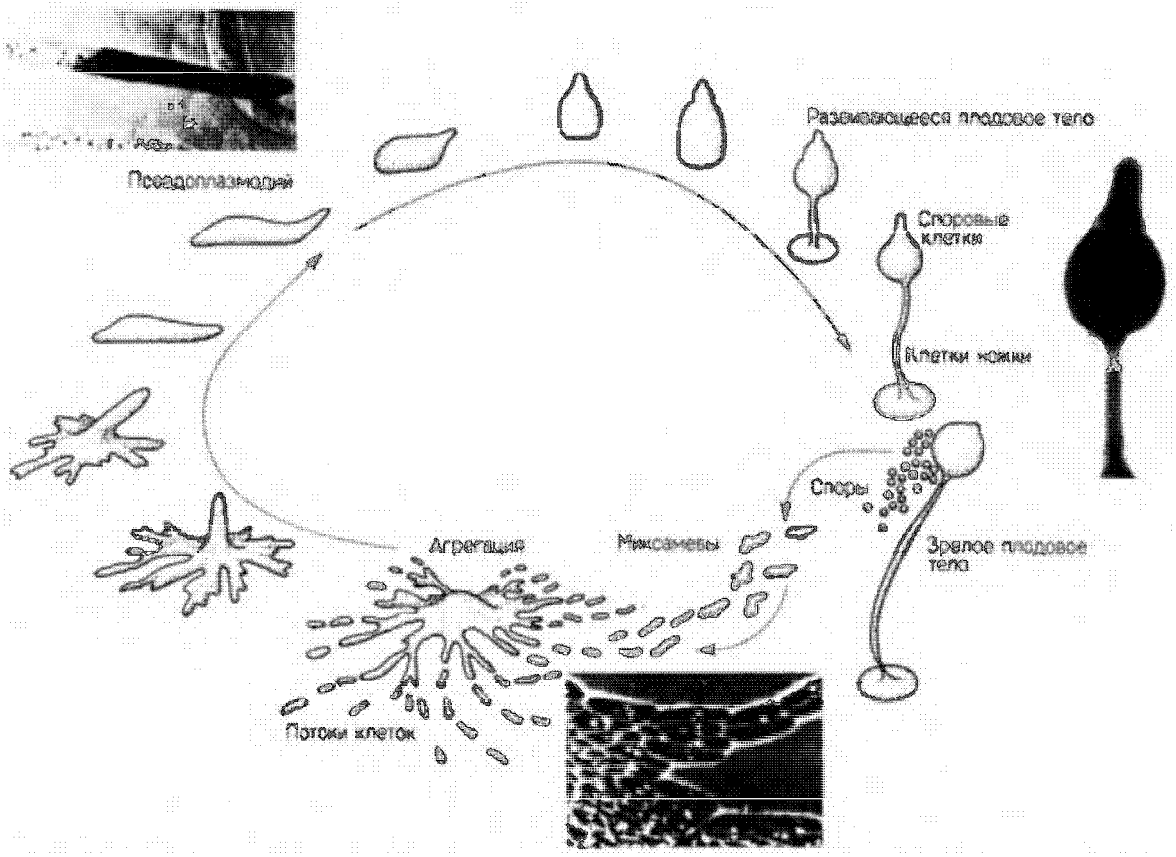


Рис. 1.22. Жизненный цикл слизевика *Dictyostelium discoideum*. Гаплоидные споры дают начало миксамебам, которые могут размножаться бесполым путем, увеличивая число гаплоидных особей. Когда запасы пищи уменьшаются, возникают центры агрегации миксамеб и формируется мигрирующий псевдоплазмодий. В конце концов он перестает перемещаться и образует спороношения, из которых высвобождается большое число спор. (Фотографии с любезного разрешения К. Raper.)

Dictyostelium представляет собой прекрасный экспериментальный объект для исследований в области биологии развития, поскольку в этом организме исходно идентичные клетки дифференцируются в один из двух альтернативных клеточных типов — споры или клетки ножки. Кроме того, у *Dictyostelium* отдельные клетки объединяются для образования единой структуры, состоящей из дифференцированных клеток разного типа, — процесс, сходный с образованием тканей у более сложно организованных существ. Агрегация тысяч амеб в единый организм — способ возникновения многоклеточности, побуждавший исследователей строить гипотезы относительно механизмов его осуществления.

Один из главных вопросов, занимающих исследователей: что вызывает агрегацию клеток? Цейтраферная микрокиносъемка показала, что в первые 4—5 ч голодания не происходит никаких направленных движений. В следующие 5 ч, однако, можно видеть, что клетки перемещаются со скоростью около 20 мкм в 1 мин на протяжении 100 с. Эти движения прекращаются примерно на 4 мин и затем возобновляются. Хотя перемещение направлено к некой центральной точке, оно не является просто движением в радиальном направлении. Правильнее сказать, что клетки сближаются между собой и образуют как бы ручейки, которые сливаются в более мощные потоки; в конце концов все потоки объединяются в центре. Эти перемещения обусловлены **хемотаксисом** (Bonner, 1947; Shaffer, 1953), т. е. движение клеток к центру агрегации направляется каким-то растворимым веществом. Позднее было установлено, что этим веществом является циклический аденозин-3′,5′-монофосфат (цАМФ) (Konijn et al., 1967; Bonner et al., 1969), химическая структура которого показана на рис. 1.23, *А*.

Агрегацию вызывает периодическая секреция цАМФ немногими случайно распределенными клетками (Cohen, Robertson, 1971). Соседние клетки отвечают на воздействие цАМФ двояко: они начинают двигаться к источнику цАМФ и сами выделять его (Robertson et al., 1972; Shaffer, 1975). После этого

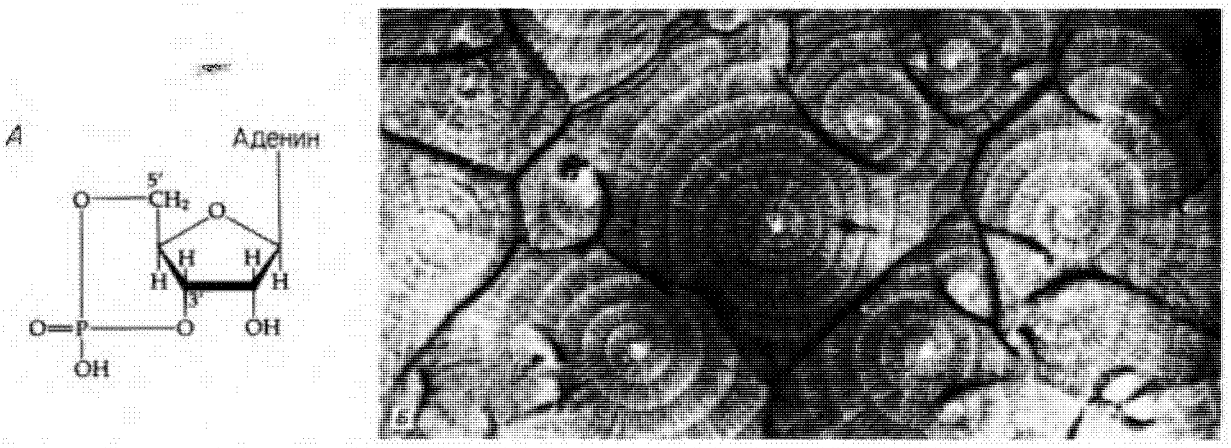


Рис. 1.23. Хемотаксис, обусловленный волнами синтеза циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). *А*. Химическая структура цАМФ. *Б*. Визуализация волн цАМФ в среде. Центральные клетки секретируют цАМФ через постоянные интервалы времени, и каждый раз секрет диффундирует в виде концентрической волны. Эти волны можно визуализировать, насыщая фильтровальную бумагу радиоактивным цАМФ и накладывая ее на колонию в стадии агрегации. Секретируемый клетками цАМФ разводит радиоактивный цАМФ. Поэтому при регистрации радиоактивности на бумаге (путем помещения ее на чувствительную к рентгеновским лучам пленку) области с высокой концентрацией цАМФ выглядят более светлыми, чем области с низкой его концентрацией. (Из Tomchick, Devreotes, 1981; с любезного разрешения P. Devreotes.)

клетки на несколько минут теряют чувствительность к цАМФ. В результате возникает волна цАМФ, распространяющаяся по популяции клеток (рис. 1.23, *Б*). С прохождением каждой волны клетки еще на один шаг приближаются к центру.

Слизевые грибы выработали также механизм, с помощью которого стимулированные цАМФ клетки слипаются между собой. Обычно отдельные амебы не прилипают друг к другу. Однако после 5 ч голодания на клеточной поверхности появляется целый набор белков (называемых дискоидинами), которые вызывают слипание клеток между собой (Rosen et al., 1973; Ray et al., 1979).

Дифференцировка отдельных амеб в клетки ножки (соматические) или в споры (репродуктивные элементы) — явление сложное. Боннер (Bonner, 1957) обнаружил, что во всех случаях из передних клеток возникает ножка, тогда как остальные предназначены для образования спор. Хирургическое удаление передней части слизевика не изменяет этой закономерности. Клетки, оказавшиеся впереди (ранее предназначавшиеся для образования спор), теперь становятся клетками ножки (Raper, 1940). Каким-то образом происходит принятие решения, согласно которому, какие бы клетки ни были передними, они станут клетками ножки, и какие бы ни были задними — превратятся в споры. Такая способность клеток изменять свою судьбу в развитии называется регуляцией, и мы обнаружим это явление у зародышей многих животных, включая млекопитающих.

Дифференцировка на клетки ножки и споры отражает одну из основных особенностей эмбриогенеза: выбор клетками «пути развития». Мы часто видим, что клетки избирают определенную судьбу при наличии альтернативных путей развития. Так, например, определенная клетка костного мозга может стать лимфоцитом или клеткой крови, определенная клетка зародыша — эпителиальной клеткой кожи или нейроном. В случае слизевиков мы встречаемся с простым дихотомическим решением, так как у них выбор возможен только между двумя клеточными типами. Как же так происходит, что та или иная клетка становится клеткой ножки или спорой? Никто точно пока этого не знает, но, по-видимому, существуют диффундирующие вещества, которые могут влиять на судьбу клеток. Одно их них, **фактор, индуцирующий дифференцировку** (differentiation-inducing factor, или DIF), вероятно, необходимо для дифференцировки ножки. Этот фактор, как и фактор, индуцирующий половую дифференцировку у вольвокса, эффективен в очень низкой концентрации (10^{-10} М), и так же, как белок вольвокса, он индуцирует дифференцировку клеток определенного типа. При его добавлении к амебам до их слияния и даже к презумптивным споровым (задним) клеткам он вызывает образование ими ножки. Синтез этого низкомолекулярного липида регулируется генетически, поскольку существуют мутантные линии *Dictyostelium*, которые образуют только предшественников спор и не образуют клеток ножки. При добавлении DIF к таким культурам в них могут дифференцироваться клетки ножки (Kay, Jermyn, 1983; Morris et al., 1987) и в цитоплазме клеток обнаруживаются новые мРНК (Williams et al., 1987).

Слизевики представляют собой эволюционный тупик. Более сложные многоклеточные организмы не образуются из агрегатов исходно независимых клеток. Тем не менее способность отдельных клеток реагировать на химический градиент (как в случае реакции миксамеб на цАМФ) очень важна для некоторых явлений, происходящих при развитии разных животных. Поверхностные клеточные белки, обусловливающие слипание клеток, обнаруживаются во всем животном царстве, и именно теперь из многоклеточных организмов начинают выделять вещества, индуцирующие дифференцировку. Выше были рассмотрены дифференцировка и морфогенез организма, образованного всего лишь двумя основными клеточными типами. Однако закономерности, установленные для такой «простой» развивающейся системы, присущи и более сложно организованным животным.

Особенности развития разных многоклеточных

Поскольку остальная часть книги посвящена **Metazoa** — многоклеточным организмам, проходящим стадии эмбрионального развития,— мы представим обзор развития разных групп животных. На рис. 1.24 изображены основные эволюционные направления развития многоклеточных. Самое интересное заключается в том, что жизнь не эволюционировала в одном определенном направлении, а эволюция шла разными путями. Мы видим, что большая часть видов многоклеточных принадлежит к одной из двух основных ветвей филогенетического древа: первичноротым или вторичноротым.

Губки

Полагают, что колониальные простейшие дали начало двум группам многоклеточных, которые проходят стадии эмбрионального развития. Одна из этих групп — губки (Porifera). Процесс их развития настолько отличается от развития представителей всех других групп животных, что некоторые систематики вообще не считают возможным относить губок к группе Metazoa. У них имеется три типа соматических клеток, но только клетки одного из них, археоциты, могут дифференцироваться в клетки остальных типов. Если пропустить губку через сито, то из изолированных клеток могут сформироваться новые губки. Такая реагрегация видоспецифична, и если смешать изолированные клетки губок разных видов, то каждая из новообразованных губок будет содер-

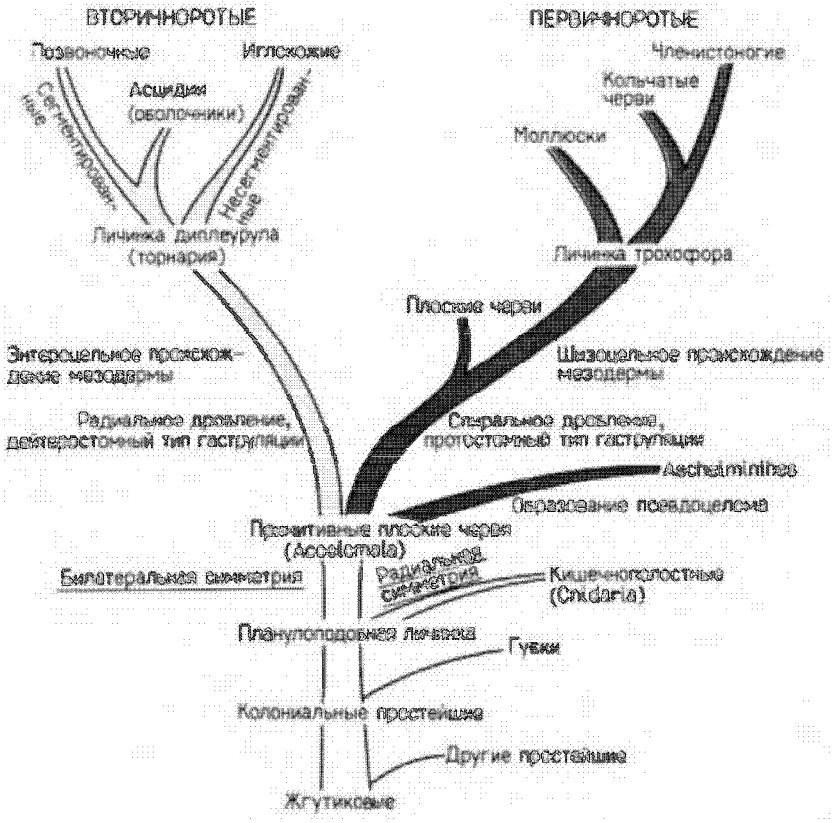


Рис. 1.24. Схематическое изображение основных путей дивергенции в эволюции. (Возможны другие варианты, но общая схема во всех случаях будет сходна с представленной здесь.)

жать клетки только своего вида (Wilson, 1907). Принято считать, что подвижные археоциты содействуют агрегации клеток собственного вида и не взаимодействуют с клетками других видов (Turner, 1978). Губки не имеют мезодермы, поэтому у них нет истинных систем органов — ни пищеварительной трубки или системы кровообращения, ни нервов или мышц. Таким образом, хотя они и проходят в своем развитии эмбриональные и личиночные стадии, но сильно отличаются от большинства Metazoa.

Первичноротые и вторичноротые

Для другой группы многоклеточных, произошедших от колониальных простейших, характерно образование в процессе развития трех зародышевых листков. Некоторые члены этой группы относятся к разделу **Radiata**, потому что обладают **радиальной симметрией** подобно трубке или колесу. Radiata включают кишечнополостных (медузы, кораллы, гидра) и гребневиков. Мезодерма у этих животных находится в зачаточном состоянии; она представлена единичными клетками, разбросанными в студенистом матриксе. Бóльшая часть Metazoa относится, однако, к разделу **двусторонне-симметричных** животных (Bilateralia) и делится на первично- и вторичноротых. Полагают, что все Bilateralia произошли от примитивных плоских червей. У этих плоских червей впервые появилась истинная мезодерма (хотя она была плотной и в ней не возникала полость тела). Считается, что они были похожи на личинок некоторых современных кишечнополостных. Различия между двумя основными группами Bilateralia представлены на рис. 1.25. **Первичноротые** (Protostomia), включающие моллюсков, членистоногих и червей, носят такое название потому, что ротовое отверстие у них возникает из первичного рта (бластопора) или его части. Мезодерма образуется из телобластов. Полость тела образуется путем расхождения первоначально плотного тяжа клеток (схизоцельный способ).

Другим большим подразделением двусторонне-симметричных животных являются **вторичноротые** (Deuterostomia). Они включают хордовых и иглокожих. Может показаться странным включение человека и росомахи в одному систематическую группу с морскими звездами и морскими ежами, однако некоторые эмбриологические особенности делают очевидным их родство. Во-первых, у вторичноротых дефинитивный рот возникает независимо от первичного рта (бластопора) и в другом месте. Мезодерма образуется энтероцельным способом, и имеется вторичная полость тела (целом).

Первично- и вторичноротые различаются также по типу дробления. У вторичноротых бластомеры каждого квартета располагаются над соответствую-

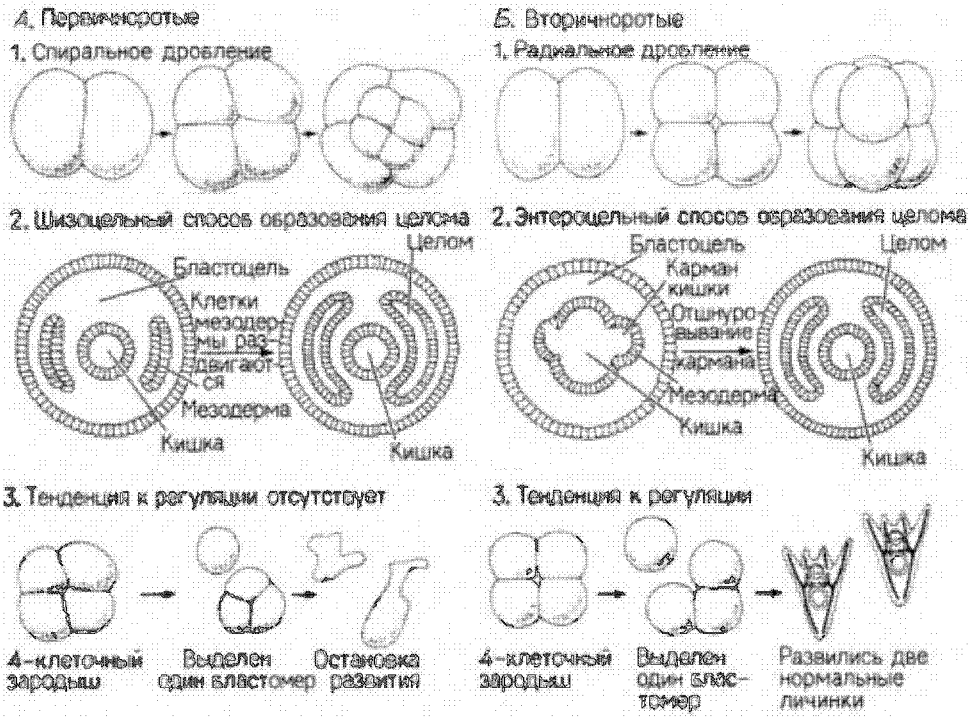


Рис. 1.25. Основные тенденции в развитии первичноротых и вторичноротых.

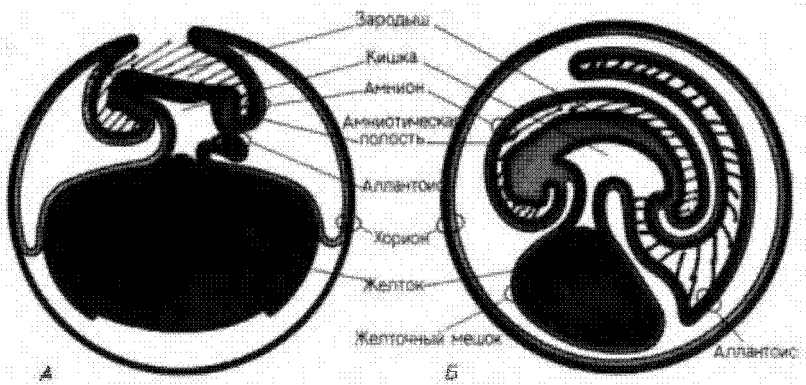


Рис. 1.26. Схема строения куриного яйца, типичного для амниот. Показано развитие оболочек, окружающих зародыш. *А*. 3 сут инкубации. *Б*. 7 сут инкубации.

ными бластомерами подлежащего квартета, и анимально-вегетативная ось яйца является у них осью радиальной симметрии. Такой тип дробления называют **радиальным.** В отличие от вторичноротых у первичноротых бластомеры вышележащего квартета располагаются между бластомерами нижележащего квартета. Такой тип дробления носит название **спирального.** Далее, в период дробления, у большинства вторичноротых бластомеры обладают большей способностью к регуляции развития, чем у первичноротых. Если у зародыша морского ежа или человека на 4-клеточной стадии удалить один из бластомеров, то он способен образовать целый организм, а оставшиеся $^3/_4$ зародыша также могут развиваться нормально. Но если такую же операцию проделать на зародыше улитки или червя, то отдельный бластомер и остальная часть зародыша превратятся в двух частичных зародышей; у каждого из них будут отсутствовать те части, которые представлены у партнера.

Эволюция организмов зависит от унаследованных изменений в их развитии. Одно из величайших достижений эволюции — возникновение амниотического яйца — произошло у вторичноротых. Этот тип яйца, примером которого может служить яйцо курицы (рис. 1.26), впервые появился у рептилий около 30 млн. лет тому назад. Благодаря его возникновению позвоночные в период эмбрионального развития стали независимы от воды. Они получили возможность заселять сушу вдали от водоемов. И если амфибии должны возвращаться к воде для размножения и для того, чтобы их яйца могли развиваться, то яйца амниот имеют собственный запас воды и пищи. Яйца амниот оплодотворяются внутри материнского организма и содержат желток для питания развивающегося зародыша. Кроме того, зародыш амниот снабжен двумя мешками: **амнионом,** содержащим жидкость, которая его омывает, и **аллантоисом,** в котором скапливаются конечные продукты обмена. Зародыш вместе с амнионом и аллантоисом заключен в скорлупу, которая проницаема для кислорода, диффундирующего внутрь яйца, но достаточно прочна, чтобы защитить зародыш от неблагоприятных воздействий внешней среды. Сходные эволюционные изменения яйцевых оболочек позволили членистоногим стать первыми сухопутными беспозвоночными. Таким образом, окончательное преодоление границы между водой и сушей явилось результатом изменения самой ранней стадии развития — яйца.

Биология развития располагает бесконечным многообразием интереснейших объектов и увлекательных проблем. Задачей автора было отобрать некоторые из них для иллюстрации основных закономерностей развития животных. Выборка эта очень мала. Для того чтобы ясное представить себе состояние дел в эмбриологической науке, можно прибегнуть к такому сравнению: сейчас мы ведем наблюдения только в доступном нам маленьком прудике, тогда как перед нами лежит целый океан неизвестных закономерностей развития. Изучать развитие животных мы начнем с ранних стадий эмбриогенеза: оплодотворения, дробления, гаструляции и установления плана строения тела. Хотя нами была предпринята попытка дать обзор основных вариантов процесса развития во всем животном царстве, легко заметить, что наибольшего внимания удостоились вторичноротые.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

Bergman K., Goodenough U. W., Goodenough D. A., Jawitz J., Martin H. (1975). Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. II. Flagellar membranes and the agglutination reaction. J. Cell Biol., **67**, 606—622.

Berrill N. J. (1961). Growth, Pattern, and Form. Freeman, San Francisco.

Bonner J. T. (1947). Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. J. Exp. Zool., **106**, 1—26.

Bonner J. T. (1957). A theory of the control of differentiation in the cellular slime molds. Q. Rev. Biol., **32**, 232—246.

Bonner J. T., Berkley D. S., Hall E. M., Konijn T. M., Mason J. W., O'Keefe G., Wolfe P. B. (1969). Acrasin, acrasinase and the sensitivity to acrasin in *Dictyostelium discoideum*. Dev. Biol., **20**, 72—87.

Cohen M. H., Robertson A. (1971). Wave propagation in the early stages aggregation of cellular slime molds. J. Theor. Biol., **31**, 101—118.

Fulton C. (1977). Cell differentiation in *Naegleria gruberi*. Annu. Rev. Microbiol., **31**, 597—629.

Fulton C., Walsh C. (1980). Cell differentiation and flagellar elongation in *Naegleria gruberi*: Dependence on transcription and translation. J. Cell Biol., **85**, 346—360.

Garcia E., Dazy A.-C. (1986). Spatial distribution of poly(A)$^+$ RNA and protein synthesis in *Acetabularia mediterranea*. Biol. Cell, **58**, 23—29.

Goodenough U. W., Weiss R. L. (1975). Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. III. Cell wall lysis and microfilament associated mating structure activation in wild-type and mutant strains. J. Cell Biol., **67**, 623—637.

Hagen G., Kochert G. (1980). Protein synthesis in a new system for the study of senescence. Exp. Cell Res., **127**, 451—457.

Hämmerling J. (1934). Über formbildended Substanzen bei *Acetabularia mediterranea*, ihre räumliche und zeitliche Verteilung und ihre Herkunft. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org., **131**, 1—81.

Hartmann M. (1921). Die dauernd agame Zucht von *Eudorina elegans*, experimentelle Beiträge zum Befruchtungs-und Todproblem. Arch. Protistk., **43**, 223—286.

Kay R. R., Jermyn K. A. (1983). A possible morphogen controlling differentiation in *Dictyostelium*. Nature, **303**, 242—244.

Kirk D. L., Kirk M. M. (1986). Heat shock elicits production of sexual inducer in *Volvox*. Science, **231**, 51—54.

Kirk D. L., Viamontes G. I., Green K. J., Bryant J. L. Jr. (1982). Integrated morphogenetic behavior of cell sheets: *Volvox* as a model. In: S. Subtelny and P. B. Green (eds). Developmental Order: Its Origin and Regulation. Alan R. Liss, New York, pp. 247—274.

Kloppstech K., Schweiger H. G. (1975). Polyadenylated RNA from *Acetabularia*. Differentiation, **4**, 115—123.

Konijn T. M., van der Meene J. G. C., Bonner J. T., Barkley D. S. (1967). The acrasin activity of adenosine-3′, 5′-cyclic phosphate. Proc. Natl. Acad. Sci USA, **58**, 1152—1154.

Krutch J. W. (1956). The Great Chain of Life. Houghton Mifflin, Boston, pp. 28—29.

Morris H. R., Taylor G. W., Masento M. S., Jermyn K. A., Kay R. R. (1987). Chemical structure of the morphogen differentiation-inducing factor from *Dictyostelium discoideum*. Nature, **328**, 811—814.

Powers J. H. (1908). Further studies on *Volvox*, with description of three new species. Trans. Am. Micr. Soc., **28**, 141—175.

Raper K. B. (1940). Pseudoplasmodium formation and organization in *Dictyostelium discoideum*. J. Elisha Mitchell Sci. Soc., **56**, 241—282.

Ray J., Shinnick T., Lerner R. A. (1979). A mutation altering the function of a carbohydrate binding protein blocks cell—cell cohesion in developing *Dictyostelium discoideum*. Nature, **279**, 215—221.

Robertson A., Drage D. J., Cohen M. H. (1972). Control of aggregation in *Dictyostelium discoideum* by an external periodic pulse of cyclic adenosine monophosphate. Science, **175**, 333—335.

Rosen S. D., Kafka J. A., Simpson D. L., Barondes S. H. (1973). Developmentally regulated carbohydrate binding protein in *Dictyostelium discoideum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 2554—2558.

Shaffer B. M. (1953). Aggregation in cellular slime molds: In vitro isolation of acrasin. Nature, **171**, 975.

Shaffer B. M. (1975). Secretion of cyclic AMP induced by cyclic AMP in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. Nature, **255**, 549—552.

Strickberger M. W. (1985). Genetics, 3rd ed. Macmillan, New York.

Tomchick K. J., Devreotes P. N. (1981). Adenosine 3′, 5′-monophosphate waves in *Dictyostelium discoideum*: A demonstration by isotope dilution-fluorography. Science, **212**, 443—446.

Turner R. S. Jr. (1978). Sponge cell adhesions. In: D. R. Garrod (ed.), Specificity of Embryological Interactions. Chapman and Hall, London, pp. 199—232.

Walsh C. (1984). Synthesis and assembly of the cytoskeleton of *Naegleria gruberi* flagellates. J. Cell Biol., **98**, 449—456.

Williams J. G., Ceccarelli A., McRobbie S., Mahbubani H., Kay R. R., Early A., Berks M., Jermyn K. A. (1987). Direct induction of *Dictyostelium* pre-stalk gene expression of DIF provides evidence that DIF is a morphogen. Cell, **49**, 185—192.

Wilson E. B. (1896). The Cell in Development and Inheritance. Macmillan, New York.

Wilson H. V. (1907). On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. J. Exp. Zool., **5**, 245—258.

Глава 2

Оплодотворение: возникновение нового организма

Еще, и еще, и еще,
Это вечное стремление Вселенной рождать и рождать,
Вечно плодородное движение мира.
Из мрака выходят двое, они так несхожи, но роены: вечно материя,
вечно рост, вечно явление пола.
Вечно ткань из различий и тождеств, вечно зарождение жизни.

УОЛТ УИТМЕН (1855)[1]

Введение

Оплодотворение представляет собой процесс слияния двух половых клеток (гамет) друг с другом, в результате чего возникает новая особь, генетические потенции которой берут начало от обоих родителей. Оплодотворение осуществляет две разные функции: половую (комбинирование генов двух родителей) и репродуктивную (создание нового организма). Первая из этих функций включает передачу генов от родителей потомкам, вторая — инициацию в цитоплазме яйца тех реакций, которые позволяют продолжать развитие.

Конкретные особенности оплодотворения очень сильно варьируют у различных видов, но происходящие при этом события обычно сводятся к четырем основным процессам:

1. *Контакт спермия с яйцом и их взаимное узнавание.* Это этап качественного контроля. Спермий и яйцо должны принадлежать одному и тому же виду.
2. *Регуляция проникновения спермия в яйцо.* Это этап количественного контроля. Только один спермий должен в конечном счете оплодотворить яйцо. Все остальные спермии должны быть элиминированы.
3. *Слияние генетического материала спермия и яйца.*
4. *Активация метаболизма яйца для его вступления на путь развития.*

Строение гамет

Прежде чем перейти к рассмотрению каждого события, происходящего при оплодотворении, остановимся на строении спермия и яйца, двух типов клеток, которые специализированы для осуществления оплодотворения.

Спермий

Роль, выполняемая спермием в процессе оплодотворения, была выяснена только в прошлом столетии. Антони ван Левенгук, голландский микроскопист, который был одним из двух ученых, открывших в 1678 г. существование спермиев, первоначально считал их паразитическими животными, живущими в сперме (отсюда название *сперматозоиды*, т. е. «животные спермы»). Поначалу он решил, что спермии не имеют никакого отношения к размножению животных, у которых они были обнаружены, но позднее пришел к мысли, что каждый спермий содержит преформированное животное. Левенгук писал (1685), что спермии — это семена (как sperma, так

[1] Уолт Уитмен «Листья травы». Гос. изд-во худож. литературы, 1955, с. 49.

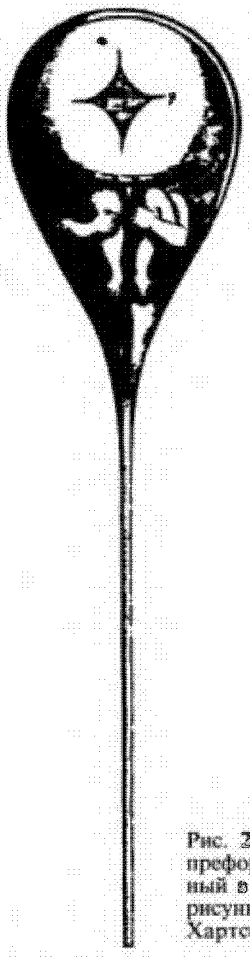


Рис. 2.1. Ребенок, преформированный в спермии, по рисунку Николаса Хартсекера (1694).

и semen означают «семя, зерно») и что самка только предоставляет питательную почву для посева семян. В этом отношении он возвращается к идее порождения, провозглашенной Аристотелем за две тысячи лет до этого. Несмотря на все старания, Левенгуку, к его разочарованию, никак не удавалось обнаружить в сперматозоидах преформированное семя. Николас Хартсекер, открывший спермии одновременно с Левенгуком, нарисовал то, что надеялся найти в спермии: преформированного человечка — «гомункулуса» (рис. 2.1). Представление, согласно которому в спермии содержится целый зародыш, никогда не имело много приверженцев, так как оно подразумевает огромное и бессмысленное растрачивание потенциальной жизни.

В серии опытов, осуществленных в конце 1700-х годов, Ладзаро Спалланцани показал, что профильтрованная сперма жабы, из которой удалены спермии, не оплодотворяет яиц. Однако он сделал заключение, что действующим началом в оплодотворении является вязкая жидкость, задерживаемая фильтровальной бумагой, а не спермии. Спалланцани тоже полагал, что спермии, содержащиеся в сперме, не что иное, как паразитические животные. И все же проделанный им опыт был первым свидетельством важной роли спермиев при оплодотворении.

Улучшение качества линз для микроскопирования и развитие клеточной теории привели к новому пониманию функции спермиев. В 1824 г. Ж. Л. Прево и Ж. Б. Дюма заявили, что спермии — не паразиты, а активные участники оплодотворения. Этими исследователями было установлено неизменное присутствие спермиев у половозрелых самцов и их отсутствие у не достигших зрелости и старых особей. Эти наблюдения в сочетании с известным фактом отсутствия спермиев у стерильных мулов привели к заключению, что «существует тесная зависимость между их присутствием в половых органах и плодовитостью животного». Прево и Дюма утверждали, что на самом деле спермий проникает в яйцо и вносит материальный вклад в формирование следующего поколения.

Эти утверждения, как правило, не находили признания, пока в 1840-х годах А. фон Кёлликер не описал образование спермиев из клеток семенника. Он пришел к выводу, что спермии являются сильно измененными клетками, которые образуются в семенниках взрослых самцов. Кёллинер высмеял идею, что наличие спермы может быть нормальным явлением, если она нужна только для того, чтобы поддерживать существование огромного числа паразитов. Несмотря на все это, он считал, что между спермием и яйцом отсутствует какой-либо физический контакт. Он полагал, что спермий побуждает яйцо к развитию подобно тому, как магнит воздействует на железо. И только в 1876 г. Оскар Гертвиг наглядно продемонстрировал проникновение спермия в яйцо и соединение их ядер. Гертвиг разыскивал организм, пригодный для тщательных микроскопических наблюдений, и нашел, что средиземноморский морской еж *Toxopneustes lividus* прекрасно отвечает его требованиям. *T. lividus* был не только обычен в данном районе, и особи этого вида со зрелыми половыми продуктами встречались на протяжении большей части года, но его яйца были доступны в большом числе и были достаточно прозрачны для наблюдений даже при больших увеличениях. После смешивания суспензий спермиев и яиц Гертвиг многократно наблюдал проникновение спермия в яйцо и слияние двух ядер. Он заметил также, что в каждое яйцо проникает только один спермий и что все ядра зародыша являются потомками ядра, возникшего в результате слияния ядер спермия и яйца при оплодотворении. Наблюдения Гертвига были вскоре дополнены Германом Фолем, который проследил в деталях механизм проникновения спермия. Наконец, было признано, что оплодотворение представляет собой слияние спермия и яйца, и соединение гамет

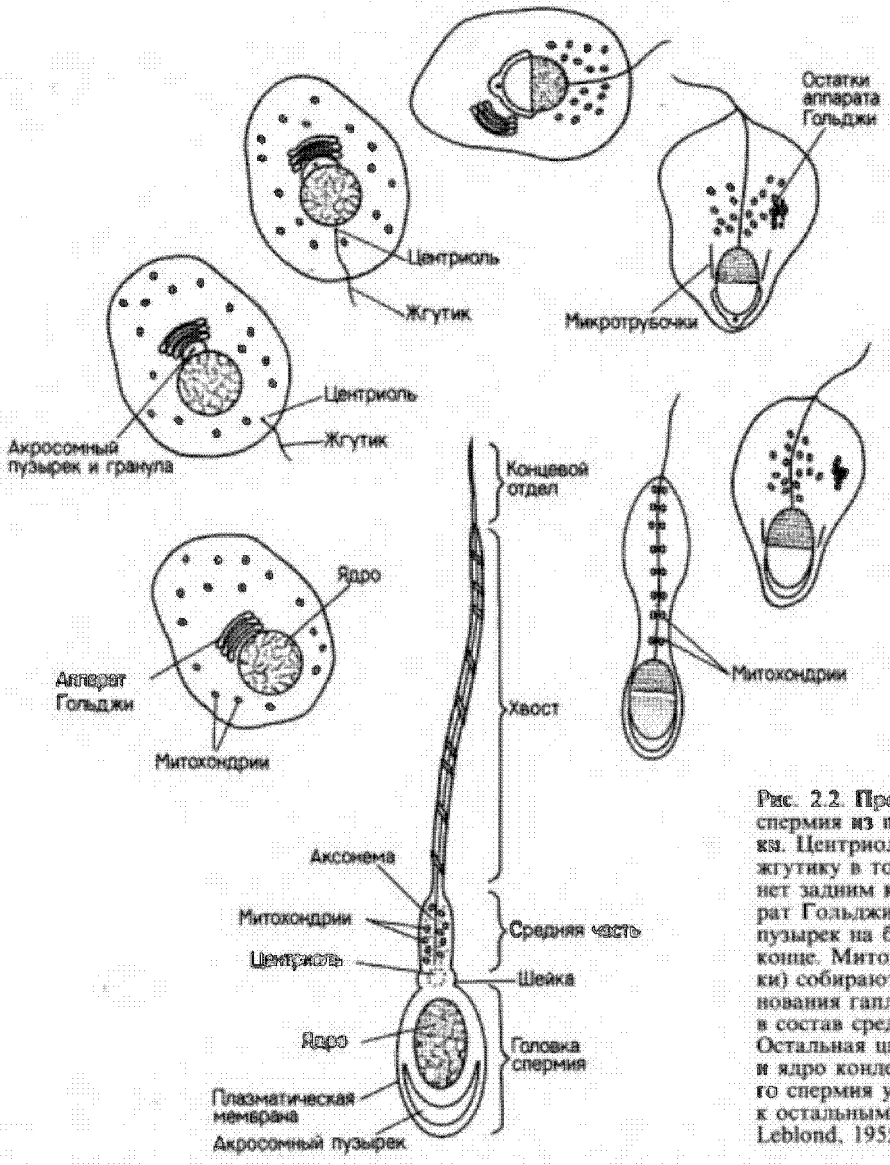


Рис. 2.2. Процесс формирования спермия из первичной половой клетки. Центриоль дает начало длинному жгутику в той области, которая станет задним концом спермия, а аппарат Гольджи образует акросомный пузырек на будущем его переднем конце. Митохондрии (мелкие кружочки) собираются около жгутика у основания гаплоидного ядра и входят в состав средней части спермия. Остальная цитоплазма сбрасывается, и ядро конденсируется. Размер зрелого спермия увеличен по отношению к остальным рисункам. (По Clermont, Leblond, 1955.)

у морского ежа до сих пор остается наиболее изученным примером оплодотворения.

Известно, что каждый сперматозоид содержит гаплоидное ядро, двигательную систему, обеспечивающую перемещение ядра, и мешок, заполненный ферментами, необходимыми для проникновения ядра в яйцо. Большая часть цитоплазмы спермия элиминируется при его созревании, и сохраняются только некоторые органеллы, видоизмененные для выполнения спермием своей функции (рис. 2.2). В период созревания спермия его гаплоидное ядро приобретает обтекаемую форму, а ДНК сильно уплотняется. Впереди от такого конденсированного гаплоидного ядра лежит акросомный пузырек, произошедший от аппарата Гольджи и содержащий ферменты, которые переваривают белки и полисахариды. Таким образом, его можно рассматривать как измененную лизосому. Запас ферментов в акросомном пузырьке служит для проникновения спермия через наружные покровы яйца. У многих видов, например у морских ежей, между ядром и акросомным пузырьком имеется область, содержащая глобулярный актин. На ранних стадиях оплодотворения этот актин используется для образования пальцеобразного выроста. У таких видов молекулы на поверхности акросомного выроста участвуют в узнавании спермием и яйцом друг друга. Акросома и ядро вместе образуют головку спермия.

Способ передвижения спермиев различается в зависимости от того, каким образом вид адаптирован

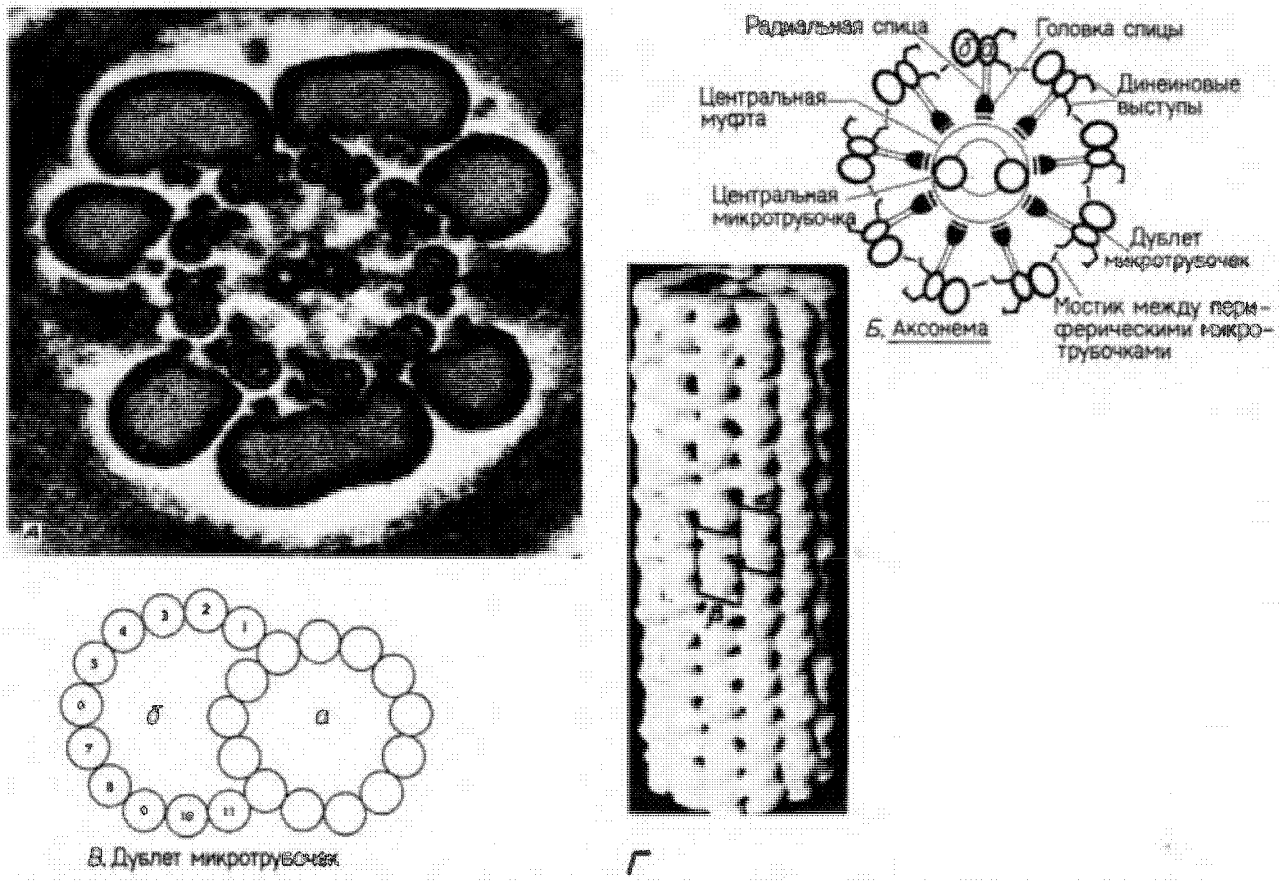


Рис. 2.3. Двигательный аппарат спермия. *А*. Поперечный срез жгутика спермия млекопитающего; видны центрально расположенная аксонема и наружные волокна. *Б*. Пояснительная схема строения аксонемы: изображен комплекс микротрубочек типа «9 + 2» и другие компоненты жгутика. *В*. Схематически изображено взаимное расположение микрофиламентов тубулина в дублете микротрубочек. Одна часть дублета (*а*) является нормальной микротрубочкой, содержащей 13 микрофиламентов. Другая часть (*б*) содержит только 11 (иногда 10) микрофиламентов. *Г*. Трехмерная модель микротрубочки *а*; α-и β-субъединицы тубулина сходны, но не идентичны. Размеры микротрубочки могут изменяться в результате полимеризации или деполимеризации субъединиц тубулина на любом ее конце. (*А* — с любезного разрешения D. M. Phillips; *Б* — по De Robertis et al., 1975; *В* — по Tilney et al., 1973; *Г* — по Amos, Klug, 1974; фотографии с любезного разрешения авторов.)

к условиям окружающей среды. У некоторых видов (как, например, у паразитического круглого червя аскариды) спермий перемещается при помощи амебоидного движения **ламеллиподий** — локальных выростов клеточной мембраны. У большинства видов, однако, спермии способны передвигаться на большие расстояния благодаря биению своих **жгутиков**.

Жгутики имеют сложное строение. Главная двигательная структура жгутика называется **аксонемой**. Аксонему образуют **микротрубочки**, отходящие от **центриоли**, которая находится в основании ядра спермия (рис. 2.2; 2.3, *Б*). Стержень аксонемы состоит из двух центральных одиночных микротрубочек, окруженных кольцом из девяти двойных микротрубочек (дублетов). В действительности только одна микротрубочка каждого дублета имеет законченное строение и содержит 13 протофиламентов, тогда как вторая имеет С-образное строение и содержит только 11 протофиламентов (рис. 2.3, *А*—*Б*). Трехмерная модель микротрубочки законченного строения представлена на рис. 2.3, *Г*. На этом рисунке можно видеть 13 связанных между собой протофиламентов, образованных только димерным белком **тубулином**.

С микротрубочками связан другой белок — **динеин** (рис. 2.3, *Б*). Этот белок может гидролизовать молекулы аденозинтрифосфата (АТФ) и преобразовывать выделяющуюся при этом химическую энергию в механическую, за счет которой осуществляется движение спермия (Ogawa et al., 1977). Важная роль белка динеина очевидна на примере мужчин с генетическим синдромом, называемым триадой

Картеджинера. У таких мужчин динеин отсутствует во всех клетках, обладающих ресничками и жгутиками; соответственно, эти органеллы неподвижны. Мужчины, страдающие таким заболеванием, стерильны (так как спермии неподвижны), подвержены респираторным инфекциям (из-за неподвижности ресничек дыхательных путей), и у них в 50% случаев сердце располагается справа (Afzelius, 1976).

Набор микротрубочек типа «9 + 2» с динеиновыми выступами сохранился во всем царстве эукариот, что свидетельствует об исключительной эффективности такой организации для передачи энергии, обеспечивающей движение. Энергия для биения жгутика, благодаря которому осуществляется продвижение спермия, исходит от кольца митохондрий, расположенных в области шейки спермия (рис. 2.2).

У многих видов (преимущественно у млекопитающих) между митохондриями и аксонемой располагается слой плотных волокон. Этот слой придает хвостовому отделу спермия бо́льшую жесткость. Поскольку толщина этого слоя уменьшается по направлению к кончику хвоста, можно думать, что волокна служат для предотвращения слишком резких изгибов головки. Таким образом, для того чтобы перенести материал своего ядра в яйцеклетку, спермий претерпел далеко идущие преобразования.

Яйцо

Все материалы, необходимые для начальных стадий роста и развития зародыша, должны быть запасены в зрелом яйце. Поэтому, если спермий избавляется от большей части своей цитоплазмы, то развивающееся яйцо не только сохраняет содержащиеся в нем запасные материалы, но и активно увеличивает их количество. Оно либо само синтезирует, либо поглощает белки желтка, который служит источником питания развивающегося зародыша. Так, яйцо птиц представляет собой огромную одиночную клетку, достигшую таких размеров благодаря накоплению желтка. Даже яйца с относительно небольшим содержанием желтка имеют значительные размеры. Объем яйца морского ежа составляет около $2 \cdot 10^5$ мкм^3 и превосходит объем спермия более чем в 10 000 раз. На схематическом рисунке 2.4 показано соотношение их размеров. На этом рисунке изображены также различные структурные элементы зрелого яйца. Если в яйце и спермии содержатся количественно равные гаплоидные ядерные компоненты, то по содержанию цитоплазматических компонентов различия между ними очень велики. Так, цитоплазма яйца представляет собой огромную кладовую запасов, накопленных в период вителлогенеза. Эти запасы включают белки, рибосомы и транспортную

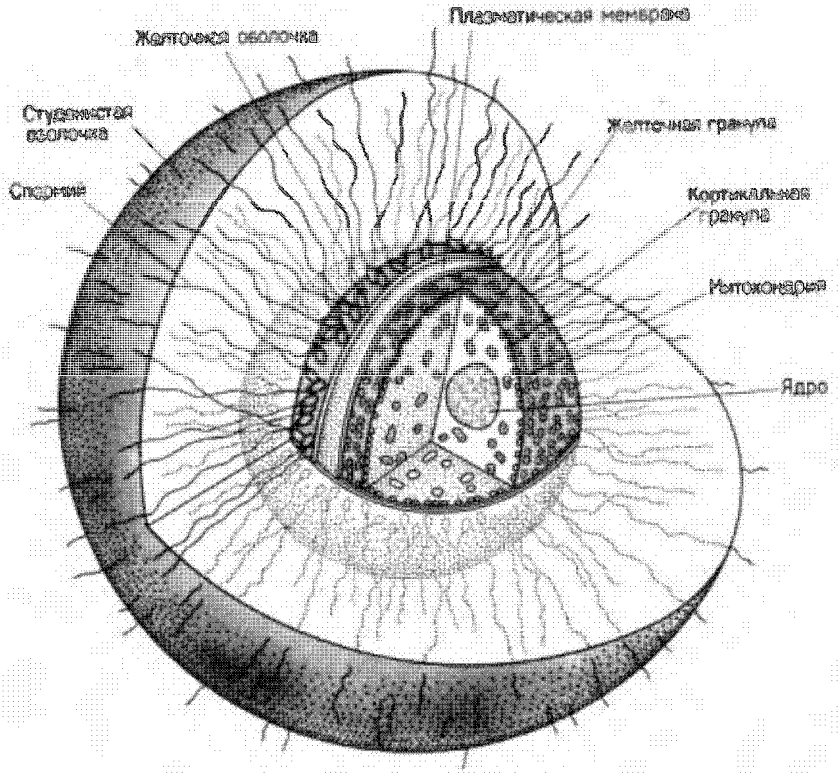


Рис. 2.4. Строение яйца морского ежа в момент оплодотворения. (По Epel, 1977.)

РНК (тРНК), матричную РНК и морфогенетические факторы.

1. *Белки.* Пройдет еще много времени, прежде чем зародыш окажется способным самостоятельно питаться или получать пищу от матери. Клетки зародыша на ранних стадиях нуждаются в запасенных заранее источниках энергии и аминокислот. У многих видов такими источниками являются накопленные яйцом белки желтка. Многие из желточных белков синтезируются в других органах (печени, жировом теле) и транспортируются к яйцу.
2. *Рибосомы и тРНК.* Как мы увидим ниже, вскоре после оплодотворения в яйце резко увеличивается синтез белка. Этот синтез осуществляется при участии рибосом и тРНК, которые уже имеются в яйце. Развивающееся яйцо (ооцит) обладает специальным механизмом синтеза рибосом, и в ооцитах некоторых амфибий в течение профазы мейоза образуется до 10^{12} рибосом.
3. *Матричная РНК.* У большинства организмов информация для осуществления белкового синтеза, происходящего в раннем развитии, заключена уже в ооците. Полагают, что яйца морского ежа содержат 25—50 тыс. различных типов мРНК. Однако эти мРНК до оплодотворения остаются в неактивном состоянии.
4. *Морфогенетические факторы.* Эти молекулы, направляющие дифференцировку клеток для образования различных тканей и органов, по-видимому, рассеяны по всему яйцу и распределяются между разными клетками при дроблении (гл. 7 и 8).

Внутри этого огромного объема цитоплазмы яйца располагается большое ядро. У некоторых видов животных (например, у морского ежа) ядро к моменту оплодотворения уже гаплоидное. У других видов (в том числе у многих червей и некоторых млекопитающих) ядро яйца в это время еще диплоидное, и спермий проникает в цитоплазму до завершения мейотических делений. Стадии, на которых находится ядро яйца ко времени проникновения спермия, представлены на рис. 2.5.

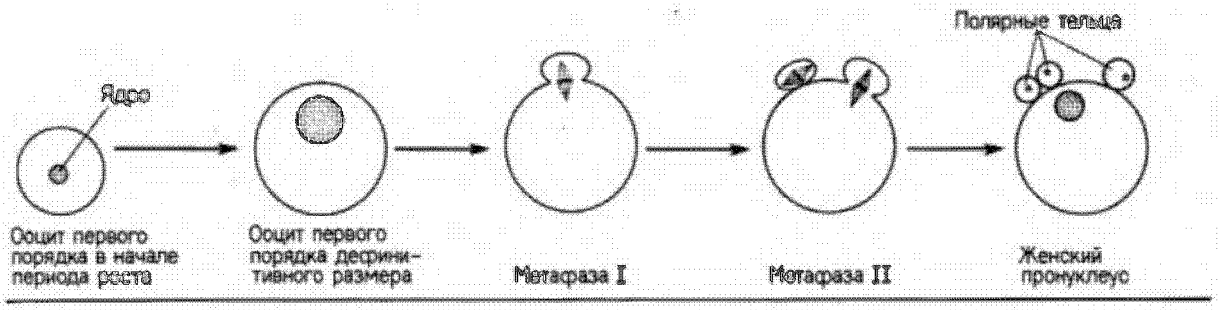
Цитоплазма яйца окружена плазматической мембраной. Во время оплодотворения она регулирует поступление в яйцо некоторых ионов (главным образом Na^+) и способна сливаться с плазматической мембраной спермия. К плазматической мембране снаружи примыкает **желточная оболочка** (рис. 2.6). Образованная гликопротеинами, эта оболочка играет важную роль в обеспечении видовой специфичности прикрепления спермия. У млекопитающих желточная оболочка очень толстая и носит название **прозрачной оболочки** (zona pellucida). Яйцо млекопитающих окружено также слоем клеток **лучистого венца** (corona radiata; рис. 2.7). Это фолликулярные клетки, которые доставляли пищу яйцу вплоть до его овуляции. Чтобы оплодотворить яйцо, спермий должен преодолеть также и этот слой [1].

Слой цитоплазмы, располагающийся непосредственно под плазматической мембраной яйца морского ежа, называется кортикальным слоем или кортексом. Цитоплазма этого слоя имеет более упорядоченное строение, чем цитоплазма более глубоких слоев, и в ней содержатся высокие концентрации глобулярных молекул актина. При оплодотворении молекулы актина полимеризуются, образуя длинные тяжи, известные под названием **микрофиламентов**. Микрофиламенты необходимы для осуществления клеточного деления; кроме того, они участвуют в образовании выростов, увеличивающих клеточную поверхность,— микроворсинок, которые способствуют проникновению спермия в клетку (рис. 2.6 и 2.18). Кортикальная цитоплазма гораздо более вязкая, чем расположенная глубже основная масса цитоплазмы, и она не смещается при центрифугировании. В кортексе заключены **кортикальные гранулы** (рис. 2.4; 2.6). Эти мембранные структуры гомологичны акросомному пузырьку спермия, поскольку они содержат протеолитические ферменты и формируются аппаратом Гольджи. Однако если каждый спермий имеет один акросомный пузырек, то каждое яйцо содержит приблизительно 15 000 кортикальных гранул. Кроме того, в кортикальных гранулах помимо пищеварительных ферментов содержатся мукополисахариды и белок гиалинового слоя. Ферменты и мукополисахариды участвуют в защите яйца от проникновения сверхчисленных спермиев после того, как первый спермий придет в контакт с ним; белок гиалинового слоя окружает зародыш на ранних стадиях развития и объединяет бластомеры в период дробления.

Яйца многих типов выделяют также студенистое вещество, располагающееся поверх желточной оболочки. Этот студенистый гликопротеиновый слой выполняет различные функции, но одна из главных его функций — это привлечение или активация спер-

---

[1] У некоторых видов млекопитающих во внеклеточных покровах яйца различают три разных образования: 1) прозрачная оболочка (zona pellucida); 2) яйценосный бугорок (cumulus oophorus) и 3) лучистый венец (corona radiata). В этих случаях лучистым венцом называют те фолликулярные клетки, которые примыкают непосредственно к прозрачной оболочке, а термин **яйценосный бугорок** применяют к более диффузно распределенным клеткам, расположенным на большем расстоянии от яйца. У многих млекопитающих (например, у хомячка, рис. 2.7, *Б*) провести границу между яйценосным бугорком и лучистым венцом нелегко; у других (таких, как овца и корова) они, по-видимому, сбрасываются до оплодотворения (см. Talbot, 1985). Клетки лучистого венца и яйценосного бугорка погружены в матрикс, состоящий преимущественно из гиалуроновой кислоты.



Кольчатые черви *Dinophilus*, *Saccocirrus*	Круглый червь *Ascaris*	Немертина *Cerebratulus*	Ланцетник *Branchiostoma*	Кишечнополостные (например, актинии)
Многощетинковый червь *Histriobdella*	Представитель Mesozoa *Dicyema*	Многощетинковые черви *Chaetopterus*, *Postlineria*	Амфибии	Морские ежи
Плоский червь *Otomesostoma*	Гусеница *Grantia*	Моллюск *Dentalium*	Большинство млекопитающих	
Онихофора *Peripatopsis*	Многощетинковые черви *Myzostoma*, *Nereis*	Многие насекомые		
	Двустворчатый моллюск *Spisula*			
	Эхиурида *Thalassema*			
	Собаки и лисицы			

Рис. 2.5. Стадии созревания, на которых находятся яйца, когда в них проникает спермий, у разных животных. (По Austin, 1965.)

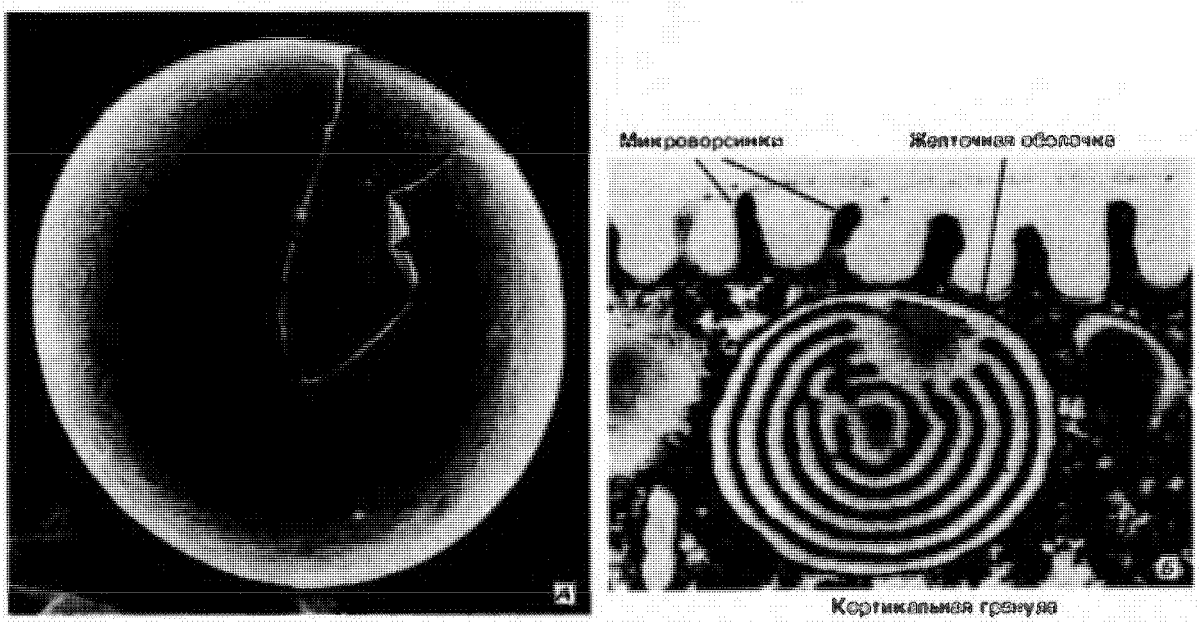


Рис. 2.6. Поверхность яйца морского ежа. *А*. Микрофотография яйца перед оплодотворением (получена с помощью сканирующего электронного микроскопа). В месте разрыва желточной оболочки обнажена плазматическая мембрана. *Б*. Микрофотография неоплодотворенного яйца (получена с помощью просвечивающего электронного микроскопа). Видны микроворсинки и плазматическая мембрана, вплотную к которой прилежит желточная оболочка. Непосредственно под плазматической мембраной яйца видна кортикальная гранула. (Из Schroeder, 1979; фотографии с любезного разрешения T. E. Schroeder.)

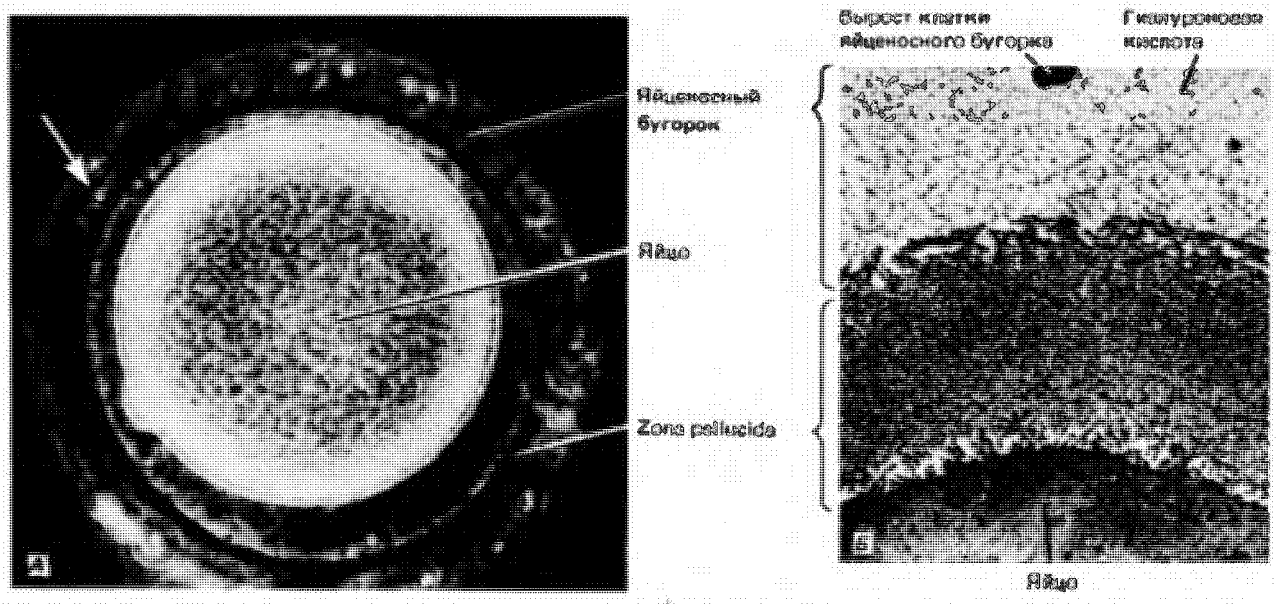


Рис. 2.7. Яйцо млекопитающего непосредственно перед оплодотворением. Яйцо одето прозрачной оболочкой (zona pellucida). Последняя в свою очередь окружена клетками яйценосного бугорка (cumulus oophorus). В яйцо человека (*А*) сперматозоид (указан стрелкой) преодолел слой клеток яйценосного бугорка, но должен еще проникнуть через прозрачную оболочку, чтобы достигнуть поверхности цитоплазмы и осуществить оплодотворение. *Б*. Микрофотография яйца хомячка (получена с помощью просвечивающего электронного микроскопа). Яйцо фиксировано таким образом, чтобы сохранилась структура прозрачной оболочки и образованного гиалуроновой кислотой матрикса, окружающего яйцо. В этом матриксе виден вырост клетки яйценосного бугорка. (*А* — с любезного разрешения R. Yanagimachi; *Б* — из Yudin et al., 1988; с любезного разрешения G. Cherr.)

миев. Таким образом, яйцо представляет собой клетку, специализированную для восприятия сперматозоида и инициации развития.

Узнавание сперматозоида и яйца: воздействие на расстоянии

Многие морские организмы выметывают гаметы непосредственно в окружающую среду. Этой средой может быть маленькая лужа, образовавшаяся при отливе, а может быть и океан. В эту среду одновременно могут выметывать свои половые продукты представители других видов. Размножающиеся таким образом организмы сталкиваются с двумя проблемами: 1) осуществление встречи сперматозоидов и яиц при столь низкой их концентрации и 2) создание механизмов, препятствующих оплодотворению яиц сперматозоидами другого вида, например яиц морского ежа сперматозоидами морской звезды. Для разрешения этих проблем в процессе эволюции выработалось два механизма: видоспецифическое привлечение сперматозоидов и видоспецифическая их активация.

Привлечение сперматозоидов

Видоспецифическое привлечение сперматозоидов (род хемотаксиса) доказано для многих животных, в том числе для кишечнополостных, моллюсков, иглокожих и первичнохордовых (Miller, 1985). Еще в 1978 г. Миллер (Miller, 1978) показал, что яйца кишечнополостного *Orthopyxis caliculata* не только секретируют хемотактический фактор, но и регулируют время его выделения. Развивающиеся ооциты на разных стадиях созревания приклеивали к предметным стеклам и на некотором расстоянии от них помещали сперму. Если яйца еще не завершили второго деления мейоза, то сперматозоиды никак не реагировали на них. Однако после завершения второго деления мейоза, когда яйца были уже готовы к оплодотворению, сперматозоиды перемещались по направлению к ним. Таким образом, ооцит контролировал не только видовую принадлежность сперматозоидов, которых он будет привлекать, но и время, когда он будет их привлекать.

Механизмы хемотаксиса у разных животных различны (см. обзор Metz, 1978). До последнего времени ни один из хемотактических факторов идентифицирован не был. Однако недавно из яиц морского ежа выделили два видоспецифических аттрактанта сперматозоидов: **сперакт** — пептид, содержащий 10 аминокислотных остатков, был выделен из яиц *Strongylocentrotus purpuratus* (Hansbrough, Garbers, 1981), а **резакт** — пептид, содержащий 14 аминокислотных остатков,— из студенистой оболочки яиц *Arbacia punctulata* (Ward et al., 1985). Резакт быстро диффундирует в морской воде и при добавлении к суспен-

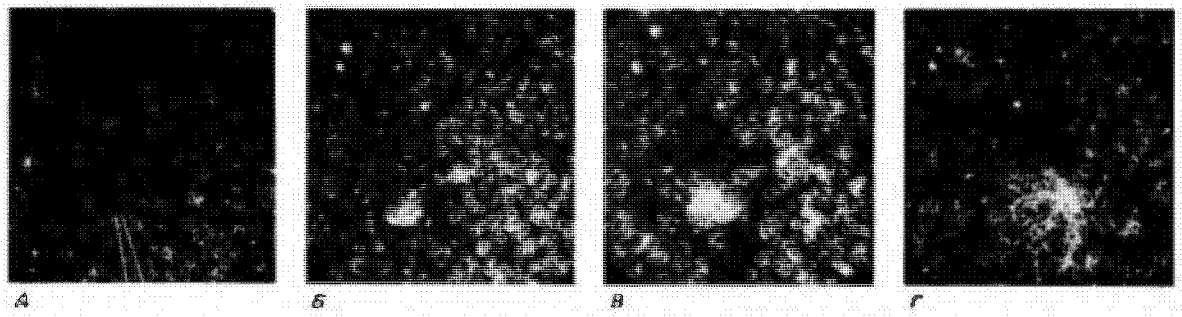


Рис. 2.8. Хемотаксис спермиев у *Arbacia*. В каплю суспензии спермиев объемом 20 мкл вносили 1 мл раствора резакта (концентрация 10 нМ). *А*. Фотография, сделанная с экспозицией 1 с; показано положение микропипетки. До добавления резакта спермии плавают кругами, диаметры которых очень малы. *Б—Г*. Также 1-секундные экспозиции; миграция спермиев к центру градиента резакта соответственно через 20, 40 и 90 с после его введения. (Из Ward et al., 1985; фотографии с любезного разрешения V. Vacquier.)

зии спермиев *Arbacia* оказывает сильное воздействие в очень низких концентрациях (рис. 2.8). Когда на предметное стекло помещают каплю морской воды со спермой *Arbacia*, спермии обычно плавают кругами диаметром около 50 мкм. Через несколько секунд после внесения в каплю незначительного количества резакта спермии мигрируют в ту область, куда он был внесен, и скапливаются в ней. По мере того как резакт диффундирует из этой области, к скоплению присоединяются новые спермии.

Воздействие резакта видоспецифично, и он не привлекает спермии других видов. Поверхностными рецепторами спермиев *Arbacia* резакт связывается (Bentley et al., 1986), поэтому спермии плывут по градиенту концентрации этого соединения до тех пор, пока не достигнут яйца.

Акросомная реакция

Второй тип взаимодействия спермия и яйца — это активация спермия материалом студенистой оболочки, вызывающим акросомную реакцию. У большинства морских беспозвоночных акросомная реакция протекает в два этапа: разрыв акросомного пузырька и выдвижение акросомного выроста (Colwin, Colwin, 1963; рис. 2.9). Акросомную реакцию может инициировать растворимый материал студенистой оболочки, сама студенистая оболочка и у некоторых видов непосредственный контакт с яйцом. Эта реакция может быть также вызвана искусственным повышением концентрации кальция в морской воде.

У морских ежей контакт со студенистой оболочкой вызывает разрушение акросомного пузырька и выделение протеолитических ферментов, которые прокладывают спермию путь через эту оболочку к поверхности яйца (Dan, 1967; Franklin, 1970; Levine et al., 1978). Последовательность событий представлена на рис. 2.10. Полагают, что акросомную реакцию инициируют сульфатированные полисахариды студенистой оболочки, которые вызывают поступление ионов кальция и натрия в головку спермия и за-

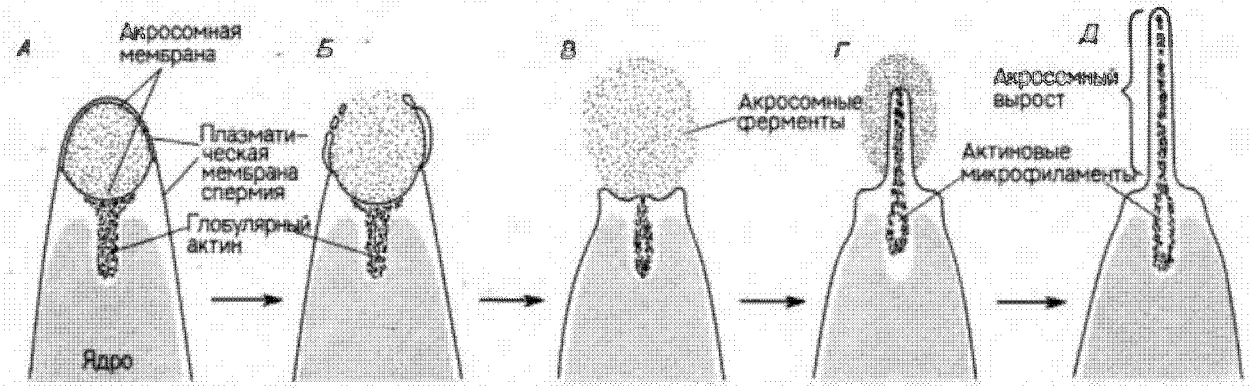


Рис. 2.9. Акросомная реакция спермия морского ежа. *А—В*. Участок акросомной мембраны, расположенный непосредственно под плазматической мембраной спермия, сливается с ней, и происходит выделение содержимого акросомного пузырька. *Г, Д*. По мере полимеризации молекул актина с образованием филаментов происходит выдвижение акросомного выроста вперед. (По Saunders, 1970.)

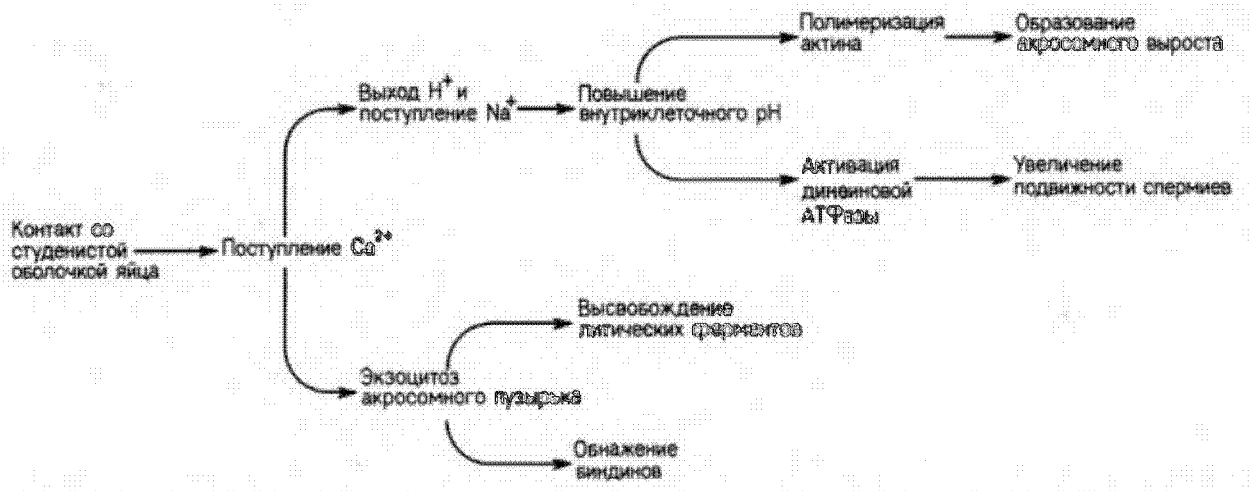


Рис. 2.10. Возможное взаимодействие процессов, происходящих при акросомной реакции у морского ежа. (По Schackmann, Shapiro, 1981.)

мещение ими ионов калия и водорода (SeGall, Lennarz, 1979; Schackmann, Shapiro, 1981). Разрыв акросомного пузырька происходит в результате кальций-зависимого слияния акросомной мембраны с прилежащей плазматической мембраной спермия (рис. 2.9; 2.11). Это по сути дела реакция экзоцитоза, заключающаяся в том, что пузырек приближается к клеточной поверхности и, сливаясь с плазматической мембраной, выделяет свое содержимое наружу. Такие реакции экзоцитоза наблюдаются при выделении инсулина клетками поджелудочной железы и при выделении нейромедиаторов из синаптических окончаний. Во всех этих случаях происходит кальций-зависимое слияние секреторного пузырька с плазматической мембраной.

Второй этап акросомной реакции заключается

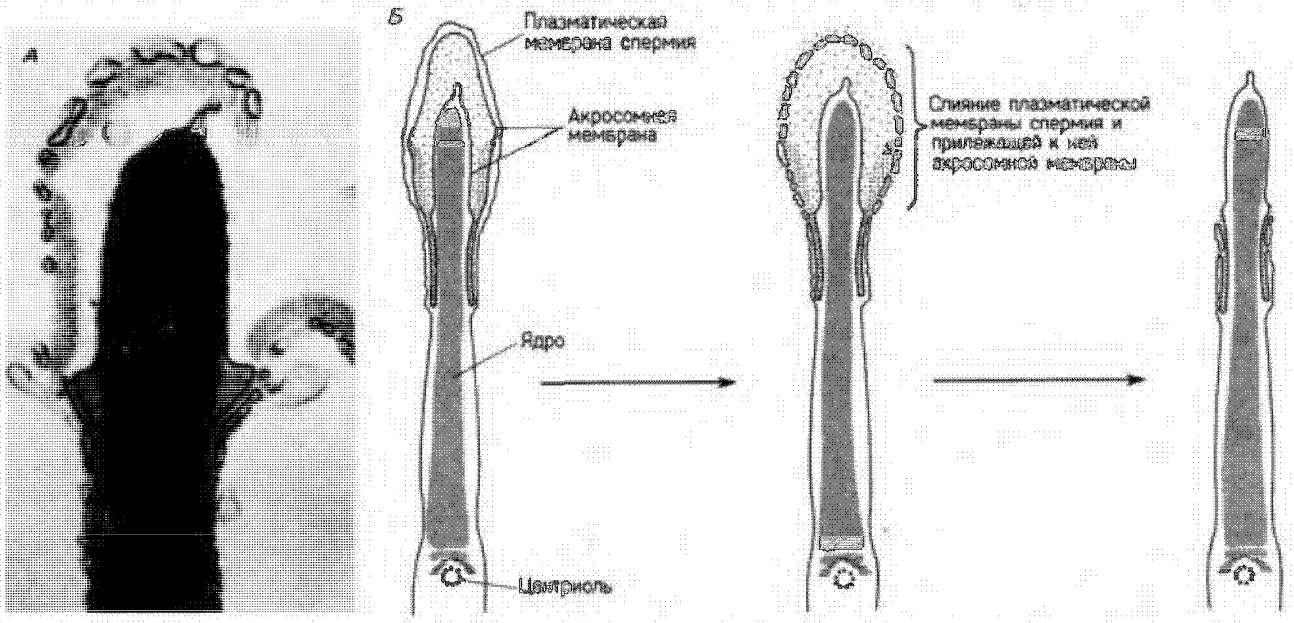


Рис. 2.11. Акросомная реакция спермия хомячка. *А*. Микрофотография спермия хомячка, осуществляющего акросомную реакцию, полученная с помощью просвечивающего электронного микроскопа. Можно видеть, что мембрана образует пузырьки. *Б*. Пояснительный схематический рисунок, выполненный по электронным микрофотографиям, который демонстрирует слияние акросомной и плазматической мембран в головке спермия. (*А* — из Meizel, 1984; фотография с любезного разрешения S. Meizel. *Б* — по Yanagimachi, Noda, 1970.)

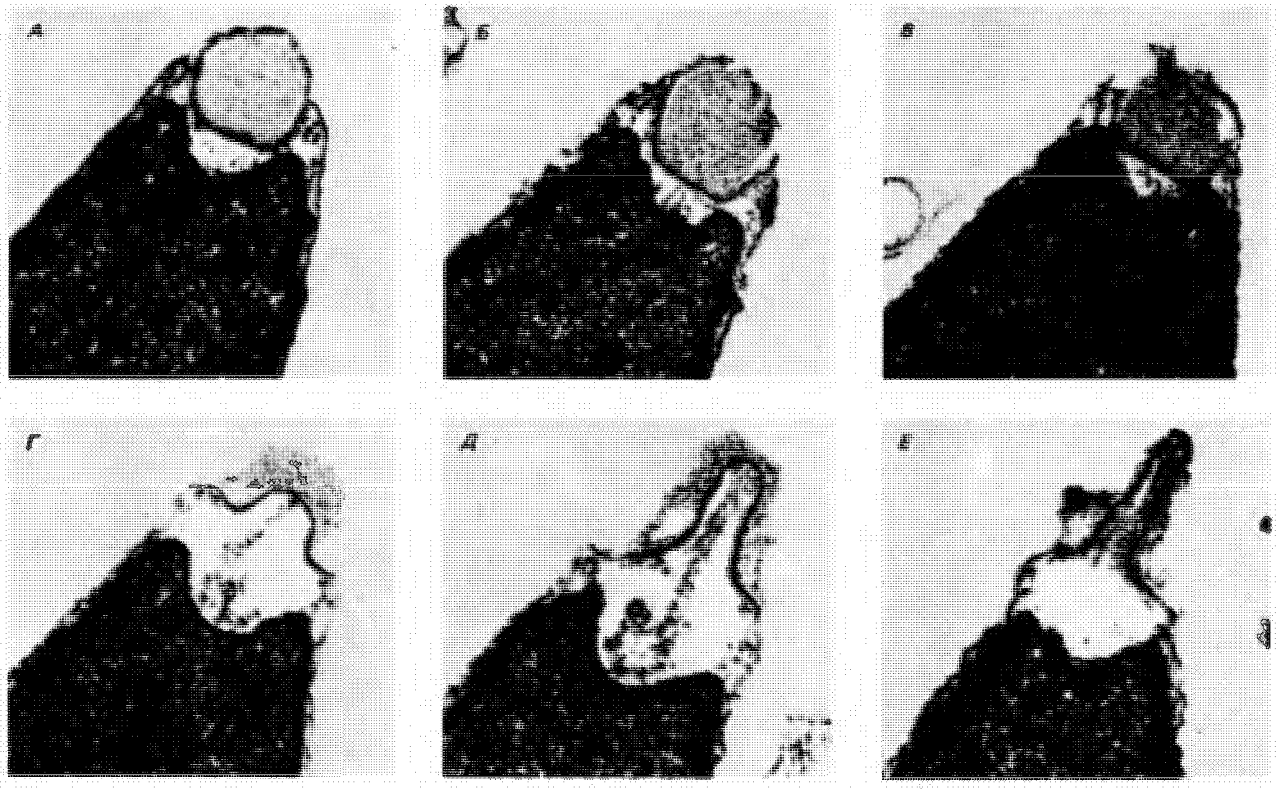


Рис. 2.12. Формирование акросомного выроста у спермия морского ежа. *А—В*. Экзоцитоз акросомного пузырька и высвобождение ферментов. *Г—Е*. Полимеризация актина приводит к образованию акросомного выроста. (Фотографии с любезного разрешения G. L. Decker и W. J. Lennarz.)

в образовании акросомного выроста (рис. 2.12). Этот вырост возникает в результате полимеризации молекул глобулярного актина и образования актиновых филаментов — процесс, вызываемый, как полагают, выходом ионов водорода из головки спермия (Tilney et al., 1978; Schackmann et al., 1978). До активации спермия полимеризация актина, вероятно, блокирована регуляторным белком; сопровождающее активацию повышение внутриклеточного pH может воспрепятствовать выполнению этой функции. Значительное повышение pH вызывает не только образование акросомного выроста, но и активирует динеиновую АТФазу в шейке спермия. В результате такой активации происходит быстрое использование АТФ и 50%-ное увеличение интенсивности дыхания митохондрий. Произведенная энергия используется главным образом для обеспечения движений жгутика (Tombes, Shapiro, 1985).

Действующее начало студенистой оболочки, инициирующее у морских ежей акросомную реакцию, часто бывает высокоспецифичным. Спермии морских ежей *Arbacia punctulata* и *Strongylocentrotus droebachiensis* реагируют только на воздействие материала студенистой оболочки яиц собственного вида. Однако спермии *S. purpuratus* могут быть активированы материалом студенистой оболочки яиц не только собственного вида, но и *Lytechinus variegatus* (но не *A. punctulata*) (Summers, Hylander, 1975). Следовательно, студенистая оболочка у некоторых видов (но не у всех) может обеспечивать видоспецифическое узнавание гамет.

Узнавание спермия и яйца: контакт между гаметами

Видоспецифическое узнавание у морских ежей

Сразу же после того, как спермий морского ежа проник в студенистую оболочку яйца, его акросомный вырост вступает в контакт с наружной поверхностью желточной оболочки (рис. 2.13). Основной этап видоспецифического узнавания осуществляется в этот момент. Белок акросомы, при посредстве которого происходит это узнавание, называется **биндином**. В 1977 г. Вакье с сотрудниками (Vacquier, Moy, 1977) изолировали этот нерастворимый белок с молекулярной массой 30 500 дальтон из акросомы спермиев *Strongylocentrotus purpuratus*: биндин способен

Рис. 2.13. Контакт акросомного выроста спермия морского ежа с микроворсинкой яйца. (Из Epel, 1977; фотография с любезного разрешения F. D. Collins и D. Epel.)

прикрепляться к яйцам *S. purpuratus*, освобожденным от студенистой оболочки, и к изолированным желточным оболочкам (рис. 2.14). Взаимодействие биндина с яйцом видоспецифично (Glabe, Vacquier, 1977; Glabe, Lennarz, 1979); этот белок, выделенный из акросомы спермиев *S. purpuratus*, вызывает агглютинацию яиц своего вида, освобожденных от студенистой оболочки, но не яиц близкородственного вида *S. franciscanus*.

Было обнаружено (Moy, Vacquier, 1979), что локализация биндина строго специфична — он находится на акросомном выросте, именно там, где он должен находиться, чтобы обеспечить узнавание спермием и яйцом друг друга. Использованный этими авторами метод иммунохимического окрашивания биндина представлен на рис. 2.15, *А*. Антитела к очищенному биндину морского ежа получали, инъецируя биндин кроликам. Спермии морского ежа, осуществившие акросомную реакцию, связывали этот антибиндин. После отмывания непрореагировавших антител спермии обрабатывали антителами свиньи, ковалентно связанными с пероксидазами и способными присоединяться к антителам кролика. В результате молекулы пероксидазы оказывались везде, где присутствовал биндин. Пероксидаза катализирует образование темного осадка при взаимодействии диаминобензидина и перекиси водорода. Когда к обработанным спермиям добавляли эти два субстрата, осадок покрывал акросомный вырост (рис. 2.15, *Б*). Более того, до осуществления акросомной реакции выявить биндин на поверхности спермия не удавалось, а затем его обнаруживали в месте соединения спермия с яйцом (рис. 2.15, *В*).

Данные биохимических исследований показали, что биндины близкородственных видов морских ежей на самом деле различны. Эти данные заставляют предположить существование на желточной оболочке видоспецифических рецепторов для связывания биндина. О том же свидетельствуют опыты по насыщению яиц морского ежа спермиями (Vacquier, Payne, 1973). Как видно на рис. 2.16, спермии прикрепляются к яйцу не на всей его поверхности. Даже в случаях насыщения спермиями (приблизительно 1500 спермиев на 1 яйцо) на поверхности желточной оболочки остаются свободные участки, что говорит об ограниченном числе мест для прикрепления спермиев. Из желточных оболочек яиц морского ежа был выделен крупный гликопротеиновый комплекс, который видоспецифическим образом связывал радиоактивный биндин (Glabe, Vacquier, 1978; Rossignol et al., 1984). Этот гликопротеин способен конкурировать с яйцами за спермии того же вида. Таким образом, если спермии *S. purpuratus* смешать с биндиновыми рецепторами из желточных оболочек *S. purpuratus*, то спермии прикрепятся к ним и не будут оплодотворять яйца. Однако выделенные биндиновые рецепторы *S. purpuratus* не препятствуют оплодотворению яиц родственных видов морских ежей. Следовательно, видоспецифическое узнавание гамет морского ежа происходит на двух уровнях — на уровне активации акросомной реакции и на уровне прикрепления спермия к желточной оболочке.

Соединение гамет у млекопитающих

До сих пор наше обсуждение касалось тех организмов, у которых оплодотворение происходит во внешней среде. У млекопитающих оплодотворение внутреннее и процесс оплодотворения приспособлен к внутренней среде организма. И в самом деле, было обнаружено, что у млекопитающих половые пути самки принимают активное участие в процессе оплодотворения. Спермии млекопитающих сразу после эякуляции не способны к акросомной реакции; для того чтобы эта реакция стала возможной, спермиям необходимо в течение некоторого времени находиться в половых путях самки. Условия, требующиеся для капацитации (приобретения спермиями оплодотворяющей способности), варьируют в зависимости от вида (Gwatkin, 1976); пребывание спермиев в половых путях самки может быть заменено их инкубацией in vitro в жидком содержимом яйцеводов или матки. Одна из гипотез относительно природы процесса капацитации постулирует, что процесс этот заключается в изменениях структуры липидов клеточ-

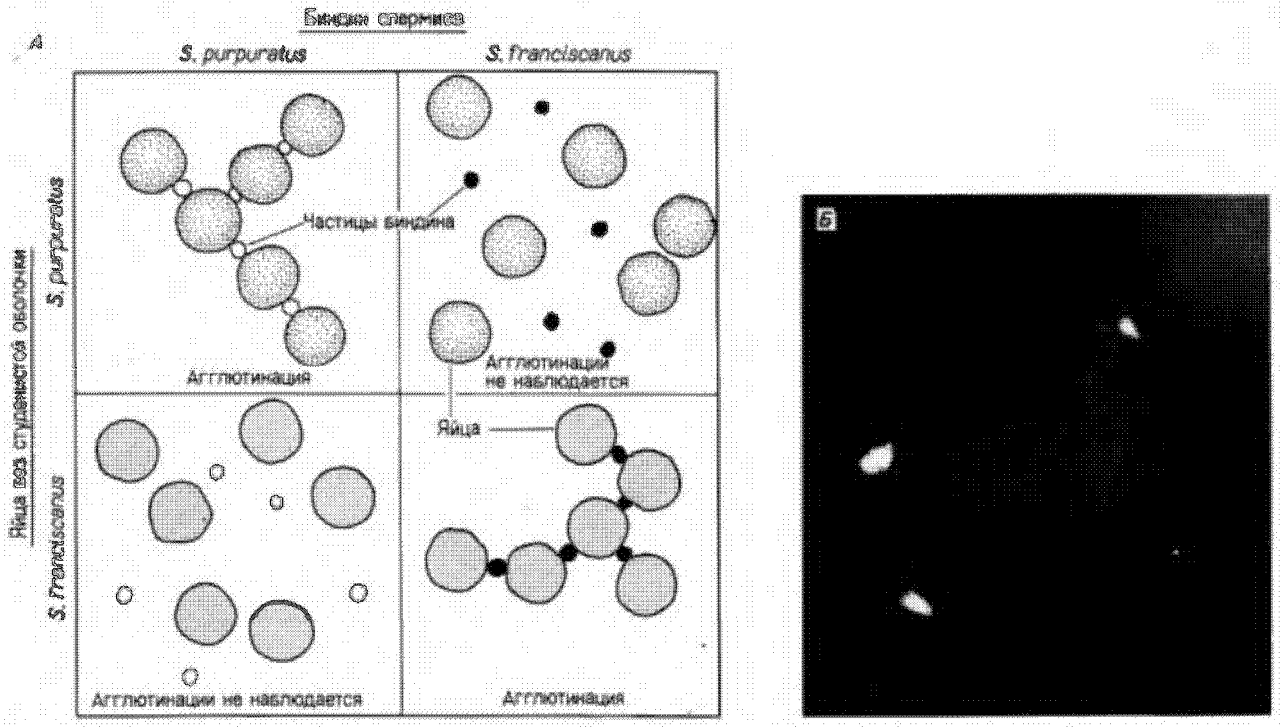


Рис. 2.14. Видоспецифическая агглютинация яиц, освобожденных от студенистой оболочки, при добавлении биндина. *А*. Агглютинацию вызывает добавление 213 мкг биндина в пластмассовую чашку, содержащую 0,25 мл 2%-ной (по объему) суспензии яиц. В течение 2—5 мин чашку осторожно покачивают и затем фотографируют (пояснительная схема сделана по фотографиям Glabe, Vacquier, 1977). *Б*. Микрофотография флуоресцирующих яиц *S. purpuratus*, соединенных друг с другом частицами биндина *S. purpuratus*, меченными флуоресцеином. В местах, где два яйца соприкасались, неизменно присутствовали частицы биндина. (Из Glabe, Lennarz, 1979; фотография с любезного разрешения авторов.)

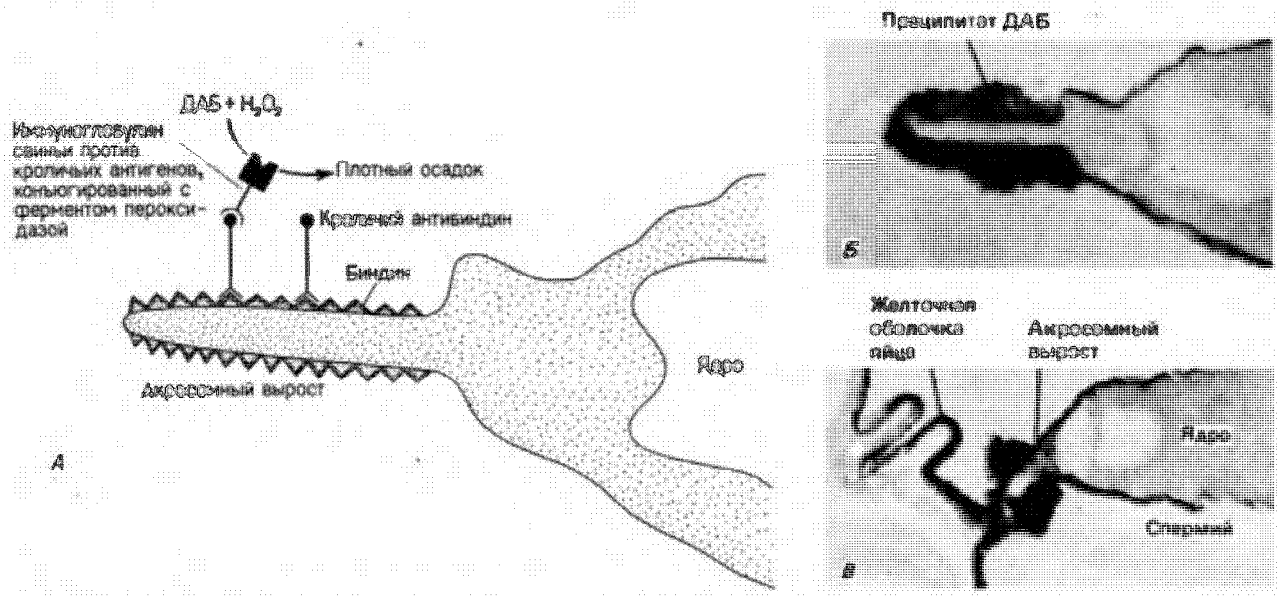


Рис. 2.15. Локализация биндина на акросомном выросте. *А*. Иммунохимический метод выявления локализации биндина. Кроличьи антитела взаимодействуют с обнажившимся биндином. Затем к этим антителам добавляют ковалентно связанные с молекулой пероксидазы антитела свиньи против кроличьих антител. Пероксидаза катализирует реакцию между диаминобензидином (ДАБ) и перекисью, в результате которой образуется электроноплотный осадок. Таким образом, этот осадок будет возникать только там, где имеется биндин. *Б*. Локализация биндина на акросомном выросте после акросомной реакции (× 133 200). *В*. Локализация биндина на акросомном выросте в месте соединения спермия с яйцом. (*Б* и *В* — из Moy, Vacquier, 1979; фотографии с любезного разрешения V. D. Vacquier.)

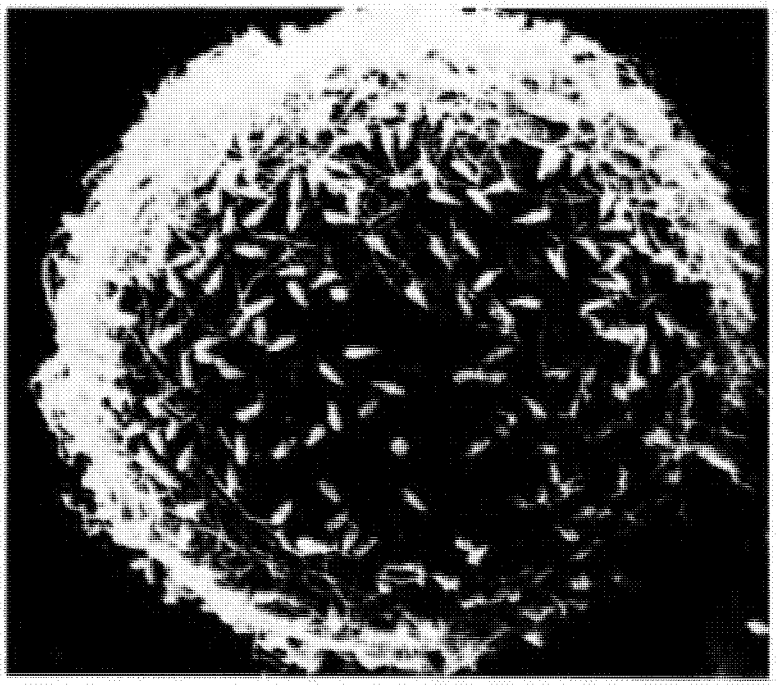


Рис. 2.16. Микрофотография спермиев морского ежа, прикрепившихся к желточной оболочке яйца, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Фотография с любезного разрешения C. Glabe, L. Perez, W.J. Lennarz.)

ной мембраны спермия. Это представление основывается на исследованиях (Davis et al., 1980), которые показывают, что соотношение холестерин : фосфолипиды в мембране спермия по мере капацитации снижается и что молекулы альбумина, имеющиеся в половых путях самки, способны отнимать холестерин у спермия. Продолжительность капацитации различна у разных видов и тесно коррелирует с временем, требующимся для изменения соотношения холестерин : фосфолипиды (Davis, 1981). Полагают, что снижение содержания холестерина дестабилизирует мембрану акросомного пузырька и что без таких изменений липидного состава слияние мембран, наблюдающееся при акросомной реакции, не может осуществиться. Вместе с тем при капацитации с поверхности спермия удаляются особые, связанные с ней вещества ("coating factors"), которые, оставаясь на поверхности, препятствуют оплодотворению (Yanagimachi, 1981).

Вопрос о том, как инициируется акросомная реакция у млекопитающих, остается спорным; местонахождение спермиев в момент ее инициации у разных видов может быть различным. Это различие, вероятно, сопряжено с разной способностью спермиев проникать через лучистый венец, окружающий яйцо. У некоторых видов акросомная реакция происходит, по-видимому, в то время, когда спермий находится на некотором расстоянии от яйца. Так, например, по имеющимся данным, у кролика акросомная реакция может быть индуцирована растворимыми веществами, выделяемыми яйцом (Bedford, 1968), тогда как у морской свинки она происходит в определенное время независимо от присутствия яиц (Yanagimachi, Usui, 1974). В этих случаях акросомная реакция приводит к выделению ферментов, лизирующих связи между клетками лучистого венца (Zaneveld, Williams, 1970; Williams, 1972). Выделяемые ферменты, называемые **лизинами**, включают **гиалуронидазу**, расщепляющую гиалуроновую кислоту, которая составляет бо́льшую часть внеклеточного матрикса, и **фермент, рассеивающий клетки лучистого венца**, специфическим образом разрушая связи между ними. С помощью этих ферментов спермий проходит через лучистый венец и достигает прозрачной оболочки яйца.

У наиболее хорошо изученных млекопитающих — мыши и хомячка — акросомная реакция происходит *после* прикрепления спермия к прозрачной оболочке (Saling et al., 1979; Florman, Storey, 1982; Cherr et al., 1986). У этих животных спермии способны, по-видимому, проникать через лучистый венец, не выделяя больших количеств гиалуронидазы (Talbot at al., 1985).

Прозрачная оболочка яиц млекопитающих выполняет такую же роль, как и желточная оболочка у иглокожих. Прикрепление спермия к прозрачной оболочке лишь относительно, а не абсолютно видоспецифично (видовая специфичность при внутреннем оплодотворении — не столь важная проблема). Спермии мыши можно лишить способности прикрепляться к прозрачной оболочке яиц своего вида, если их предварительно инкубировать с гликопротеина-

ми этой оболочки. В этом опыте активным конкурентом яйца является гликопротеин с молекулярной массой 83 000 дальтон (ZP3), выделенный из прозрачной оболочки (Bleil, Wassarman, 1980, 1986; см. рис. 2.17). Таким образом, в прозрачной оболочке содержится особый гликопротеин, к которому прикрепляется спермий. После того как прикрепление произошло, тот же самый белок, как было показано, возбуждает акросомную реакцию. Это позволяет спермию мыши концентрировать свои протеолитические ферменты непосредственно в месте прикрепления к прозрачной оболочке.

Спермии всех млекопитающих содержат лизин, разрушающий прозрачную оболочку в месте прикрепления (Stambaugh, Buckley, 1960). Этот лизин, называемый акрозином, по аминокислотной последовательности очень сходен с трипсином, и чтобы начать работать, он, подобно трипсину, должен быть активирован. Было установлено (Wincek et al., 1979; Stambaugh, Mastroianni, 1980), что акрозин, находящийся в акросомном пузырьке, неактивен, но под воздействием гликопротеина из половых путей самки происходит его активация. Здесь мы опять убеждаемся в том, что половые пути самки являются не просто каналами для проведения спермы, но и активными участниками процесса оплодотворения.

Молекулярный механизм, с помощью которого прозрачная оболочка яйца и спермий млекопитающих узнают друг друга, полностью еще не изучен. Распространенная гипотеза, предложенная для объяснения механизма соединения гамет у млекопитающих, постулирует существование на поверхности спермия белка, способного узнавать видоспецифический углевод гликопротеина прозрачной оболочки (Wassarman, 1987). Показано (Florman et al., 1984; Florman, Wassarman, 1985), что у мыши важную роль в узнавании спермия прозрачной оболочкой играет углеводная группа на гликопротеине ZP3. После удаления этих углеводных групп ZP3 утрачивает способность конкурировать за прикрепление спермия (однако для инициации акросомной реакции, по-видимому, необходима вся молекула гликопротеина). В лаборатории Шура (Shur, Hall, 1982a,b; Lopez et al., 1985) с использованием другого подхода было показано, что рецепторы спермия для прозрачной оболочки представляют собой фермент на поверхности его головки, который узнает сахар N-ацетилглюкозамин (рис. 2.18*А*). Этот фермент (N-ацетилглюкозамин : галактозилтрансфераза) встроен в плазматическую мембрану спермия непосредственно над акросомой, причем его активный центр обращен наружу. Эта гликозилтрансфераза, вероятно, катализирует присоединение галактозы к углеводной цепи, оканчивающейся N-ацетилглюкозамином. Однако в половых путях самки отсутствуют активированные остатки галактозы. Поэтому, хотя фермент может присоединяться к N-ацетилглюкозаминовым остаткам белков zona pellucida (возможно, к ZP3, что, однако, еще не установлено) точно так же, как любой фермент соединяется с субстратом, он не может катализировать реакцию, поскольку второй ее участник отсутствует. В результате ферменты (на спермии) остаются связанными со своими субстратами (на яйце).

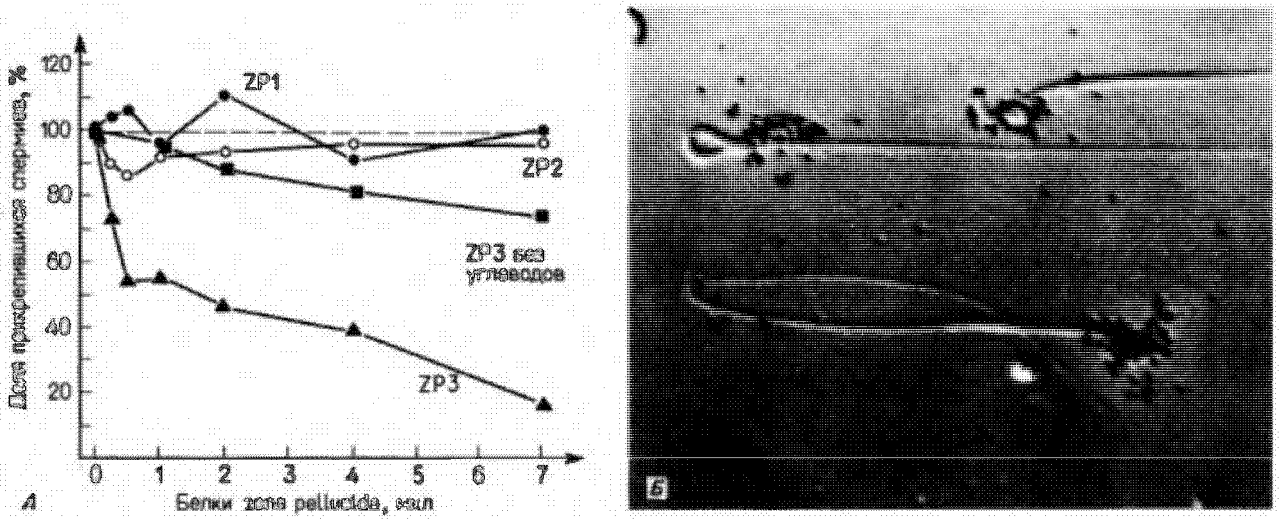


Рис. 2.17. Прикрепление спермия к прозрачной оболочке. *А*. Опыт, показывающий специфическое снижение доли спермиев, прикрепившихся к прозрачной оболочке, при инкубации оболочек и спермиев мыши с возрастающими количествами гликопротеина ZP3. Этот рисунок демонстрирует также значение углеводной части ZP3. *Б*. Прикрепление ZP3 с радиоактивной меткой к капацитированным спермиям мыши. (*А* — по Bleil, Wassarman, 1980; Florman, Wassarman, 1985; *Б* — из Bleil, Wassarman, 1986; с любезного разрешения авторов.)

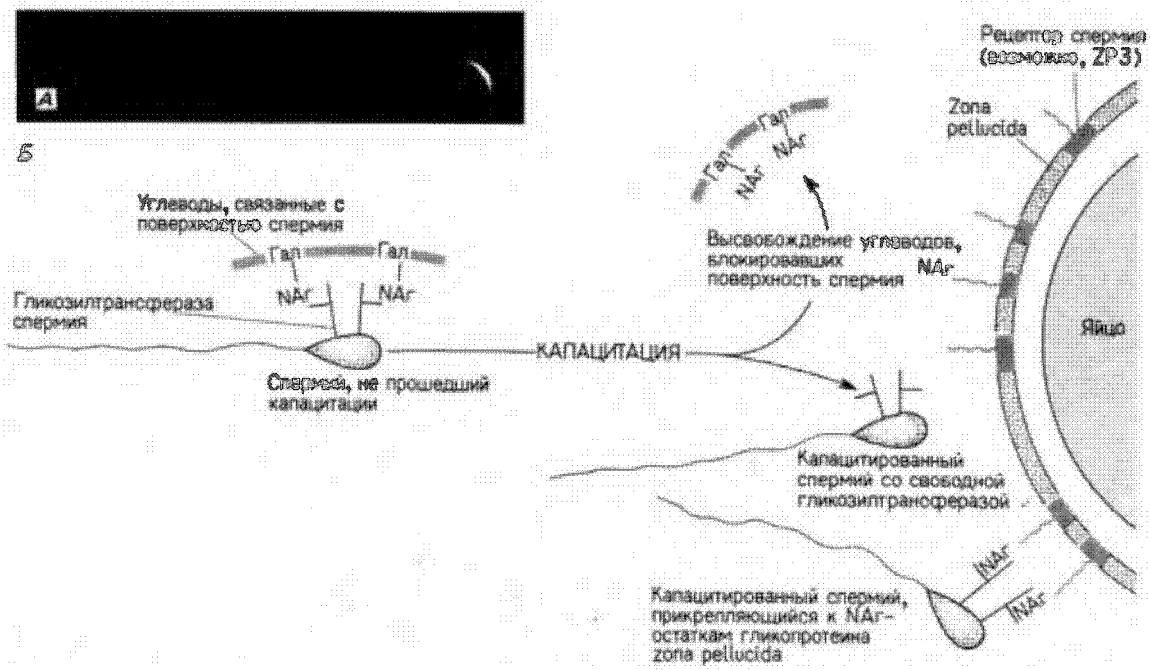


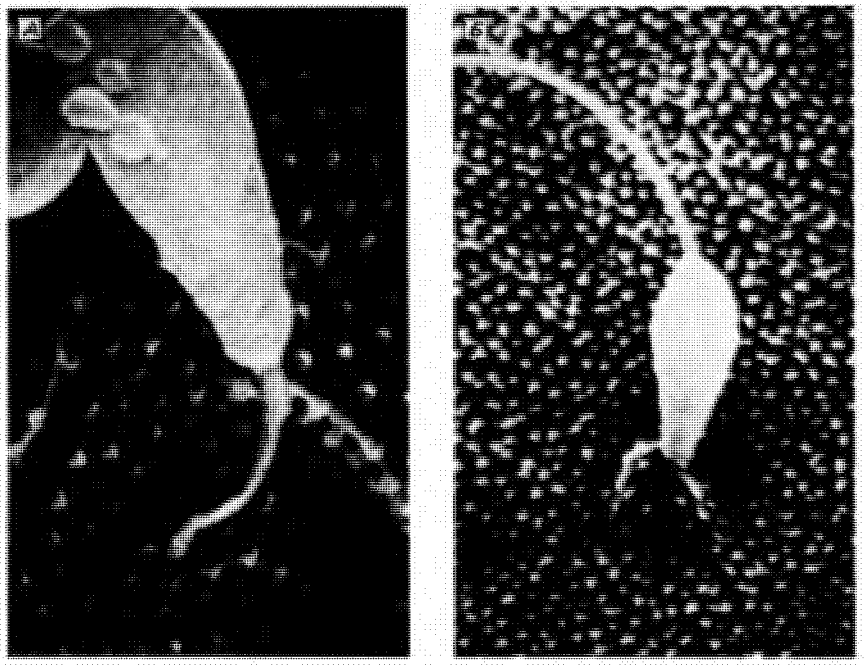
Рис. 2.18. Галактозилтрансфераза спермиев мыши. *А*. Флуоресцирующие антитела к галактозилтрансферазе спермиев мыши выявляют ее в плазматической мембране спермия над акросомой. *Б*. Модель узнавания спермием и яйцом друг друга. Поверхность спермия содержит фермент, галактозилтрансферазу, способную узнавать концевые остатки N-ацетилглюкозамина. В спермиях, не прошедших капацитации, активные центры этого фермента блокированы связанными с их поверхностью углеводами, включающими остатки N-ацетилглюкозамина (NAr) и галактозы (Гал). При капацитации эти углеводы отделяются от поверхности спермия, освобождая активные центры галактозилтрансфераз. Теперь галактозилтрансферазы могут узнавать N-ацетилглюкозаминовые остатки в молекуле гликопротеина ZP3 на поверхности прозрачной оболочки. Представленная модель объединяет результаты многих исследований. Однако идентичность галактозилтрансферазного рецептора с ZP3 до сих пор не доказана. (По Lopez et al., 1985; фотография с любезного разрешения B. Shur.)

Если приведенная гипотеза справедлива, то прикрепление спермия можно предотвратить ингибированием фермента или добавлением второго участника реакции — активированной галактозы. Именно такой результат и был получен Шуром с сотрудниками: как при ингибировании гликозилтрансферазы (антителами), так и при завершении реакции (путем добавления УДФ-галактозы) спермий к яйцу не прикреплялся. Эти данные позволили связать обнажение гликозилтрансферазы на поверхности спермия с его капацитацией. Уже около десятка лет известно, что одно из проявлений капацитации — приобретение спермием способности узнавать прозрачную оболочку яйца. На поверхности спермия, не прошедшего капацитации, находятся углеводы ("coating factors"), которые препятствуют его прикреплению к яйцу. При капацитации эти углеводы удаляются, а когда их добавляют к капацитированным спермиям, то спермии утрачивают способность прикрепляться к яйцам. Углеводы, блокирующие прикрепление спермия, представляют собой, по-видимому, полимер из повторяющихся остатков галактозы и N-ацетилглюкозамина — именно тот тип молекулы, который способен связывать активный центр гликозилтрансферазы в головке спермия. Объединение накопленных данных позволяет создать модель, представленную на рис. 2.18,*Б*. Прозрачная оболочка выступает как носитель субстрата — остатков N-ацетилглюкозамина, а спермий — молекул гликозилтрансферазы, которые к этим остаткам прикрепляются. Капацитация обнажает гликозилтрансферазы на поверхности спермия, и их соединение с N-ацетилглюкозаминовыми остатками прозрачной оболочки по типу ключ—замок прикрепляет спермий к яйцу. Такая же гликозилтрансфераза была обнаружена в спермиях морской свинки и человека, но ее роль в соединении гамет у этих видов предстоит еще выяснить.

Слияние гамет и предотвращение полиспермии

Слияние плазматических мембран спермия и ооцита

Вслед за узнаванием спермия желточной (или прозрачной) оболочкой яйца происходят лизис ча-



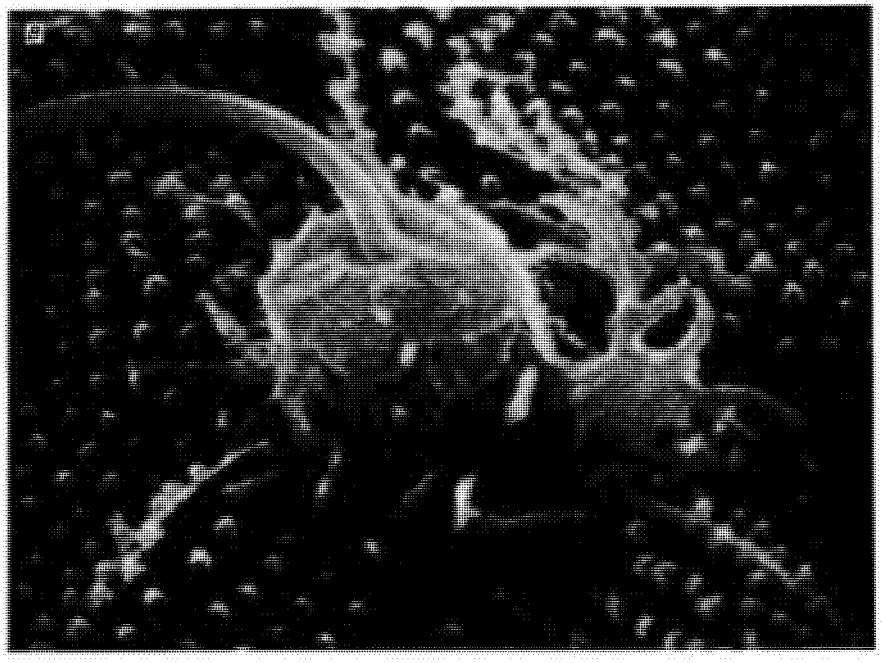


Рис. 2.19. Проникновение спермия в яйцо морского ежа. *А—В*. Микрофотографии, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа. *А*. Контакт головки спермия с микроворсинкой яйца, осуществляемый посредством акросомного выроста. *Б*. Образование воспринимающего бугорка по мере того, как микроворсинки выпячиваются и сливаются с погружающимся спермием. *В*. Спермий вовлекается в яйцо. *Г*. Микрофотография спермия, проникающего в яйцо через воспринимающий бугорок, полученная с помощью просвечивающего электронного микроскопа. (*А—В* — из Schatten, Mazia, 1976; фотографии с любезного разрешения: *А*, *Б* и *В* — G. Schatten, *Г* — F. J. Longo.)

сти этой оболочки в области головки спермия (Colwin, Colwin, 1960; Epel, 1980), в результате чего плазматические мембраны спермия и яйца сливаются.

Проникновение спермия в яйцо морского ежа представлено на рис. 2.19. Поверхность яйца покрыта небольшими выростами, называемыми микроворсинками. Контакт между спермием и яйцом вызывает, по-видимому, полимеризацию актина и увеличение размеров микроворсинок (Summers et al., 1975; Schatten, Schatten, 1980, 1983), которые формируют воспринимающий бугорок. Этот цитоплазматический бугорок имеет в среднем высоту 6,7 и ширину 2 мкм. Здесь снова проявляется гомология между яйцом и спермием, поскольку временно существующий воспринимающий бугорок, подобно акросомному выросту, возникает в результате полимериза-

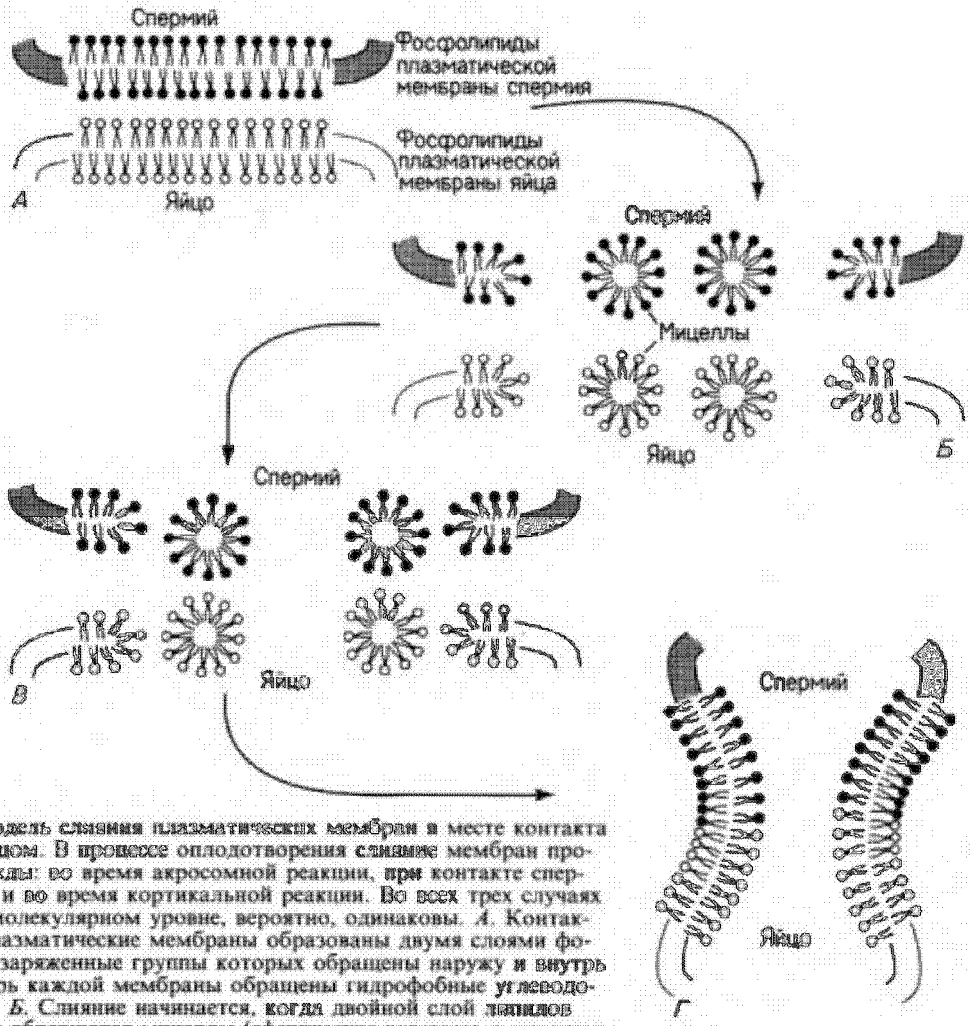


Рис. 2.20. Модель слияния плазматических мембран в месте контакта спермия с яйцом. В процессе оплодотворения слияние мембран происходит трижды: во время акросомной реакции, при контакте спермия с яйцом и во время кортикальной реакции. Во всех трех случаях события на молекулярном уровне, вероятно, одинаковы. *А*. Контактирующие плазматические мембраны образованы двумя слоями фосфолипидов, заряженные группы которых обращены наружу и внутрь клетки. Внутрь каждой мембраны обращены гидрофобные углеводородные цепи. *Б*. Слияние начинается, когда двойной слой липидов нарушается и образуются мицеллы (сферические агрегаты, у которых заряженные группы обращены наружу, а незаряженные гидрофобные цепи — внутрь). При перераспределении этих мицелл (*В*) плазматические мембраны восстанавливаются (*Г*), соединяя две ранее обособленные клетки.

ции актина. Мембраны спермия и яйца сливаются, и материал плазматической мембраны спермия может быть позднее обнаружен в мембране оплодотворенного яйца. Ядро спермия и его хвост проникают через цитоплазматический мостик, который расширяется благодаря полимеризации актина. Лонго (Longo, 1986) высказал предположение, что у морского ежа *Arbacia* мембранный материал для воспринимающего бугорка дают в основном окружающие микроворсинки (которые при этом укорачиваются). Следует отметить, однако, что не все компоненты плазматической мембраны спермия могут входить в состав мембраны оплодотворенного яйца. Часть материала мембраны спермия остается в месте его прикрепления, но не обязательно в составе плазматической мембраны. Была предложена гипотеза (Manes, Barbieri, 1976, 1977), согласно которой локализация компонентов спермия в ограниченной области приводит к возникновению в клетке асимметрии, которая задает определенную направленность плоскости первого деления дробления и движениям компонентов цитоплазмы в яйце.

У морских ежей все области яйца способны к восприятию спермия. У некоторых амфибий и многих беспозвоночных узнавание спермия и слияние с ним происходят лишь в специализированных областях плазматической мембраны яйца (Vacquier, 1979). О механизме слияния гамет известно довольно мало, однако было показано (Hirao, Yanagimachi, 1978), что важную роль в этом процессе играют фосфолипиды плазматической мембраны. Эти данные согласуются с представленной на рис. 2.20 моделью.

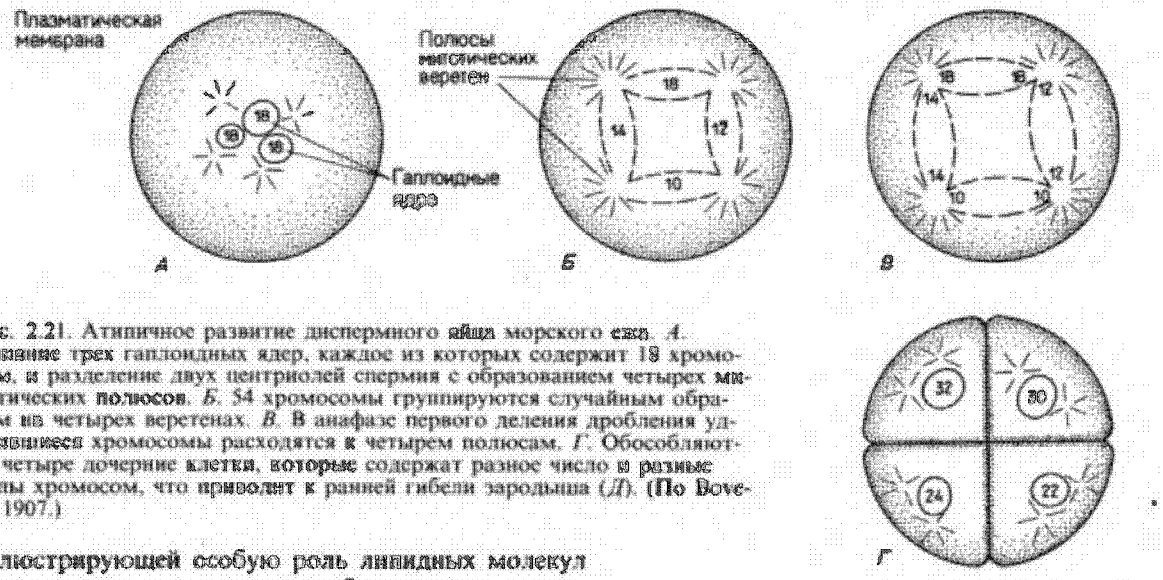


Рис. 2.21. Атипичное развитие диспермного яйца морского ежа. *А*. Слияние трех гаплоидных ядер, каждое из которых содержит 18 хромосом, и разделение двух центриолей спермия с образованием четырех митотических полюсов. *Б*. 54 хромосомы группируются случайным образом на четырех веретенах. *В*. В анафазе первого деления дробления удвоившиеся хромосомы расходятся к четырем полюсам. *Г*. Обособляются четыре дочерние клетки, которые содержат разное число и разные типы хромосом, что приводит к ранней гибели зародыша (*Д*). (По Boveri, 1907.)

иллюстрирующей особую роль липидных молекул в слиянии плазматических мембран гамет.

Слияние представляет собой активный процесс, часто опосредованный специфическими «фузогенными» (fusogenic) белками. Известно, что такие белки, как HA-белок вируса гриппа и F-белок вируса Сендай, способствуют слиянию клеток; не исключено, что биндин относится к белкам именно такого типа. Сравнительно недавно было обнаружено (Glabe, 1985), что биндин морского ежа вызывает слияние фосфолипидных пузырьков между собой и что, подобно вирусным фузогенным белкам, биндин содержит около своего N-конца протяженный участок гидрофобных аминокислот. У брюхоногого моллюска *Haliotis* лизин, растворяющий желточную оболочку, также обладает фузогенной активностью (Hong, Vacquier, 1986), а в головке спермиев морской свинки содержится белок, играющий важную роль в слиянии спермия и яйца у этого вида (Primakoff et al., 1987). Таким образом, один из белков головки спермия, по-видимому, стимулирует слияние плазматических мембран спермия и яйца.

Предотвращение полиспермии

Способность плазматической мембраны яйца к слиянию необходима для его соединения со спермием, однако, как только это слияние произойдет, такая способность становится опасным свойством. У морских ежей, как и у большинства изученных животных, каждый проникающий в яйцо спермий снабжает его гаплоидным ядром и центриолью. При нормальном моноспермном оплодотворении, когда в яйцо проникает только один спермий, гаплоидные ядра спермия и яйца соединяются, образуя диплоидное ядро оплодотворенного яйца (зиготы); при этом восстанавливается присущее данному виду число хромосом. Внесенная спермием центриоль делится и образует два полюса митотического веретена дробления.

Проникновение множества спермиев — полиспермия — у большинства животных приводит к гибельным последствиям. У морских ежей при оплодотворении двумя спермиями возникает триплоидное ядро, в котором каждая хромосома представлена не двумя, а тремя копиями. Такое оплодотворение приводит к вредным последствиям в особенности потому, что вместо нормального процесса — разделения хромосом с помощью биполярного веретена между двумя дочерними клетками — происходит распределение триплоидного набора между четырьмя клетками. А поскольку не существует механизма, который обеспечил бы получение каждой из четырех дочерних клеток нормального числа и всех необходимых типов хромосом, последние распределяются неравномерно: одни клетки получают лишние копии некоторых хромосом, тогда как у других эти хромосомы отсутствуют (рис. 2.21). Теодор

Бовери в 1902 г. показал, что такие клетки либо погибают, либо развиваются атипично.

В процессе эволюции животные выработали разные способы, позволяющие избежать объединения более чем двух гаплоидных ядер. Самый обычный способ заключается в том, чтобы предотвратить проникновение в яйцо более чем одного спермия. В яйце морского ежа имеются два механизма защиты от полиспермии: быстрая реакция, которая осуществляется путем электрических изменений в плазматической мембране, и более медленная реакция, вызванная экзоцитозом кортикальных гранул.

БЫСТРЫЙ БЛОК ПОЛИСПЕРМИИ. Для оплодотворения необходимо, чтобы плазматическая мембрана яйца обладала способностью сливаться с мембраной спермия, однако она должна утрачивать эту способность сразу же после того, как первый сперматозоид вступит с ней в контакт (Just, 1919). Быстрый блок полиспермии достигает этой цели путем изменения электрического потенциала плазматической мембраны яйца.

Клеточная мембрана представляет собой своего рода барьер между цитоплазмой яйца и внешней средой, обладающий свойством избирательности, и концентрация ионов по обе стороны плазматической мембраны сильно различается. Это различие особенно значительно для ионов натрия (Na^+) и калия (K^+). В морской воде концентрация ионов натрия очень велика, тогда как в цитоплазме яйца свободных ионов натрия почти нет. Для ионов калия соотношение обратное. Такое состояние поддерживается плазматической мембраной, которая устойчиво препятствует проникновению натрия в ооцит и утечке ионов калия в окружающую среду. Если один электрод ввести в яйцо, а второй электрод поместить вне его, то можно измерить постоянную разность потенциалов по обе стороны плазматической мембраны. Этот мембранный потенциал покоя, как правило, имеет величину, равную примерно 70 милливольт, что обычно выражают как -70 мВ, поскольку содержимое клетки отрицательно заряжено по отношению к внешней среде.

В течение одной десятой секунды после прикрепления первого спермия мембрана деполяризуется и мембранный потенциал достигает положительного уровня. Это результат поступления в яйцо небольшого количества ионов натрия, которое доводит разность потенциалов до 0 или даже + 20 мВ (рис. 2.22). Спермии способны сливаться с мембранами, обладающими потенциалом покоя -70 мВ, но неспособны сливаться с мембранами, потенциал которых имеет менее отрицательное значение, чем -10 мВ. Неизвестно, каким образом прикрепление или проникновение спермия дает сигнал к открыванию натриевых каналов, однако недавно были получены данные (Gould, Stephano, 1987), которые могут дать ключ к пониманию этого процесса: из спермиев *Urechis* был выделен акросомный белок, способный открывать натриевые каналы в неоплодотворенном яйце *Urechis*. Более того, когда яйца подвергали воздействию этого белка, скорость поступления натрия и возникавшее в результате его поступления смещение мембранного потенциала были сходны с аналогичными изменениями, вызываемыми живыми спермиями. Открывание натриевых каналов в яйце индуцируется, по-видимому, *прикреплением* к нему спермия. При изучении оплодотворения у морского ежа *Lytechinus* с точной регистрацией времени наступления разных процессов было установлено, что натрий поступает в яйцо до слияния плазматических мембран гамет (Longo et al., 1986; Hinkley et al., 1986).

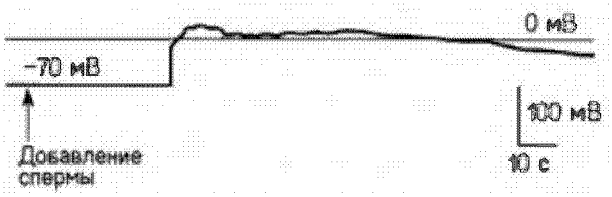
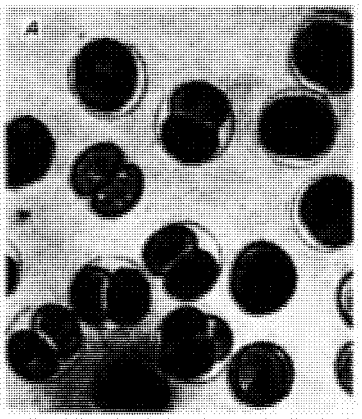
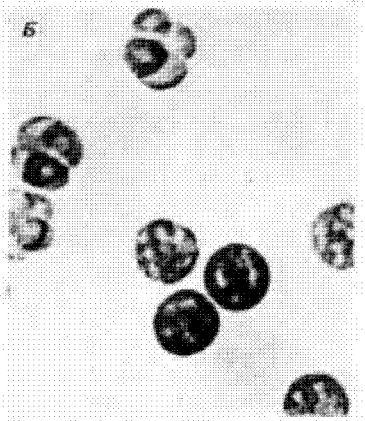


Рис. 2.22. Мембранный потенциал в яйце морского ежа до и после оплодотворения. До добавления спермы разность потенциалов по обе стороны плазматической мембраны составляла около -70 мВ (содержимое клетки имеет больший отрицательный заряд, чем ее окружение). Когда спермий соединяется с яйцом, за 0,1 с потенциал сдвигается в направлении положительных величин. (По Jaffe, 1980.)

Джеф (Jaffe, 1976) и ее сотрудники обнаружили, что можно индуцировать полиспермию путем искусственной фиксации потенциала на уровне -70 мВ и можно, наоборот, предотвратить оплодотворение, искусственно поддерживая потенциал на положительном уровне. Быстрый блок полиспермии можно также предотвратить, снижая концентрацию ионов натрия в воде (рис. 2.23). Если содержание ионов натрия недостаточно для того, чтобы вызвать смещение мембранного потенциала до положительных значений, то наблюдается полиспермия (Gould-Somero et al., 1979; Jaffe, 1980). Электрический блок полиспермии существует также у лягушки (Cross, Elinson, 1980), но его, по-видимому, нет у млекопитающих (Jaffe, Cross, 1983).

МЕДЛЕННЫЙ БЛОК ПОЛИСПЕРМИИ. Яйца морских ежей (и многих других животных) обладают еще одним механизмом для обеспечения моноспермности оплодотворения. Быстрый блок полиспермии действует недолго — мембранный потенциал в яйце морского ежа остается положительным только около одной минуты. Это кратковременное смещение потенциала может быть недостаточным для предотвращения полиспермии; было показано (Carroll, Epel, 1975), что если спермии, прикрепившиеся к жел-





В

[Na], мМ	Доля полиспермных яиц, %
50	100
120	97
360	26
490	22

Рис. 2.23. Полиспермия у морского ежа *L. pictus*, возникшая в результате оплодотворения в морской воде с низким содержанием натрия. *А*. Контрольные яйца, развивающиеся при концентрации Na^+, равной 490 мМ. *Б*. Полиспермия у яиц, оплодотворенных при концентрации Na^+, равной 120 мМ (натрий был заменен холином). Яйца сфотографированы на стадии первого деления дробления. *В*. Таблица, показывающая увеличение процента полиспермии при снижении концентрации ионов натрия. (Из Jaffe, 1980; фотографии любезно предоставлены L. A. Jaffe.)

точной оболочке, не будут удалены, то они могут еще проникнуть в цитоплазму. Удаление прикрепившихся сверхчисленных спермиев осуществляется посредством **кортикальной реакции**, более медленного механического блока полиспермии, который начинает действовать примерно через 1 мин после прикрепления спермия к яйцу.

В яйце морского ежа непосредственно под плазматической мембраной располагается 15 000 гранул диаметром около 1 мкм (рис. 2.6,*Б*). После осуществления контакта спермия с яйцом эти кортикальные гранулы сливаются с плазматической мембраной и выделяют свое содержимое в область между плазматической мембраной и желточной оболочкой. Белки, которые связывали желточную оболочку с поверхностью яйца, растворяются высвободившимися протеолитическими ферментами, а выделенные мукополисахариды создают осмотический градиент, который привлекает воду в пространство между плазматической мембраной и желточной оболочкой. В результате желточная оболочка отделяется от поверхности яйца; с этого момента ее называют **оболочкой оплодотворения**. Существенно, что в процессе кортикальной реакции желточная оболочка претерпевает важные изменения. Во-первых, воздействие протеаз приводит к изменению свойств биндиновых рецепторов или к их отделению вместе с прикрепленными к ним спермиями (Vacquier et al., 1973; Glabe, Vacquier, 1978). Во-вторых, пероксидаза вызывает затвердевание оболочки путем образования поперечных связей между остатками тирозина соседствующих белков (Foerder, Shapiro, 1977). Как видно из рис. 2.24, образование оболочки оплодотворения начинается в месте проникновения спермия и отсюда распространяется по всей поверхности яйца. По мере формирования этой оболочки спермии отделяются от яйца. Этот процесс начинается спустя примерно 20 с после прикрепления оплодотворяющего спермия и завершается к концу первой минуты после этого. Одновременно происходит выделение **гиалина** — белка, запасенного в кортикальных гранулах (Hylander, Summers, 1982),— который образует сплошной слой вокруг яйца. Плазматическая мембрана слипается с этим белком, и гиалиновый слой поддерживает бластомеры в период дробления.

У млекопитающих кортикальная реакция не вызывает образования оболочки оплодотворения, но тем не менее результат ее оказывается таким же, как у морских ежей: выделенные ферменты так изменяют рецепторы спермиев прозрачной оболочки, что они больше не удерживают спермии (Bleil, Wassarman, 1980). Этот процесс изменения свойств рецепторов спермиев носит название **реакции прозрачной оболочки** (**реакции zona pellucida** или, коротко, **реакции зоны** — zona reaction). Было высказано предположение (Florman, Wassarman, 1985), что кортикальные гранулы в яйцах мыши содержат фермент, который отщепляет концевые остатки сахара на ZP3, тем самым отделяя прикрепившиеся к прозрачной оболочке спермии и предотвращая прикрепление к ней новых спермиев.

Механизм кортикальной реакции сходен с механизмом акросомной реакции. В результате увеличения в процессе активации концентрации свободных ионов кальция в клетке мембраны кортикальных гранул сливаются с плазматической мембраной яйца, тем самым вызывая экзоцитоз их содержимого (рис. 2.25). Вслед за слиянием кортикальных гранул с мембраной вокруг места проникновения спермия

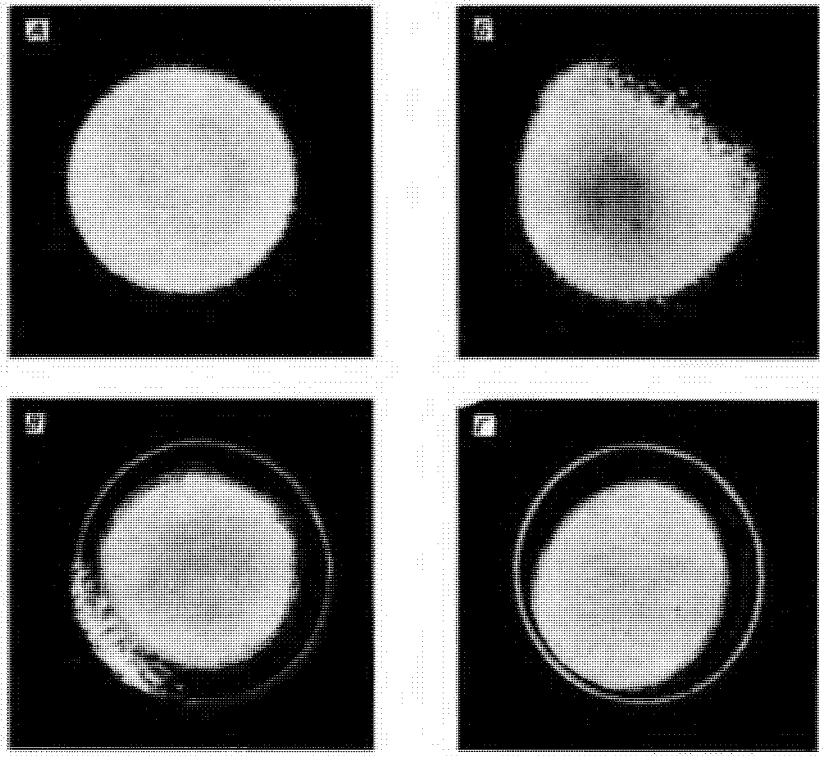


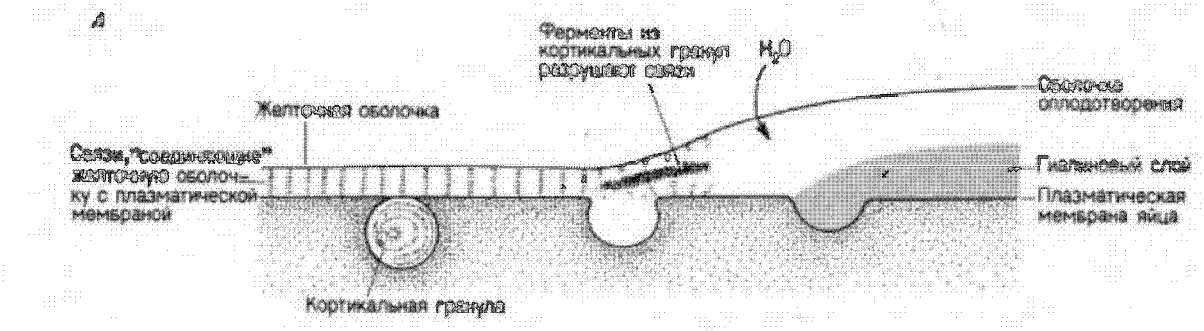
Рис. 2.24. Образование оболочки оплодотворения и удаление избыточных спермиев. Суспензию яиц морского ежа, к которой была добавлена сперма, фиксировали формальдегидом, чтобы исключить дальнейшее взаимодействие между гаметами. *А*. Через 10 с после добавления спермы. Видны спермии, окружающие яйцо. *Б, В*. Через 25 и 35 с после осеменения; вокруг яйца, начиная с места проникновения спермия, образуется оболочка оплодотворения. *Г*. Образование оболочки оплодотворения завершено, избыточные спермии удалены. (Из Vacquier, Payne, 1973; фотографии с любезного разрешения V. D. Vacquier.)

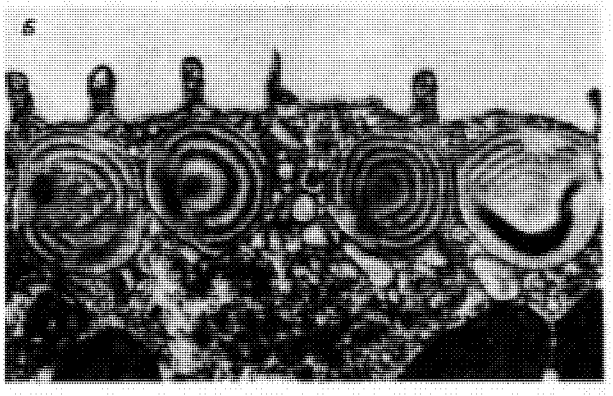
возникает волна экзоцитоза их содержимого, распространяющаяся по кортексу и завершающаяся на противоположной стороне яйца.

Нарастание концентрации свободных ионов кальция может быть визуализировано с помощью красителя экворина. Экворин — это белок, который выделяют из люминесцирующих медуз; при соединении со свободными ионами кальция он испускает свет. Этот белок инъецируют в яйца и затем оплодотворяют их. На рис. 2.26 продемонстрирована поразительная картина волны высвобождения кальция, которая распространяется по яйцу. Возникнув в месте проникновения спермия, светящаяся полоса смещается по поверхности и охватывает все яйцо (Gilkey et al., 1978; Steinhardt et al., 1977). Процесс высвобождения и связывания ионов кальция завершается за 1—2 мин; свободные ионы связываются почти сразу же, как только они высвобождаются.

В целом ряде экспериментов было показано, что ионы кальция непосредственно отвечают за распространение кортикальной реакции и что они запасаются в самом яйце. Первые данные, свидетельствующие об этом, были получены в 1974 г., когда неоплодотворенные яйца обработали ионофором А23187. Это соединение переносит ионы кальция через мембраны и позволяет им проникать через барьеры, непреодолимые иным путем. Помещение яиц морского ежа в морскую воду, содержащую А23187, вызывает кортикальную реакцию и отделение оболочки оплодотворения. Более того, эта реакция может происходить при полном отсутствии ионов кальция в морской воде. Следовательно, А23187 вызывает высвобождение ионов кальция, уже присутствующих в связанном состоянии в органеллах яйца (Chambers et al., 1974; Steinhardt, Epel, 1974). Данные, полученные позднее (Fulton, Whittingham, 1978; Hollinger, Schuetz, 1976), показали, что ионы кальция, инъецированные в яйца морского ежа, мыши, лягушки, инициируют кортикальную реакцию и что прокаин — анестетик, препятствующий высвобождению связанного кальция, — подавляет кортикальную реакцию в яйце морского ежа.

Внутриклеточные запасы ионов кальция, вероятно, сосредоточены в эндоплазматическом ретикулуме яйца. В яйцах морских ежей и лягушек, у которых происходит кортикальная реакция, в клетке имеется развитый эндоплазматический ретикулум, окружающий кортикальные гранулы (Gardiner, Grey, 1983; Luttmer, Longo, 1985; рис. 2.27). У двустворчатого моллюска *Spisula*, у которого кортикальной реакции не наблюдается (и у которого для активации яйца используется кальций наружной среды), в кортикальном слое яиц эндоплазматический ретикулум развит слабо. При центрифугировании яиц морского ежа были получены результаты, свидетельствующие о том, что источником ионов кальция является область, содержащая элементы эндоплаз-





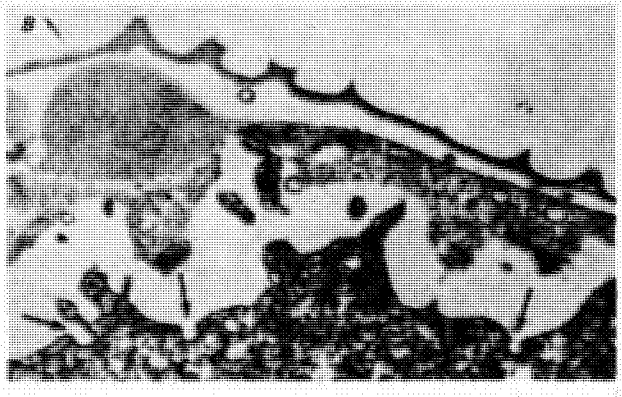


Рис. 2.25. Экзоцитоз кортикальных гранул. *А*. Схематический рисунок, иллюстрирующий последовательность событий при образовании оболочки оплодотворения и гиалинового слоя. При экзоцитозе кортикальных гранул из них высвобождаются пептидазы, которые разрушают связи между желточной оболочкой и плазматической мембраной. Содержавшиеся в кортикальных гранулах мукополисахариды создают осмотический градиент, обусловливающий поступление воды в пространство между желточной оболочкой и плазматической мембраной. Другие ферменты, высвобождающиеся из кортикальных гранул, вызывают затвердевание оболочки оплодотворения и отделение прикрепившихся к ней спермиев. *Б, В*. Микрофотографии кортикального слоя неоплодотворенного яйца морского ежа, полученные с помощью просвечивающего (*Б*) и сканирующего (*В*) электронного микроскопа. *Г, Д*. Микрофотографии той же области яйца вскоре после оплодотворения, на которых видны отделение оболочки оплодотворения и места, в которых кортикальные гранулы сливались с плазматической мембраной яйца (стрелки на рис. *Г*). Микрофотографии получены с помощью просвечивающего (*Г*) и сканирующего (*Д*) электронного микроскопа. (*А* — по Austin, 1965; *Б, В, Г* и *Д* — из Chandler, Heuser, 1979; фотографии с любезного разрешения D. E. Chandler.)

матического ретикулума (Eisen, Reynolds, 1985). У *Xenopus* в период созревания яиц объем эндоплазматического ретикулума в кортикальном слое увеличивается в 10 раз; исчезает он из кортикального слоя за одну минуту после того, как волна экзоцитоза кортикальных гранул пройдет через данную область. Эндоплазматический ретикулум кортекса, накапливающий кальций, сравнивают (Jaffe, 1983) с саркоплазматическим ретикулумом скелетных и сердечной мышц. Возникнув, процесс высвобождения кальция распространяется самопроизвольно. Свободный кальций способен вызвать выход связанного каль-

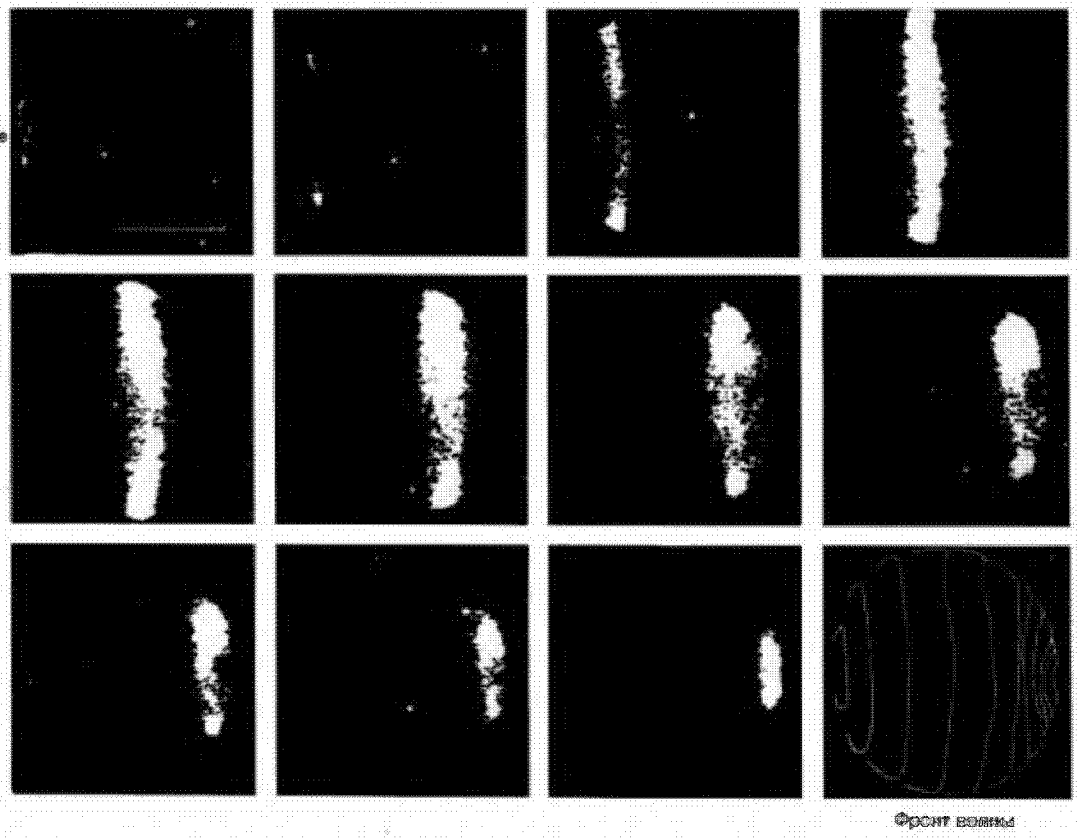


Рис. 2.26. Распространение волны свободных ионов кальция в яйце рыбы медаки. Яйцо, в которое инъецировали экворин, было ориентировано таким образом, что микропиле (место проникновения спермия) оказалось обращенным влево. Фотографии, полученные через 10-секундные интервалы, демонстрируют выход кальция из внутриклеточных депо в последовательно расположенных областях яйца. На последнем кадре представлено положение фронтов 11 волн. (Из Gilkey et al., 1978; фотографии с любезного разрешения L. F. Jaffe.)

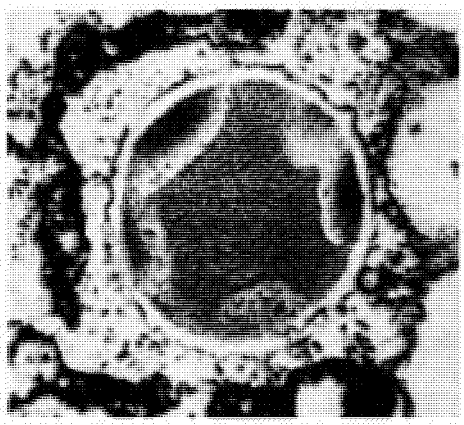


Рис. 2.27. Эндоплазматический ретикулум, окружающий кортикальную гранулу в яйце *Arbacia*. Эндоплазматический ретикулум был окрашен осмием-йодидом цинка, чтобы его можно было визуализировать с помощью просвечивающего электронного микроскопа. (Из Luttmer, Longo, 1985; фотография с любезного разрешения S. Luttmer.)

ция из мест, где он аккумулировался, создавая при этом волну высвобождения ионов кальция и экзоцитоз кортикальных гранул.

В природе существуют разные варианты стратегии защиты от полиспермии. У млекопитающих частота полиспермии бывает минимальной благодаря малому числу спермиев, достигающих места, где происходит оплодотворение (Braden, Austin, 1954). У хомячка плазматическая мембрана яйца способна сливаться со спермием даже на 4-клеточной стадии (Usui, Yanagimachi, 1976). Блок полиспермии у хомячков и мышей достигается, по-видимому, отделением рецепторов спермиев, находящихся на прозрачной оболочке (Miyazaki, Igusa, 1981; Jaffe et al., 1983). У кроликов же блок полиспермии осуществляется исключительно на уровне плазматической мембраны, и нет сомнений, что этот блок весьма эффективен. Наконец, у некоторых животных имеются механизмы защиты от полиспермии, о которых мы знаем очень мало. Так, в случае богатых желтком яиц некоторых птиц, рептилий и хвостатых ам-

фибрий в цитоплазму проникает по нескольку спермиев. Все спермии, за исключением одного, разрушаются после того, как женский пронуклеус сольется с одним мужским пронуклеусом (Elinson, 1986); факторы, вызывающие их разрушение, неизвестны. Каков бы ни был механизм элиминации сверхчисленных спермиев у этих животных, благодаря ему только одно гаплоидное сперматическое ядро получает возможность слиться с гаплоидным ядром яйца.

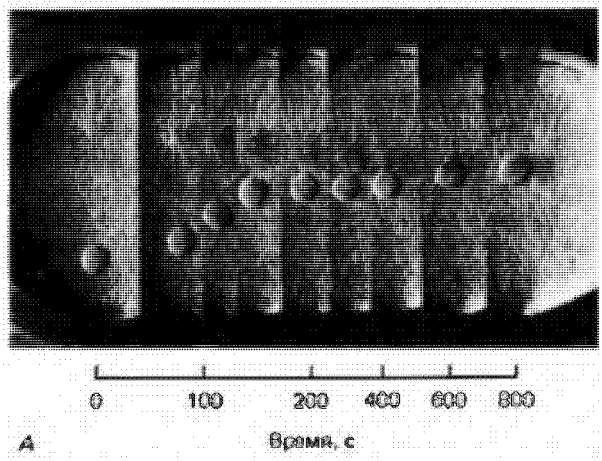
Слияние генетического материала

У морских ежей головка спермия проникает в яйцо перпендикулярно его поверхности. После слияния плазматических мембран спермия и яйца сперматическое ядро и центриоль отделяются от митохондрий и жгутика. Митохондрии и жгутик спермия разрушаются в цитоплазме яйца, и поэтому в дальнейшем их не удается обнаружить у развивающихся и взрослых организмов (Dawid, Blackler, 1972; Giles et al., 1980). Таким образом, митохондрии передаются зародышу только матерью.

Ядро яйца после завершения второго деления созревания и приобретения им пузыревидной формы называют женским пронуклеусом. Сперматическое ядро в цитоплазме яйца деконденсируется и преобразуется в мужской пронуклеус. Ядерная оболочка сперматического ядра распадается на мелкие пузырьки, что делает возможным воздействие цитоплазмы яйца на компактный хроматин спермия. Белки, благодаря которым хроматин спермия сохраняет конденсированное неактивное состояние, заменяются на белки сходного типа яйцевого происхождения. Эта замена приводит к деконденсации хроматина спермия (Green, Poccia, 1985). Хроматиновая масса удерживает остатки исходной оболочки сперматического ядра на своей поверхности. Вскоре по периферии этой массы выстраиваются новые мембранные пузырьки, которые соединяются с участками прежней оболочки и образуют новую оболочку мужского пронуклеуса.

После проникновения спермия в цитоплазму яйца мужской пронуклеус совершает поворот на 180°, так что центриоль спермия оказывается расположенной между мужским и женским пронуклеусами. Микротрубочки, отходящие от центриоли спермия, удлиняются и приходят в контакт с женским пронуклеусом, после чего оба пронуклеуса перемещаются навстречу друг другу (Hamaguchi, Hiramoto, 1980; Bestor, Schatten, 1981). У морского ежа в результате слияния пронуклеусов возникает диплоидное ядро зиготы (рис. 2.28). Синтез ДНК инициируется либо на стадии пронуклеусов (в период их миграции), либо после образования ядра зиготы.

У млекопитающих процесс сближения пронуклеусов (рис. 2.29; 2.30) продолжается около 12 ч в отличие от морского ежа, у которого он длится 1 ч. Головка спермия у млекопитающих проникает не перпендикулярно поверхности яйца, а почти по касательной к ней, сливаясь при этом с многочисленными микроворсинками. При деконденсации хроматина сперматического ядра его оболочка также разрушается и затем восста-



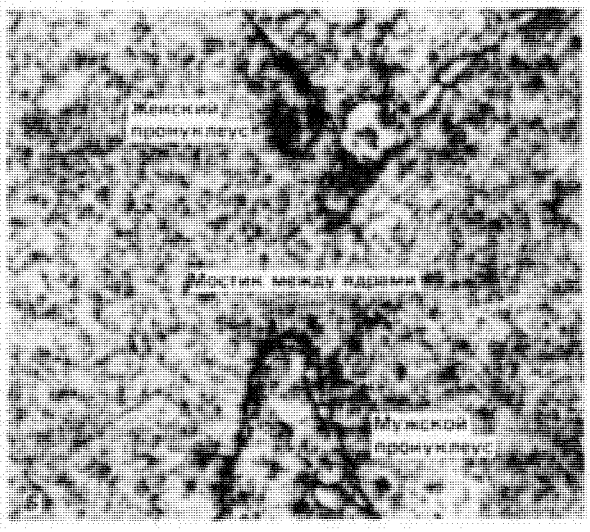


Рис. 2.28. Преобразования в ядре при оплодотворении у морского ежа. *А*. Миграция женского и мужского пронуклеусов в яйце *Clypeaster japonicus*. Мужской пронуклеус окружен микротрубочками спермальной звезды. Стрелки в нижней части рисунка указывают, в какое время производилось фотографирование. *Б*. Слияние пронуклеусов в яйце морского ежа. (*А* — из Hamaguchi, Hiramoto, 1980; фотография с любезного разрешения авторов. *В* — фотография с любезного разрешения F.J. Longo.)

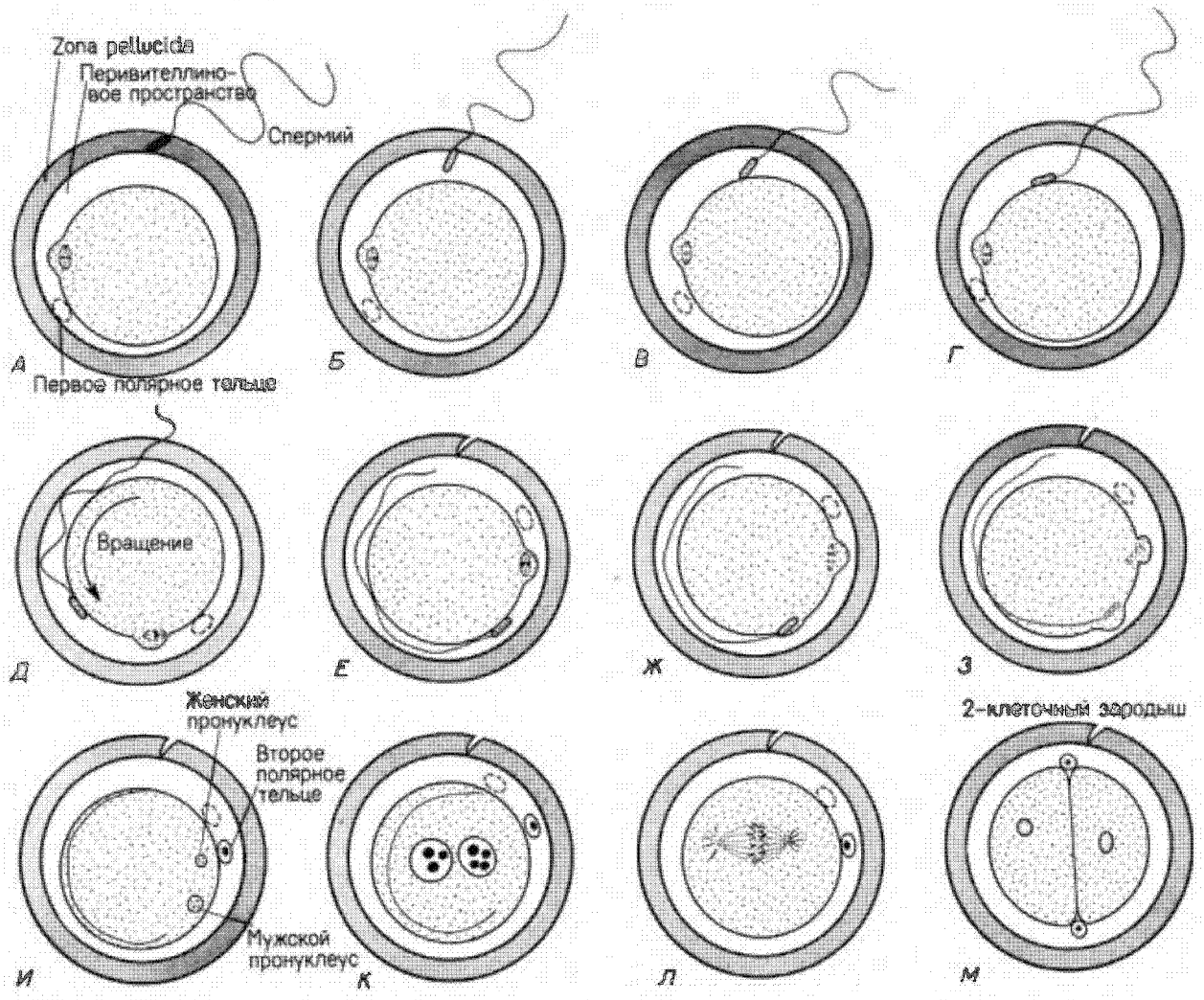


Рис. 2.29. Схема процесса оплодотворения у хомячка. *А.* Спермий прикрепляется к прозрачной оболочке. *Б.* Лизируя материал прозрачной оболочки, спермий прокладывает себе дорогу в перивителлиновое пространство между оболочкой и яйцом. После прикрепления спермия к яйцу (*В*) его головка ложится вдоль плазматической мембраны (*Г*). Прочное прикрепление спермия к яйцу и взмахи его хвоста вызывают вращение яйца (*Д*), причем спермий целиком проникает в перивителлиновое пространство (*Е*). Плазматические мембраны спермия и яйца сливаются (*Ж*), и головка спермия деконденсируется (*З*). После того как оба пронуклеуса набухнут и встретятся в центре яйца (*И, К*), их мембраны лизинтегрируются и начинается первое деление дробления (*Л, М*). (По Yanagimachi, 1981.)

дается заново путем слияния мембранных пузырьков. Деконденсацию хроматина можно вызвать искусственно путем обработки ядер спермиев кролика веществами, разрушающими дисульфидные мостики, поэтому не исключено, что ооцит содержит некое вещество, которое также разрушает эти связи (Calvin, Bedford, 1971; Kvist et al., 1980).

Пока ядро ооцита млекопитающих завершает второе мейотическое деление, мужской пронуклеус увеличивается в размерах. Затем оба пронуклеуса перемещаются навстречу друг другу, реплицируя ДНК в процессе миграции. Когда пронуклеусы приходят в контакт, их ядерные оболочки разрушаются. Происходит конденсация хроматина с образованием видимых хромосом, которые, как у большинства животных, располагаются на общем митотическом веретене первого деления дробления. Таким образом, у млекопитающих истинно диплоидное ядро впервые появляется не у зиготы, а у двухклеточного зародыша.

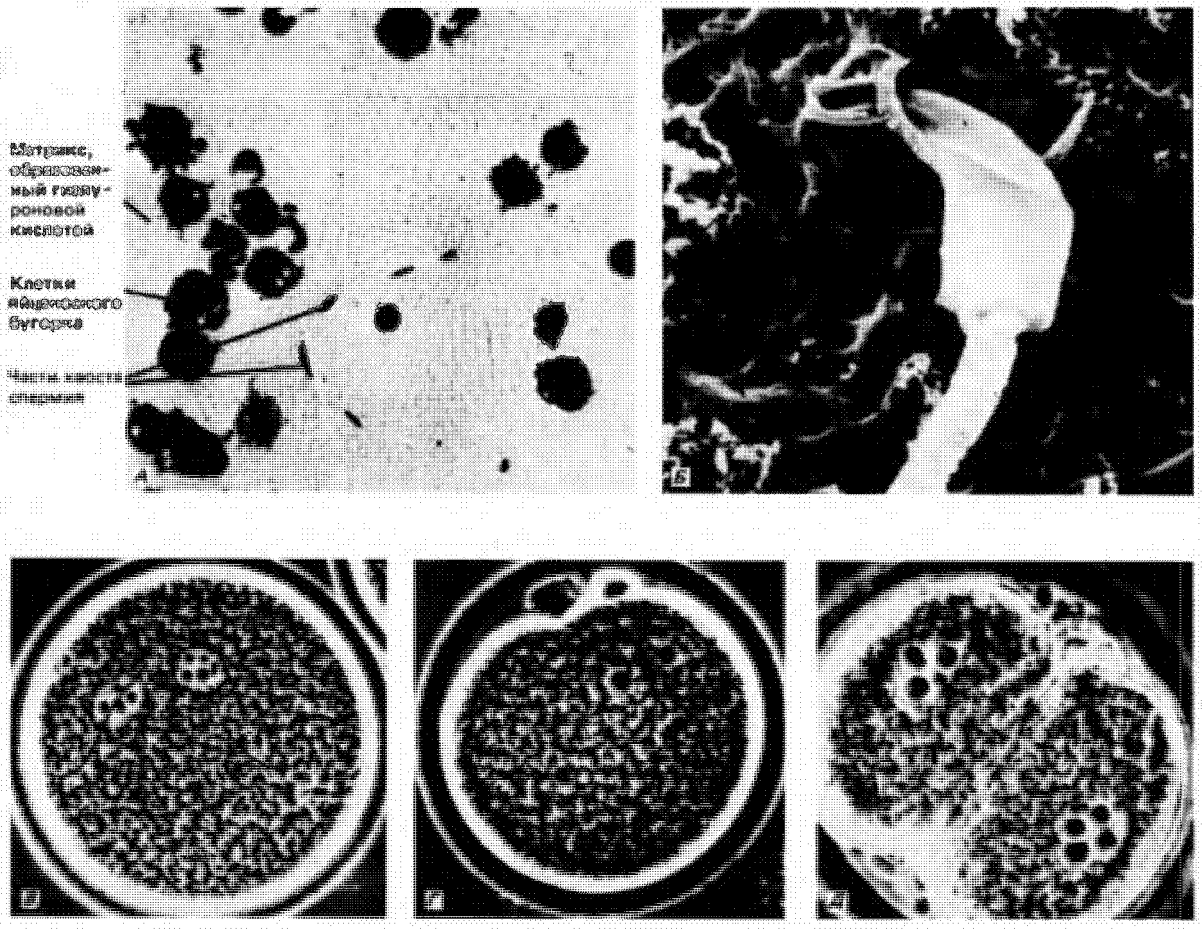


Рис. 2.30. Оплодотворение у хомячка. *А*. Спермий в яйценосном бугорке (видны выросты фолликулярных клеток). *Б*. Прикрепление головки спермия к прозрачной оболочке. *В*. Проникновение спермия в яйцо и набухание мужского пронуклеуса. В яйце можно видеть хвост спермия. *Г*. Установление контакта между мужским и женским пронуклеусами. *Д*. Двухклеточная стадия; видны две клетки одинакового размера с четко очерченными ядрами. В перивителлиновом пространстве находятся разрушающиеся полярные тельца. (*А* — из Yudin et al., 1988; *Б* — из Cherr et al., 1986; *В*—*Д* — из Bavister, 1980; фотографии с любезного разрешения D. Katz, G. Cherr и B. D. Bavister.)

Дополнительные сведения и гипотезы

Неравнозначность пронуклеусов у млекопитающих

Мужской и женский пронуклеусы у млекопитающих можно считать генетически эквивалентными, однако результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что между этими пронуклеусами имеются функциональные различия. У женщин иногда развивается опухоль матки, называемая хорионаденомой. В этом образовании плод отсутствует, но имеется гипертрофированная ткань плаценты. Показано, что большинство таких опухолей возникает при оплодотворении гаплоидным спермием безъядерной яйцеклетки. После проникновения спермия в цитоплазму число его хромосом удваивается, благодаря чему восстанавливается диплоидность. Таким образом, в этом случае весь геном оплодотворенного яйца берет начало от спермия (Jacobs et al., 1980; Ohama et al., 1981). Здесь мы встречаемся с ситуацией, при которой клетки выживают, делятся и имеют нормальное число хромосом, но развитие идет аномально.

О неравнозначности пронуклеусов у млекопитающих свидетельствуют также попытки инициировать

развитие яиц без оплодотворения спермием. Способность яйца развиваться без оплодотворения называется **партеногенезом** (от греч. parthénos — девственница и genesis — возникновение). Яйца многих беспозвоночных и некоторых позвоночных животных способны к нормальному развитию, если их активировать искусственно. В этих случаях участие спермия в развитии представляется необязательным. Однако у млекопитающих партеногенеза не наблюдается. Если при мейозе у мыши подавить отделение полярного тельца, то возникнут диплоидные яйца, в которых весь наследственный материал берет начало от матери. Такие клетки делятся и образуют зародышей с хордой, мышцами, скелетом и разными органами, включая бьющееся сердце. Но развитие продолжается недолго, и на 10—11 сут (середина беременности у мыши) между нормальными и партеногенетическими зародышами обнаруживаются глубокие различия (рис. 2.31). Партеногенетические зародыши утрачивают правильную организацию и дегенерируют (Surani et al., 1986). Следовательно, развитие мыши не может осуществляться под контролем только хромосом яйца.

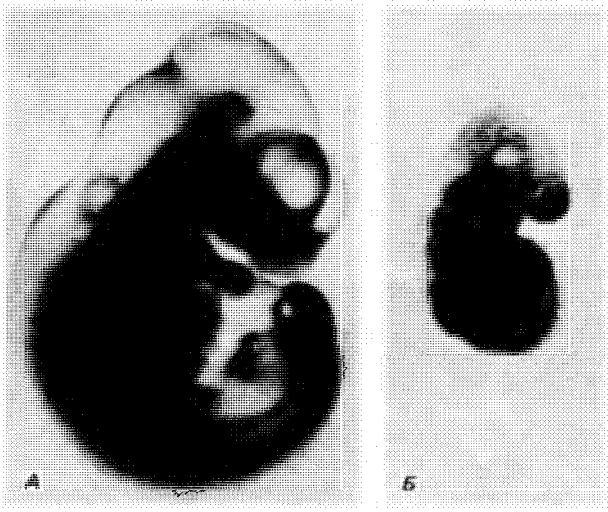
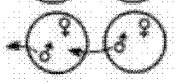


Рис. 2.31. Зародыши мыши на 11-й день беременности: *А* — контрольный, *Б* — партеногенетический (с двумя женскими пронуклеусами). Зародыши развивались в одной и той же самке. Помимо того, что партеногенетические зародыши имеют меньшие размеры и у них выявляются признаки дегенерации, размеры их плацент также значительно меньше. (Из Surani, Barton, 1983; фотография с любезного разрешения авторов.)

Гипотеза о разных свойствах мужского и женского пронуклеусов находит поддержку также в опытах пересадки пронуклеусов (Surani, Barton, 1983; McGrath, Solter, 1984). Мужской или женский пронуклеусы могут быть извлечены из яйца мыши вскоре после оплодотворения и пересажены в другие только что оплодотворенные яйца. (Эти пронуклеусы можно отличить один от другого, поскольку женский пронуклеус всегда расположен под полярными тельцами.) Таким образом можно получить зиготы с двумя мужскими или двумя женскими пронуклеусами. Эти зиготы дробятся, но развитие зародышей и первого, и второго типа не идет до конца, тогда как некоторые контрольные яйца после операции пересадки пронуклеуса (содержащие один мужской и один женский пронуклеусы из разных зигот) развиваются нормально (табл. 2.1). Более того, развитие мышиных зародышей с двумя женскими или двумя мужскими пронуклеусами прекращается в то же время, что и развитие партеногенетических мышиных зародышей. Таким образом, хотя у многих животных оба пронуклеуса эквивалентны, у млекопитающих между ними имеются важные функциональные различия. Эти различия могут быть обусловлены разными модификациями, претерпеваемыми ДНК в ядрах спермия и яйца (гл. 12). Для завершения развития зародыша млекопитающего необходимы оба пронуклеуса, материнский и отцовский.

Таблица 2.1. Опыты по пересадке пронуклеусов[1]

Тип реконструированных зигот	Операция	Число успешных пересадок	Число выживших зародышей
С двумя материнскими пронуклеусами		339	0
С двумя отцовскими пронуклеусами		328	0
Контроль		348	18

[1] McGrath, Solter, 1984.

Активация метаболизма яйца

До сих пор мы обсуждали механизмы, с помощью которых спермий и яйцо узнают друг друга, сливаются и благодаря которым происходит слияние их гаплоидных ядер. Но для того чтобы оплодотворение привело к развитию яйца, должны произойти изменения в его цитоплазме [1].

Зрелое яйцо морского ежа представляет собой метаболически инертную клетку, которую активирует проникающий в нее спермий. Эта активация является, однако, только стимулом, запускающим запрограммированную цепь метаболических событий. Реакции яйца на воздействие спермия можно подразделять на «ранние», которые осуществляются в течение нескольких секунд после соединения гамет, и «поздние», происходящие спустя несколько минут после этого соединения (табл. 2.2).

Ранние реакции

Как мы видели, контакт между спермием и яйцом запускает два основных механизма блокирования полиспермии: быстрый блок, инициируемый поступлением в клетку натрия, и медленный блок, инициируемый повышением внутриклеточной концентрации ионов кальция. Активация яиц, по-видимому, всегда обусловлена повышением концентрации свободных ионов кальция в цитоплазме. У первичноротых, например у улиток и червей, кальций обычно поступает в яйцо из внешней среды. У вторичноротых, например у рыб, лягушек и морских ежей, активация осуществляется в результате выхода ионов кальция из внутриклеточных депо, причем возникает волна высвобождения ионов кальция, распространяющаяся по поверхности яйца (Jaffe, 1983).

Результаты ряда опытов свидетельствуют о том, что этот выход ионов кальция играет важную роль в активации развития зародыша. Если в яйца инъецировать хелирующее кальций вещество — ЭГТА,— то в них не происходит увеличения концентрации свободных ионов кальция и не наблюдается активации метаболизма. Напротив, яйца можно активировать искусственно, в отсутствие спермиев, посредством воздействий, вызывающих выход свободного кальция в цитоплазму. Было показано (Steinhardt, Epel, 1974), что микромолярные количества кальциевого ионофора A23187 вызывают у большинства яиц реакции, характерные для оплодотворенных яиц: в нормальной последовательности происходят отделение оболочки оплодотворения, повышение внутриклеточного pH, скачкообразное увеличение потребления кислорода, интенсификация синтеза белков и ДНК. Существенно, что такая активация может происходить при полном отсутствии ионов кальция в морской воде. В большинстве случаев развитие таких искусственно активированных яиц останавливается на стадии первого деления дробления, так как они остаются гаплоидными и не содержат центриоли спермия, необходимой для деления.

Выход кальция активирует целый ряд метаболических реакций (рис. 2.32). Одна из них заключается

Таблица 2.2. События, происходящие в процессе оплодотворения яйца морского ежа [1]

Событие	Примерное время после оплодотворения [2]
Прикрепление спермия к яйцу	0 с
Подъем потенциала оплодотворения (быстрое блокирование полиспермии)	менее 3 с
Слияние мембран спермия и яйца	менее 30 с
Выявляемое увеличение концентрации ионов кальция	30 с
Экзоцитоз кортикальных пузырьков (медленное блокирование полиспермии)	30—60 с
Активация НАД-киназы	начинается через 1 мин
Увеличение концентрации НАДФ·Н и НАДФ·Н	начинается через 1 мин
Увеличение потребления O_2	начинается через 1 мин
Проникновение спермия	1—2 мин
Выделение кислоты	1—5 мин
Увеличение pH (остается высоким)	1—5 мин
Деконденсация хроматина спермия	2—12 мин
Миграция ядра спермия к центру яйца	2—12 мин
Миграция яйцевого ядра по направлению к ядру спермия	5—10 мин
Активация белкового синтеза	начинается через 5—10 мин
Активация транспорта аминокислот	начинается через 5—10 мин
Инициация синтеза ДНК	20—40 мин
Митоз	60—80 мин
Первое деление дробления	85—95 мин

[1] Whitaker, Steinhardt, 1985.
[2] Примерные сроки основаны на данных для *S. purpuratus* (15—17 °), *L. pictus* (16—18 °) и *A. punctulata* (18—20 °).

[1] У некоторых видов хвостатых амфибий функция оплодотворения, заключающаяся в побуждении яйца к развитию, полностью обособилась от его генетической функции. Серебристая амбистома (*Ambystoma platineum*) является видом, представленным только одними самками. Самки производят яйца с нередуцированным числом хромосом. Такие яйца, однако, неспособны к развитию без дополнительной стимуляции. Серебристые амбистомы спариваются с самцами амбистомы Джефферсона (*A. jeffersonianum*). Спермии этих самцов только побуждают яйца к развитию (Uzzell, 1964), не участвуя в формировании генома зародыша.

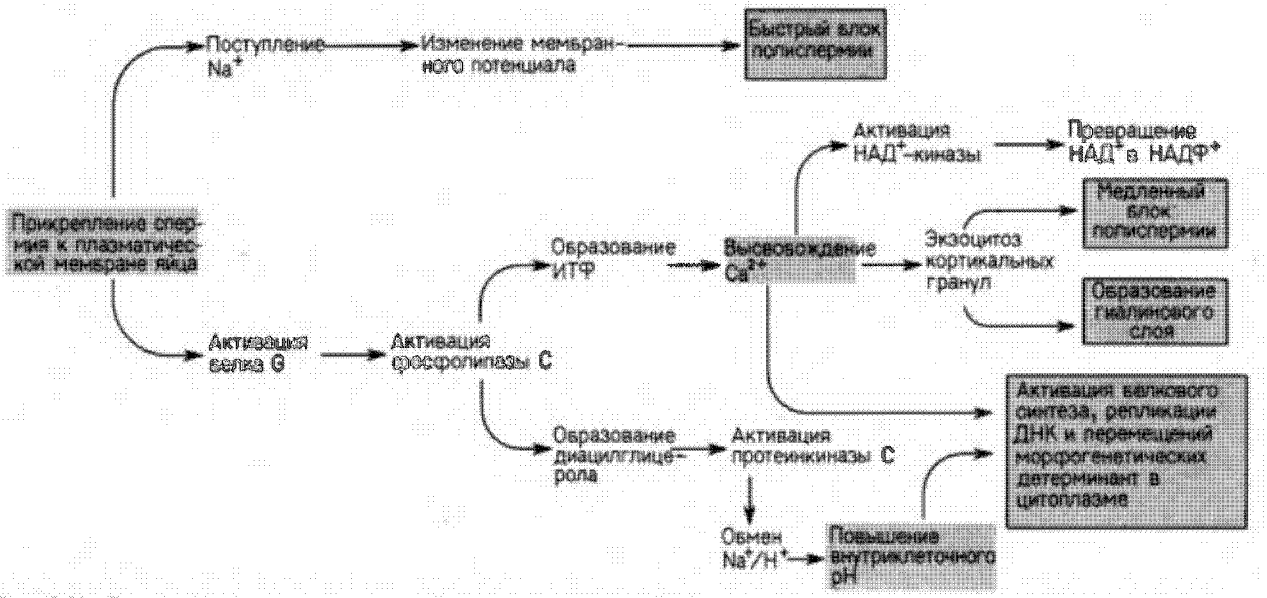


Рис. 2.32. Схема возможных соотношений между разными событиями в процессе оплодотворения у морского ежа. (По Epel, 1980; L. A. Jaffe, личное сообщение.)

в увеличении потребления яйцом кислорода. Удивительно, что этот скачок в использовании кислорода происходит не в митохондриях и, возможно, мало связан (или совсем не связан) с образованием АТФ. Вероятнее всего, кислород используется для окисления различных компонентов яйца, в частности оболочки оплодотворения. Показано (Foerder et al., 1978), что эта оболочка, имеющая полужидкую консистенцию, затвердевает при окислении остатков тирозина, связанных с белками. Одновременно окисляются также разные липиды цитоплазмы (Perry, Epel, 1977).

Другим кальцийзависимым эффектом является активация фермента $НАД^+$-киназы, которая превращает $НАД^+$ в $НАДФ^+$ (Epel et al., 1981). Это превращение может иметь важные последствия для метаболизма клетки: $НАДФ^+$ (но не $НАД^+$) используется в качестве кофермента при биосинтезе липидов. Таким образом, превращение $НАД^+$ в $НАДФ^+$ играет важную роль в создании многих новых компонентов плазматической мембраны, необходимых в процессе дробления.

Поздние реакции

Повышения содержания свободных ионов кальция недостаточно для осуществления всех реакций оплодотворения. Оно сочетается с повышением внутриклеточного pH. Полагают, что сочетание этих двух условий (высокое содержание Ca^{2+} и низкий pH) приводит к осуществлению полного спектра явлений оплодотворения, включая белковый синтез и синтез ДНК (Winkler et al., 1980; Whitaker, Steinhardt, 1982). Повышение внутриклеточного pH начинается в то время, когда наблюдается вторичное поступление ионов натрия в яйцо и обмен между ионами натрия из морской воды и ионами водорода из яйца в отношении 1:1. В яйце морского ежа обмени-

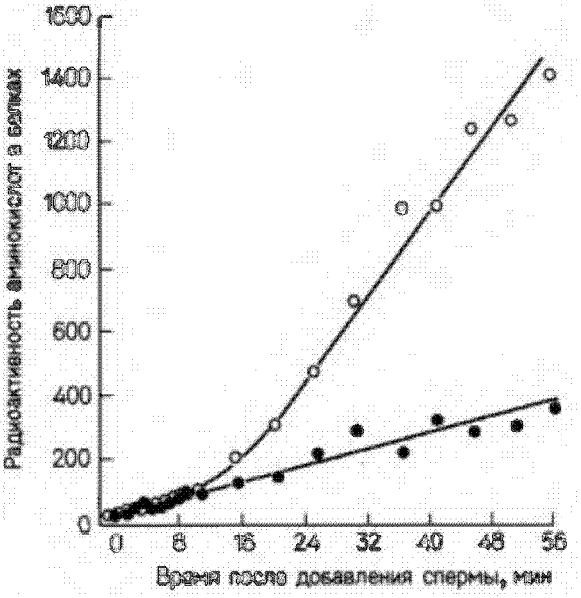


Рис. 2.33. Синтез белка в яйцах морского ежа сразу же после оплодотворения. Включение [^{14}C]-лейцина в белки неоплодотворенных (темные кружки) и оплодотворенных (светлые кружки) яиц. (По Epel, 1967.)

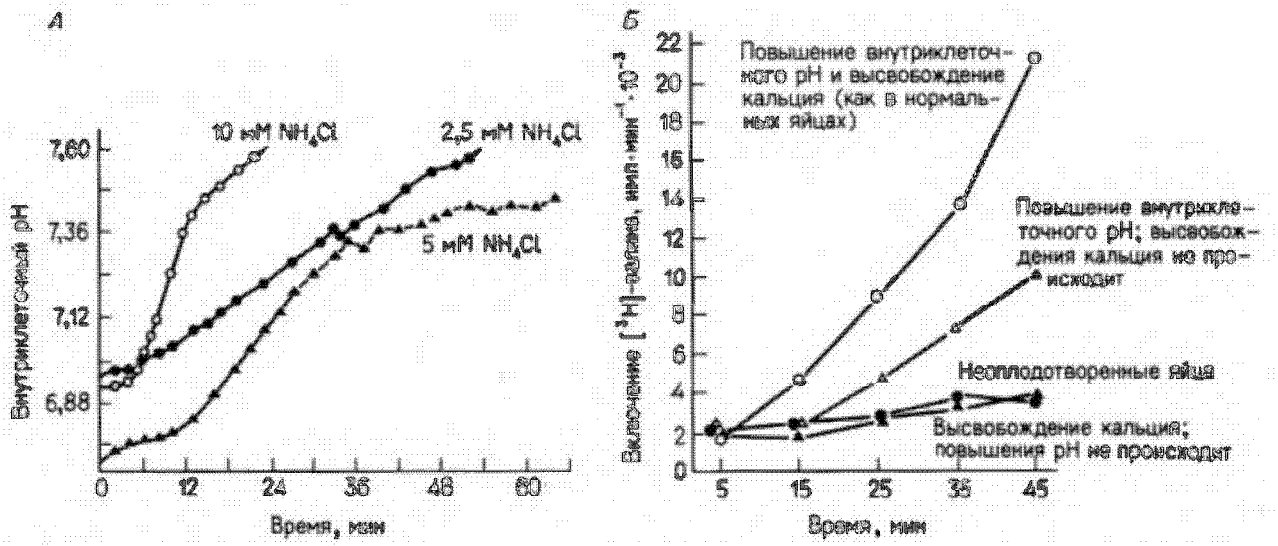


Рис. 2.34. Двойной ионный контроль белкового синтеза при оплодотворении. *А*. Повышение pH цитоплазмы при помощи аммония. Непрерывная регистрация внутриклеточного pH после помещения яиц в воду с разным содержанием NH_4Cl. *Б*. Оценка величины белкового синтеза по включению радиоактивного валина в белки при определенных ионных условиях. Повышение pH тормозилось при оплодотворении яиц в безнатриевой морской воде и при добавлении в воду ионов аммония. Увеличение концентрации свободного кальция подавлялось ЭГТА и возрастало при воздействии A23187. (*А* — по Shen, Steinhardt, 1978; *Б* — по Winkler et al., 1980.)

вается около 75% ионов водорода. Утрата такого количества ионов водорода приводит к повышению pH с 6,8 до 7,2 и к глубоким изменениям физиологии яйца (Shen, Steinhardt, 1978). Принято считать, что эти изменения обусловлены кальцийзависимой реакцией, однако было обнаружено, что многие из поздних реакций оплодотворения могут вызываться повышением внутриклеточного pH любым способом.

Поздние реакции оплодотворения включают активацию синтеза ДНК и белкового синтеза. Резкое повышение белкового синтеза обычно происходит через несколько минут после проникновения спермия и не зависит от синтеза новых мРНК (рис. 2.33). При синтезе новых белков, вероятно, используются мРНК, уже содержащиеся в цитоплазме ооцита. (Более подробно этот вопрос обсуждается в гл. 14.) Подобное скачкообразное увеличение интенсивности белкового синтеза можно вызвать искусственно, помещая неоплодотворенные яйца в раствор, содержащий ионы аммония (Winkler et al., 1980). Эти ионы теряют протоны вне клетки и диффундируют через плазматическую мембрану в виде NH_3; проникнув в клетку, они присоединяют протоны и превращаются в NH_4^+. Отражением происходящей при этом утраты свободных ионов водорода является повышение внутриклеточного pH (рис. 2.34). Таким образом, ионы аммония способны повысить pH цитоплазмы без участия в этом процессе обмена между ионами натрия и водорода. При этом они активируют белковый синтез и синтез ДНК.

Противоположное действие оказывают агенты, блокирующие повышение pH: одновременно они блокируют поздние события оплодотворения. Если яйца сразу после оплодотворения поместить в морскую воду с низким содержанием ионов натрия или если в морскую воду добавить амилорид (вещество, подавляющее транспорт ионов натрия в клетку), то белковый синтез не активируется, женский и мужской пронуклеусы не перемещаются, деления клетки не происходит (Dube et al., 1985).

Дополнительные сведения и гипотезы

Биохимия активации яйца

У морских ежей и позвоночных животных активацию яйца вызывает волна выхода ионов кальция из внутриклеточных депо, таких, как эндоплазматический ретикулум. У морского ежа *Arbacia punctulata* повышение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция впервые обнаруживается через 20—30 с после прикрепления спермия к яйцу, одновременно с инициацией экзоцитоза кортикальных

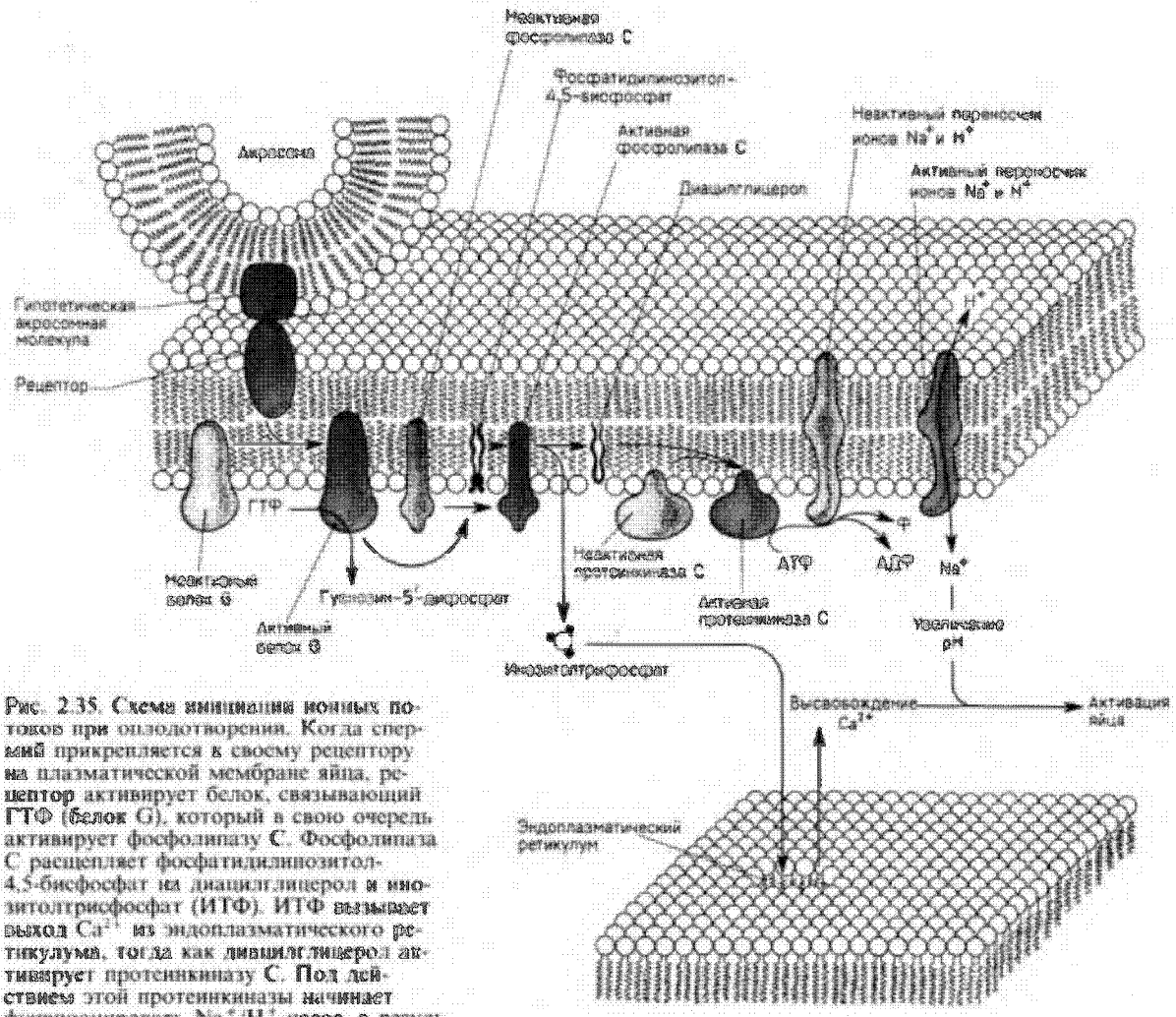


Рис. 2.35. Схема инициации ионных потоков при оплодотворении. Когда сперматозоид прикрепляется к своему рецептору на плазматической мембране яйца, рецептор активирует белок, связывающий ГТФ (белок G), который в свою очередь активирует фосфолипазу С. Фосфолипаза С расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат на диацилглицерол и инозитолтрисфосфат (ИТФ). ИТФ вызывает выход Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума, тогда как диацилглицерол активирует протеинкиназу С. Под действием этой протеинкиназы начинает функционировать Na^+/H^+-насос, в результате чего происходит обмен водородных ионов яйца на внеклеточные ионы натрия; таким образом повышается внутриклеточный pH. (Сходная схема, приводимая в гл. 20, была предложена для начала опухолевого роста.)

гранул (Eisen, Reynolds, 1985). Что же происходит в течение этих 25 с, что приводит к высвобождению связанных ионов кальция?

Исследования последних лет свидетельствуют о том, что прикрепление спермия к плазматической мембране яйца запускает ряд реакций, осуществляющихся с помощью заключенных в мембране ферментов. Эти ферменты синтезируют вещество, способное диффундировать в цитоплазму. Таким веществом, как было показано, является **инозитол-1,4,5-трисфосфат (ИТФ)**, вызывающий высвобождение связанного кальция в клетках разного типа (Berridge, 1985; Swann, Whitaker, 1986). В яйцах морского ежа сразу после оплодотворения синтез ИТФ возрастает (Ciapa, Whitaker, 1986). Образование ИТФ сопровождается выходом ионов кальция. Инъекции ИТФ непосредственно в яйца морского ежа и лягушки вызывают высвобождение ионов кальция и кортикальную реакцию (Whitaker, Irvine, 1984; Busa et al., 1985). Процесс выхода кальция из внутриклеточных депо при этом неотличим от реакции, наблюдаемой при нормальном оплодотворении. Кроме того, эти ИТФ-зависимые эффекты можно предотвратить, инъецируя в неоплодотворенные яйца вещества, образующие хелаты кальция (Turner et al., 1986); это подтверждает представление о том, что ИТФ вызывает выход кальция из внутриклеточных депо.

Ферментом, ответственным за синтез ИТФ, является **фосфолипаза С**. Этот фермент, входящий в состав плазматической мембраны, расщепляет **фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат** на **диацилглицерол** и ИТФ (рис. 2.35). Если ИТФ вызывает выход кальция из внутриклеточных депо, то диацилглицерол,

по-видимому, активирует другой содержащийся в мембране фермент, протеинкиназу С, которая в свою очередь активирует Na^+,H^+-переносчик, осуществляющий обмен ионов натрия на ионы водорода (Swann, Whitaker, 1985; Shen, Burgart, 1986). Таким образом, расщепление фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата может вызвать как волну высвобождения кальция, так и повышение внутриклеточного pH — два процесса, необходимые для активации яйца и его деления.

Но почему прикрепление спермия к яйцу приводит к образованию ИТФ и диацилглицерола? Имеются данные, что в некоторых клетках-мишенях гормонов соединение рецептора гормона с фосфолипазой С опосредовано белком, связывающим ГТФ (G-белок, см. Berridge, 1985).

Тернер и др. (Turner et al., 1986) показали, что то же самое происходит, по-видимому, в случае яиц морского ежа. Когда в яйцо инъецировали аналог ГТФ, стабилизирующий G-белок в активной конфигурации, кортикальные гранулы выделяли свое содержимое в отсутствие спермия. Если же в яйцо инъецировали конкурирующий ингибитор ГТФ, то вызываемый спермием нормальный процесс экзоцитоза кортикальных гранул подавлялся. Это подавляющее действие можно было предотвратить, инъецируя в неоплодотворенное яйцо ИТФ. Схема начальных биохимических событий при активации яйца представлена на рис. 2.32 и 2.35. Прикрепление спермия к неидентифицированному рецептору на плазматической мембране яйца изменяет конформацию этого рецептора таким образом, что он активирует G-белок. G-белок в свою очередь активирует фосфолипазу С, которая расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат на два внутриклеточных посредника, диацилглицерол и инозитолтрисфосфат. Диацилглицерол активирует протеинкиназу С; последняя фосфорилирует белок-переносчик Na^+ и H^+, тем самым делая его способным функционировать (при стимуляции ионами кальция), что приводит к повышению внутриклеточного pH. Поскольку ИТФ вызывает выход кальция из эндоплазматического ретикулума, диффузия ИТФ приводит к распространению волны выхода кальция по всему кортикальному слою яйца. Таким образом, прикрепление спермия к плазматической мембране вызывает определенные изменения внутри яйца.

Преобразования цитоплазмы яйца

Оплодотворение может также вызывать радикальные перемещения компонентов цитоплазмы. Эти перемещения часто играют решающую роль при последующем развитии в процессах клеточной дифференцировки. Как мы увидим в гл. 7 и 8, цитоплазма яйца нередко содержит **морфогенетические детерминанты**, которые сегрегируются в процессе дробления и попадают в определенные клетки. Эти детерминанты в конечном счете приводят к активации или репрессии специфических генов; в результате клетки, содержащие такие детерминанты, приобретают определенные свойства. Правильное пространственное распределение морфогенетических детерминантов является решающим условием нормального развития.

У некоторых видов благодаря присутствию пигментных гранул можно проследить перемещение таких детерминантов в соответствующую область. Одним из примеров может служить яйцо асцидии *Styela partita* (Conklin, 1905). Неоплодотворенное яйцо этого животного представлено на рис. 2.36,*А*. Серая цитоплазма центральной части яйца окружена кортикальным слоем, содержащим желтые липидные включения. Во время мейоза разрушение ядерной оболочки освобождает светлый ядерный материал, который накапливается в анимальном (верхнем) полушарии яйца. В течение 5 мин после проникновения спермия внутренняя светлая и кортикальная желтая цитоплазма перетекает в вегетативное (нижнее) полушарие яйца. Когда затем мужской пронуклеус мигрирует от вегетативного полюса к экватору по будущей задней стороне зародыша, липидные включения перемещаются вместе с ним. В результате этой миграции возникает **желтый серп**, занимающий пространство от вегетативного полюса до экватора (рис. 2.36,*Б*—*Г*), и желтая цитоплазма оказывается в области, где позднее у личинки образуются мышечные клетки.

Перемещения цитоплазмы наблюдаются и в ооцитах амфибий. У многих видов бесхвостых амфибий единственный спермий может проникнуть в любом месте анимального полушария; после этого события распределение цитоплазматических компонентов яйца изменяется. Наиболее заметны изменения в пигментированном поверхностном слое цитоплазмы. Первоначально слой темного меланинового пигмента покрывает все анимальное полушарие. После проникновения спермия поверхностный слой цитоплазмы смещается примерно на 30° по отношению к внутренней цитоплазме (Manes, Elinson, 1980; Vincent et al., 1986), в результате чего у некоторых бесхвостых амфибий (например, у лягушек рода *Rana*) вблизи экватора против места проникновения спермия появляется серповидная слабо пигментированная область (рис. 2.37) (Roux, 1887, Ancel, Vintenberger, 1948). Эту слабо пигментированную область назвали **серым серпом**. Как мы увидим в последующих главах, серый серп соответствует области, в ко-

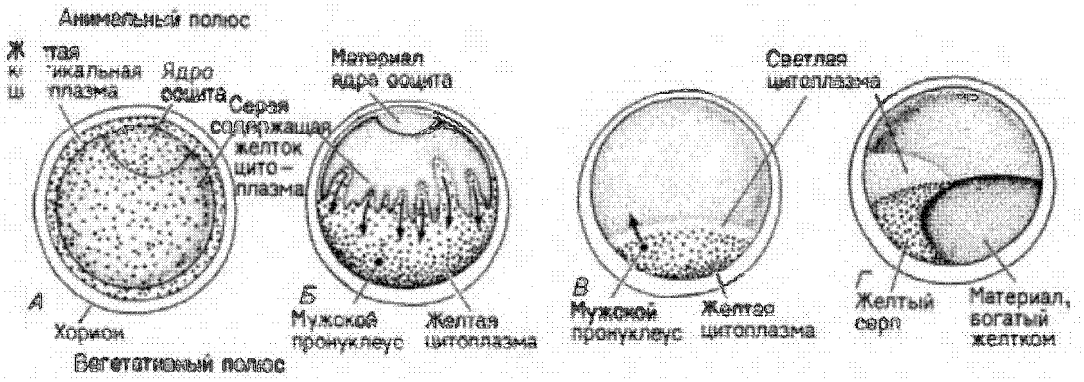


Рис. 2.36. Перемещение цитоплазматических масс в яйце асцидии *Styela partita*. *А*. До оплодотворения желтая кортикальная цитоплазма окружает серую цитоплазму, содержащую желток. *Б*. В момент проникновения спермия желтая кортикальная цитоплазма и светлая цитоплазма из области, где произошло разрушение ядра ооцита, перетекают в вегетативное полушарие по направлению к спермию. *В*. Когда мужской пронуклеус мигрирует в анимальном направлении к женскому пронуклеусу, желтая цитоплазма и светлая цитоплазма перемещаются вместе с ним. *Г*. Окончательное положение светлой цитоплазмы и желтой цитоплазмы. Оно соответствует областям, в которых будут расположены клетки, дающие начало соответственно мезенхиме и мышцам. (По Duechar, 1975.)

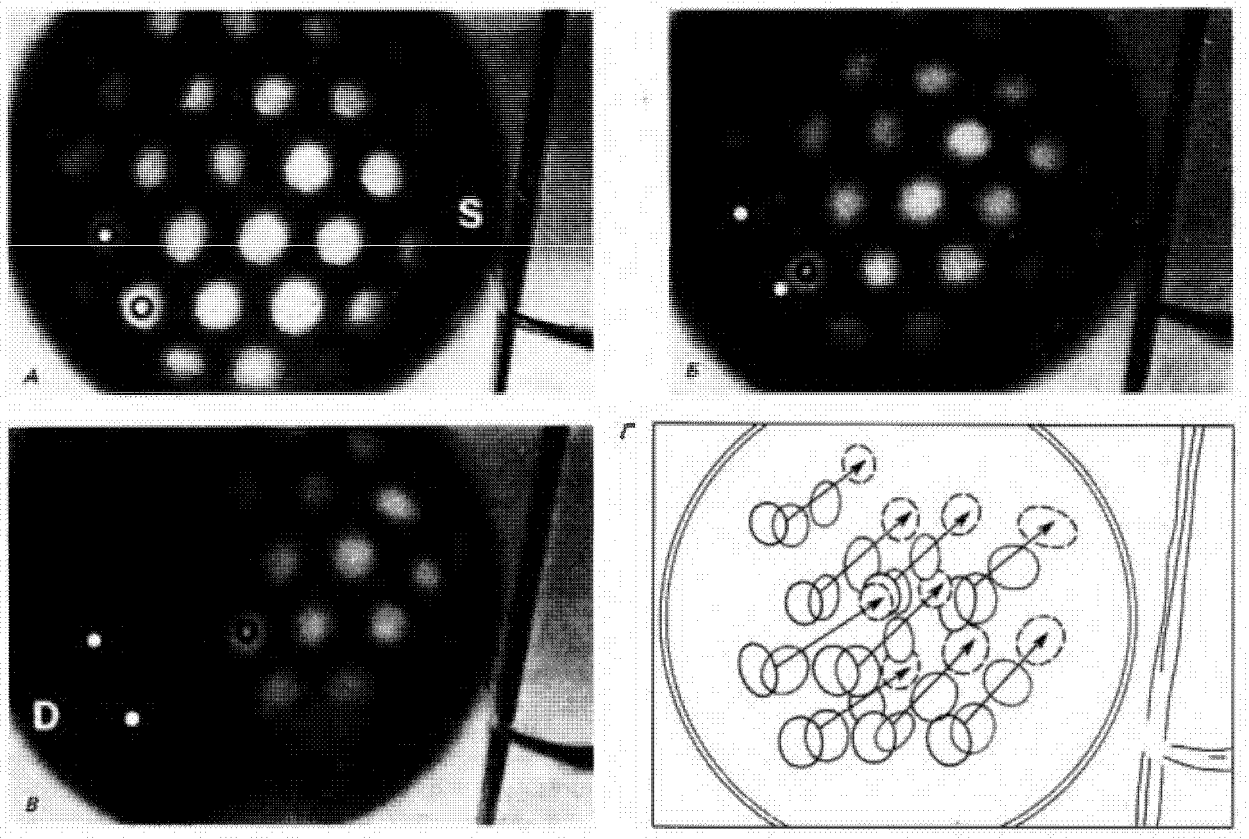


Рис. 2.37. Фотографии, на которых прослеживается поворот субкортикальной цитоплазмы относительно кортикального слоя в яйце *Xenopus*. В яйцах сразу после оплодотворения маркировали субкортикальный слой, отпечатывая гексагональную решетку. Для этого использовали краситель нильский голубой, который окрашивает липиды желточных пластинок. Кортикальный слой иммобилизировали, заключая яйца в желатину. Первоначальное положение светлых пятен отмечали на поверхности яйца (кружки на рис. *А*). В течение первого клеточного цикла светлые пятна смещались относительно наружного иммобилизованного слоя приблизительно на 30° (рис. *Б*, *В*). Отмечены место проникновения спермия (S) и положение будущей спинной поверхности зародыша (D). На рис. *Г* суммированы данные о перемещении цитоплазмы в вегетативной (нижней) области яйца. (Из Vincent et al., 1986; фотографии с любезного разрешения J. C. Gerhart.)

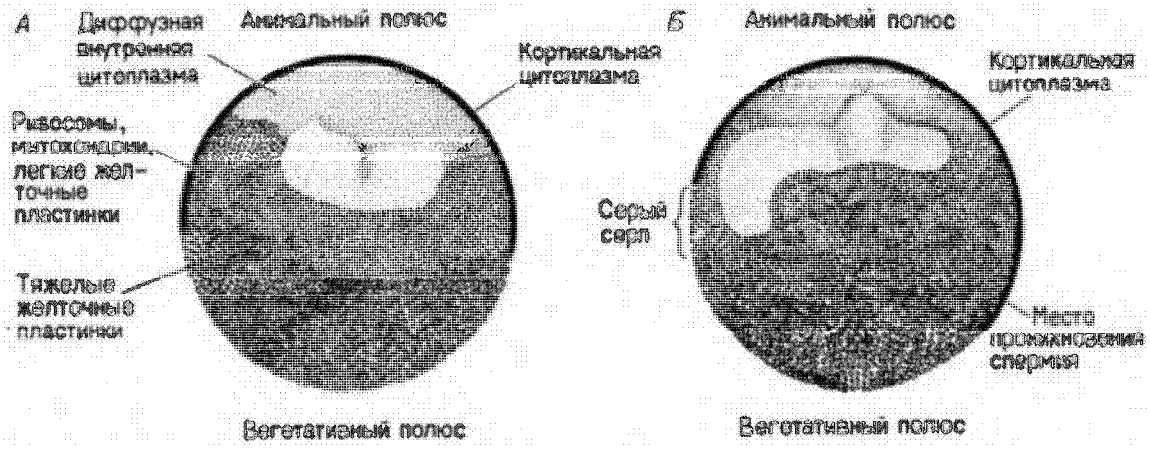


Рис. 2.38. Перемещение областей цитоплазмы, сопровождающее оплодотворение у лягушки *Discoglossus pictus*. Срезы яиц были приготовлены через разные сроки после оплодотворения. *А*. Схематическое изображение среза яйца через 15 мин после оплодотворения. *Б*. Яйцо через 135 мин после оплодотворения. (Первое деление дробления у этого вида начинается через 150 мин.) Наблюдается смещение кортикальной цитоплазмы относительно внутренней цитоплазмы; положение компонентов последней также изменилось. (По Klag, Ubbels, 1975.)

торой у зародышей амфибий инициируется гаструляция.

У других бесхвостых амфибий, например у *Xenopus*, у которых серый серп неразличим, поворот кортикального слоя относительно внутренней, субкортикальной цитоплазмы тоже происходит. Это было продемонстрировано следующим образом (Vincet et al., 1986): гексагональную решетку красителя (нильского голубого) отпечатывали на субкортикальной цитоплазме, тогда как на поверхности наносили пятна другим красителем (лектином, связанным с флуоресцеином). Яйцо иммобилизировали, заключая его в желатину. Светлые пятна в решетке нильского голубого смещались на 30° относительно флуоресцирующих пятен лектина (рис. 2.37). В случае интактных, неиммобилизованных яиц смещается, вероятно, поверхностный слой, тогда как субкортикальная цитоплазма, которая загружена желточными пластинками, не меняет своего положения, удерживаемая силой тяжести.

Эти цитоплазматические перемещения играют решающую роль для дальнейшего развития зародыша. Как мы увидим в гл. 4 и 8, перемещивание цитоплазматических масс, которое происходит при таких перемещениях, инициирует цепь реакций, определяющих положение дорсовентральной (спинно-брюшной) оси зародыша лягушки. Первоначальная организация цитоплазмы яйца претерпевает глубокие изменения, особенно в будущей спинной области зародыша (которая у отдельных видов отличима по присутствию серого серпа), причем часть вегетативного материала яйца увлекается к анимальному полюсу (Klag, Ubbels, 1975; Gerhart et al., 1983; рис. 2.38).

Имеется определенная зависимость между расположением компонентов цитоплазмы и тем, как протекает дробление — процесс, отделяющий оплодотворение от эмбриогенеза. У асцидий первое деление дробления разделяет яйцо на две зеркальные половины. Начиная с этой стадии, каждому делению по одну сторону от первой борозды соответствует деление по другую ее сторону, являющееся его «зеркальным отражением». Положение первой борозды не случайно и обнаруживает некоторую зависимость от места проникновения спермия и последующего поворота цитоплазмы. Согласованность между плоскостью деления и перемещениями цитоплазмы, вероятно, опосредована микротрубочками спермальной звезды. Когда яйца амфибий инкубируют в присутствии веществ, препятствующих сборке микротрубочек, например колхицина, звезды не образуются и перемещения цитоплазматических масс не происходит. Таким образом, центриоли спермия не только участвуют в создании митотического аппарата, но и способствуют реорганизации цитоплазмы зиготы (Manes et al., 1978; Gerhart et al., 1981; Elinson, 1985). Перераспределение цитоплазматических масс произошло, пронуклеусы встретились, ДНК реплицируется, новые белки транслируются. Достигнута стадия, с которой может начинаться развитие многоклеточного организма.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

Afzelius B. A. (1976). A human syndrome caused by immotile cilia. Science **193**, 317—319.

Amos L. A., Klug A. (1974). Arrangement of subunits in flagellar microtubules. J. Cell Sci. **14**, 523—549.

Ancel P., Vintenberger P. (1948). Recherches sur le determinisme de la symmetrie bilatérale dans l'oeuf des amphibiens. Bull. Biol. Fr. Belg. [Suppl.] **31**, 1—182.

Austin C. R. (1965). Fertilization. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Barister B. D. (1980). Recent progress in the study of early events in mammalian fertilization. Devel. Growth Differ. **22**, 385—402.

Bedford J. M. (1968). Ultrastructural changes in the sperm head during fertilization in the rabbit. Am. J. Anat. **123**, 329—357.

Bentley J. K., Shimomura H., Garbers D. L. (1986). Retention of a functional resact receptor in isolated sperm plasma membranes. Cell **45**, 281—288.

Berridge M. J. (1985). The molecular basis of communication with the cell. Sci. Am. **253**, 142—152.

Berridge M. J., Irvine R. F. (1984). Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature **312**, 315—321.

Bestor T. M., Schatten G. (1981). Anti-tubulin immunofluorescence microscopy of microtubules present during the pronuclear movements of sea urchin fertilization. Dev. Biol. **88**, 80—91.

Bleil J. D., Wassarman P. M. (1980). Mammalian sperm and egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse-egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. Cell **20**, 873—882.

Bleil J. D., Wassarman P. M. (1986). Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. J. Cell Biol. **102**, 1363—1371.

Boveri T. (1902). On multipolar mitosis as a means of analysis of the cell nucleus. (Translated by S. Gluecksohn-Waelsch.) In: B. H. Willier and J. M. Oppenheimer (eds.), Foundations of Experimental Embryology. Hafner, New York, 1974.

Boveri T. (1907). Zellenstudien VI. Die Entwicklung dispermer Seeigeleier. Ein Beiträge zur Befruchtungslehre und zur Theorie des Kernes. Jena Zeit. Naturwiss. **43**, 1—292.

Braden A. W. H., Austin C. R. (1954). The number of sperm about the eggs in mammals and its significance for normal fertilization. Aust. J. Biol. Sci. **7**, 543—551.

Busa W. B., Ferguson J. E., Joseph S. K., Williamson J. R., Nuccitelli R. (1985). Activation of frog (*Xenopus laevis*) eggs by inositol triphosphate. I. Characterization of Ca^{2+} release from intracellular stores. J. Cell Biol. **100**, 677—682.

Calvin H. I., Bedford J. M. (1971). Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. J. Reprod. Fertil. [Suppl.] **13**, 65—75.

Carroll E. J., Epel D. (1975). Isolation and biological activity of the proteases released by sea urchin eggs following fertilization. Dev. Biol. **44**, 22—32.

Chambers E. L., Pressman B. C., Rose B. (1974). The activity of sea urchin eggs by the divalent ionophores A23187 and X-537A. Biochem. Biophys. Res. Commun. **60**, 126—132.

Chandler D. E., Heuser J. (1979). Membrane fusion during secretion: Cortical granule exocytosis in sea urchin eggs as studied by quick-freezing and freeze fracture. J. Cell Biol. **83**, 91—108.

Cherr G. N., Lambert H., Meizel S., Katz D. F. (1986). In vitro studies of the golden hamster sperm acrosomal reaction: Completion on zona pellucida and induction by homologous zonae pellucidae. Dev. Biol. **114**, 119—131.

Ciapa B., Whitaker M. (1986). Two phases of inositol polyphosphate and diacylglycerol production at fertilization. FEBS Lett. **195**, 347—351.

Clermont Y., Leblond C. P. (1955). Spermiogenesis of man, monkey, and other animals as shown by the "periodic acid-Schiff" technique. Am. J. Anat. **96**, 229—253.

Colwin A. L., Colwin L. H. (1963). Role of the gamete membranes in fertilization in *Saccoglossus kowalevskii* (Enteropneustra). I. The acrosome reaction and its changes in early stages of fertilization. J. Cell Biol. 19, 477—500.

Colwin L. H., Colwin A. L. (1960). Formation of sperm entry holes in the vitelline membrane of *Hydroides hexagonis* (Annelida) and evidence of their lytic origin. J. Biophys. Biochem. Cytol. **7**, 315—320.

Conklin E. G. (1905). The orientation and cell-lineage of the ascidian egg. J. Acad. Nat. Sci. Phila. **13**, 5—119.

Cross N. L., Elinson R. P. C. (1980). A fast block to polyspermy in frogs mediated by changes in the membrane potential. Dev. Biol. **75**, 187—198.

Dan J. C. (1967). Acrosome reaction and lysins. In: C. B. Metz and A. Monroy (eds.), Fertilization, Vol. 1. Academic Press, New York, pp. 237—367.

Davis B. K. (1981). Timing of fertilization in mammals: Sperm cholesterol/phospholipid ratio as determinant of capacitation interval. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 7560—7564.

Davis B. K., Byrne R., Bedigan K. (1980). Studies on the mechanism of capacitation: Albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 1546—1550.

Dawid T. B., Blackler A. W. (1972). Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondria in *Xenopus*. Dev. Biol. **29**, 152—161.

De Robertis E. D. P., Saez F. A., De Robertis E. M. F. (1975). Cell Biology, 6th Ed., Saunders, Philadelphia.

Dube F., Schmidt T., Johnson C. H., Epel D. (1985). The hierarchy of requirements for an elevated pH during early development of sea urchin embryos. Cell **40**, 657—666.

Deuchar E. (1975). Cellular Interactions in Animal Development. Halstead, New York.

Eisen A., Reynolds G. T. (1985). Sources and sinks for the calcium release during fertilization of single sea urchin eggs. J. Cell Biol. **100**, 1522—1527.

Elinson R. P. (1985). Changes in levels of polymeric tubulin associated with activation and dorsoventral polarization of the frog egg. Dev. Biol. **109**, 224—233.

Elinson R. P. (1986). Fertilization in amphibians: The ancestry of the block to polyspermy. Int. Rev. Cytol. **101**, 59—100.

Epel D. (1967). Protein synthesis in sea urchin eggs: A "late" response to fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **57**, 899—906.

Epel D. (1977). The program of fertilization. Sci. Am. **237(5)**, 128—138.

Epel D. (1980). Fertilization. Endeavour N. S. **4**, 26—31.

Epel D., Patton C., Wallace R. W., Cheung W. Y. (1981). Calmodulin activates NAD kinase of sea urchin eggs: An early response. Cell **23**, 543—549.

Florman H. M., Bechtol K. B., Wassarman P. M. (1984). Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. Dev. Biol. **106**, 243—255.

Florman H. M., Storey B. T. (1982). Mouse gamete interactions: The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. Dev. Biol. **91**, 121—130.

Florman H. M., Wassarman P. M. (1985). O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. Cell **41**, 313—324.

Foerder C. A., Shapiro B. M. (1977). Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 4214—4218.

Foerder C. A., Kubanoff S. J., Shapiro B. M. (1978). Hydrogen peroxide production, chemoluminescence, and the respiratory burst at fertilization: Interrelated events in early sea urchin development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 3183—3187.

Franklin L. E. (1970). Fertilization and the role of the acrosomal reaction in non-mammals. Biol. Reprod. [Suppl.] **2**, 159—176.

Fulton B. P., Whittingham D. G. (1978). Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. Nature **273**, 149—151.

Gardiner D. M., Grey R. D. (1983). Membrane junctions in *Xenopus* eggs: Their distribution suggests a role in calcium regulation. J. Cell Biol. **96**, 1159—1163.

Gerhart J., Black S., Gimlich R., Scharf S. (1983). Control of polarity in the amphibian egg. In: W. R. Jeffery and R. A. Raff (eds.), Time, Space, and Pattern in Embryonic Development. Alan R. Liss, New York, pp. 261—286.

Gerhart J., Ubbels G., Black S., Hara K., Kirschner M. (1981). A reinvestigation of the role of the grey crescent in axis formation in *Xenopus laevis*. Nature **292**, 511—516.

Giles R. E., Blanc H., Cann H. M., Wallace D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 6715—6719.

Gilkey J. C., Jaffe L. F., Ridgway E. G., Reynolds G. T. (1978). A free calcium wave traverses the activating egg of the medaka, *Oryzias latipes*. J. Cell Biol. **76**, 448—466.

Glabe C. G. (1985). Interaction of the sperm adhesive protein, bindin, with phospholipid vesicles. II. Bindin induces the fusion of mixed-phase vesicles that contain phosphatidylcholine and phosphatidylserine in vitro. J. Cell Biol. **100**, 800—806.

Glabe C. G., Lennarz W. J. (1979). Species-specific sperm adhesion in sea urchins: A quantitative investigation of bindin-mediated egg agglutination. J. Cell Biol. **83**, 595—604.

Glabe C. G., Vacquier V. D. (1977). Species-specific agglutination of eggs by bindin isolated from sea urchin sperm. Nature **267**, 836—838.

Glabe C. G., Vacquier V. D. (1978). Egg surface glycoprotein receptor for sea urchin sperm bindin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 881—885.

Gould M., Stephano J. L. (1987). Electrical response of eggs to acrosomal protein similar to those induced by sperm. Science **235**, 1654—1656.

Gould-Somero M., Jaffe L. A., Holland L. Z. (1979). Electrically mediated fast polyspermy block in eggs of the marine worm, *Urechis caupo*. J. Cell Biol. **82**, 426—440.

Green G. R., Poccia E. L. (1985). Phosphorylation of sea urchin sperm H1 and H2B histones precedes chromatin decondensation and H1 exchange during pronuclear formation. Dev. Biol. **108**, 235—245.

Gwatkin R. B. L. (1976). Fertilization. In: G. Poste and G. L. Nicolson (eds.), The Cell Surface in Animal Embryogenesis and Development. Elsevier North-Holland, New York, pp. 1—53.

Hamaguchi M. S., Hiramoto Y. (1980). Fertilization process in the heart-urchin, *Clypaester japonicus*, observed with a differential interference microscope. Dev. Growth Differ. **22**, 517—530.

Hansbrough J. R., Garbers D. L. (1981). Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. J. Biol. Chem. **256**, 1447—1452.

Hartsoeker N. (1694). Essai de dioptrique. Paris.

Hertwig O. (1876). Beiträge zur Kenntniss der Bildung, Befruchtung, und Theilung des theirischen Eies. Morphol. Jahr. **1**, 347—452.

Hinkley R. E., Wright B. D., Lynn J. W. (1986). Rapid visual detection of sperm—egg fusion using the DNA-specific fluorochrome Hoechst 33342. Dev. Biol. **118**, 148—154.

Hirao Y., Yanagimachi R. (1978). Effects of various enzymes on the ability of hamster egg plasma membrane to fuse with spermatozoa. Gamete Res. **1**, 3—12.

Hollinger T. G., Schuetz A. W. (1976). "Cleavage" and cortical granule breakdown in *Rana pipiens* oocytes induced by direct microinjection of calcium. J. Cell Biol. **71**, 395—401.

Hong K., Vacquier V. D. (1986). Fusion of liposomes induced by a cationic protein from the acrosomal granule of abalone spermatozoa. Biochemistry **25**, 543—549.

Hylander B. L., Summers R. G. (1982). An ultrastructural and immunocytochemical localization of hyaline in the sea urchin egg. Dev. Biol. **93**, 368—380.

Jacobs P. A., Wilson C. M., Sprenkle J. A., Rosenshein N. B., Migeon B. R. (1980). Mechanism of origin of complete hydatidiform moles. Nature **286**, 714—716.

Jaffe L. A. (1976). Fast block to polyspermy in sea urchins is electrically mediated. Nature **261**, 68—71.

Jaffe L. A. (1980). Electrical polyspermy block in sea urchins: Nicotine and low sodium experiments. Dev. Growth Differ. **22**, 503—507.

Jaffe L. A., Cross N. L. (1983). Electrical properties of vertebrate oocyte membranes. Biol. Reprod. **30**, 50—54.

Jaffe L. A., Sharp A. P., Wolf D. P. (1983). Absence of an electrical polyspermy block in the mouse. Dev. Biol. **96**, 317—323.

Jaffe L. F. (1983). Sources of calcium in egg activation: A review and hypothesis. Dev. Biol. **99**, 265—276.

Just E. E. (1919). The fertilization reaction in *Echinarachnius parma*. Biol. Bull. **36**, 1—10.

Klag J. J., Ubbels G. A. (1975). Regional morphological and cytochemical differentiation of the fertilized egg of *Discoglossus pictus* (Anura). Differentiation **3**, 15—20.

Kolliker A. von (1841). Beiträge zur Kenntnis der Geschlectverhältnisse und der Samenflüssigkeit wirbelloser Thiere, nebst einem Versuch über Wesen und die Bedeutung der sogenannten Samenthiere (Berlin).

Krist U., Afzelius B. A., Nilsson L. (1980). The intrinsic mechanism of chromatin decondensation and its activation in human spermatozoa. Dev. Growth Differ. **22**, 543—554.

Leeuwenhoek A. van (1685). Letter to the Royal Society of London. Quoted in Ruestow E. G. (1983). Images and ideas: Leeuwenhoek's perception of the spermatozoa. J. Hist. Biol. **16**, 185—224.

Levine A. E., Walsh K. A., Fodor E. J. B. (1978). Evidence of an acrosin-like enzyme in sea urchin sperm. Dev. Biol. **63**, 299—306.

Longo F. J. (1986). Surface changes at fertilization: Integration of sea urchin (*Arbacia punctulata*) sperm and oocyte plasma membranes. Dev. Biol. **116**, 143—159.

Longo F. J., Lynn J. W., McCulloh D. H., Chambers E. L., So F. (1986). Correlative ultrastructural and electrophysiological studies of sperm—egg interactions of the sea urchin, *Lytechinus variegatus*. Dev. Biol. **118**, 155—166.

Lopez L. C., Bayna E. M., Litoff D., Shaper N. L., Shaper J. H., Shur B. D. (1985). Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. J. Cell Biol. **101**, 1501—1510.

Luttmer S., Longo F. J. (1985). Ultrastructural and morphometric observations of cortical endoplasmic reticulum in *Arbacia*, *Spisula*, and mouse eggs. Dev. Growth Differ. **27**, 349—359.

Manes M. E., Barbieri F. D. (1976). Symmetrization in the amphibian egg by disrupted sperm cells. Dev. Biol. **53**, 138—141.

Manes M. E., Barbieri F. D. (1977). On the possibility of sperm aster involvement in dorso-ventral polarization and pronuclear migration in the amphibian egg. J. Embryol. Exp. Morphol. **40**, 187—197.

Manes M. E., Elinson R. P. (1980). Ultraviolet light inhibits gray crescent formation in the frog egg. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. **189**, 73—76.

Manes M. E., Elinson R. P., Barbieri F. D. (1978). Formation of the amphibian gray crescent: Effects of colchicine and cytochalasin-B. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. **185**, 99—104.

McGrath J., Solter D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genome. Cell **37**, 179—183.

Meizel S. (1984). The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. Biol. Rev. **59**, 125—157.

Metz C. B. (1978). Sperm and egg receptors involved in fertilization. Curr. Top. Dev. Biol. **12**, 107—148.

Miller R. L. (1978). Site-specific agglutination and the timed release of a sperm chemoattractant by the egg of the leptomedusan, *Orthopyxis caliculata*. J. Exp. Zool. **205**, 385—392.

Miller R. L. (1985). Sperm chemo-orientation in the metazoa. In: C. B. Metz, Jr. and A. Monroy (eds.), Biology of Fertilization, Vol. 2. Academic Press, New York, pp. 275—337.

Miyazaki S., Igusa Y. (1981). Fertilization potential in golden hamster eggs consists of recurring hyperpolarizations. Nature **290**, 702—704.

Moy G. W., Vacquier V. D. (1979). Immunoperoxidase localization of bindin during the adhesion of sperm to sea urchin eggs. Curr. Top. Dev. Biol. **13**, 31—44.

Ogawa K., Mohri T., Mohri H. (1977). Identification of dynein as the outer arms of sea urchin sperm axonemes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5006—5010.

Ohama K., Kajii T., Okamoto E., Fukada Y., Imaizumi K., Tsukahara M., Kobayashi K., Hagiwara K. (1981). Dispermic origin of XV hydatidiform moles. Nature **292**, 551—552.

Perry G., Epel D. (1977). Calcium stimulation of a lipoxygenase activity accounts for the respiratory burst fertilization of the sea urchin egg. J. Cell Biol. **75**, 40a.

Prevost J. L., Dumas J. B. (1824). Deuxieme mémoire sur la génération. Ann. Sci. Nat. **2**, 129—149.

Primakoff P., Hyatt H., Tredick-Kline J. (1987). Identification and purification of a sperm cell surface protein with a potential role in sperm—egg membrane fusion. J. Cell Biol. **104**, 141—149.

Rossignol D. P., Earles B. J., Decker G. L., Lennarz W. J. (1984). Characterization of the sperm receptor on the surface of eggs of *Strongylocentrotus purpuratus*. Dev. Biol. **104**, 308—321.

Roux W. (1887). Beitrage zur Entwicklungsmechanik des Embryo. Arch. Mikrosk. Anat. **29**, 157—212.

Saling P. M., Sowinski J., Storey B. T. (1979). An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucida in vitro: Sequential relationship to acrosome reaction. J. Exp. Zool. **209**, 229—238.

Saunders J. W., Jr. (1970). Principles and Patterns of Animal Development. Macmillan, New York.

Schackmann R. W., Eddy E. M., Shapiro B. M. (1978). The acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus* sperm: Ion requirements and movements. Dev. Biol. **65**, 483—495.

Schackmann R. W., Shapiro B. M. (1981). A partial sequence of ionic changes associated with the acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus*. Dev. Biol. **81**, 145—154.

Schatten G., Mazia D. (1976). The penetration of the spermatozoan through the sea urchin egg surface at fertilization: Observations from the outside on whole eggs and from the inside on isolated surface. Exp. Cell Res. **98**, 325—337.

Schatten G., Schatten H. (1983). The energetic egg. The Sciences **23(5)**, 28—35.

Schatten H., Schatten G. (1980). Surface activity at the plasma membrane during sperm incorporation and its cytochalasin-B sensitivity: Scanning electron micrography and time-lapse video microscopy during fertilization of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. Dev. Biol. **78**, 435—449.

Schroeder T. E. (1979). Surface area change at fertilization: Resorption of the mosaic membrane. Dev. Biol. **70**, 306—326.

SeGall G. K., Lennarz W. J. (1979). Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction. Dev. Biol. **71**, 33—48.

Shen S. S., Burgart L. J. (1986). 1,2-Diacylglycerols mimic phorbol 12-myristate 13-acetate activation of the sea urchin egg. J. Cell Physiol. **127**, 330—340.

Shen S. S., Steinhardt R. A. (1978). Direct measurement of intracellular pH during metabolic depression of the sea urchin egg. Nature **272**, 253—254.

Shur B. D., Hall N. G. (1982a). Sperm surface galactosyltransferase activities during in vitro capacitation. J. Cell Biol. **95**, 567—573.

Shur B. D., Hall N. G. (1982b). A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding for the egg zona pellucida. J. Cell Biol. **95**, 574—579.

Stambaugh R., Buckley U. (1960). Identification and subcellular localization of the enzymes effecting penetration of the zona pellucida by rabbit spermatozoa. J. Reprod. Fertil. **19**, 423—432.

Stambaugh R., Mastroianni L. (1980). Stimulation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) proacrosin activation by oviduct fluid. J. Reprod. Fertil. **59**, 479—484.

Steinhardt R. A., Epel D. (1974). Activation of sea urchin eggs by a calcium ionophore. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**, 1915—1919.

Steinhardt R., Zucker R., Schatten G. (1977). Intracellular calcium release at fertilization in the sea urchin egg. Dev. Biol. **58**, 185—196.

Summers R. G., Hylander B. L. (1975). Species-specificity of acrosome reaction and primary gamete binding in echinoids. Exp. Cell Res. **96**, 63—68.

Summers R. G., Hylander B. L., Colwin L. H., Colwin A. L. (1975). The functional anatomy of the echinoderm spermatozoon and its interaction with the egg at fertilization. Am. Zool. **15**, 523—551.

Surani M. A. H., Barton S. C. (1983). Development of gynogenetic eggs in the mouse: Implications for parthenogenetic embryos. Science **222**, 1034—1036.

Surani M. A. H., Barton S. C., Norris M. L. (1986). Nuclear transplantation in the mouse: Hereditable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. Cell **45**, 127—136.

Swann K., Whitaker M. (1985). Stimulation of the Na/H exchanger of sea urchin eggs by phorbol ester. Nature **314**, 274—277.

Swann K., Whitaker M. (1986). The part played by inositol trisphosphate and calcium in the propagation of the fertilization wave in sea urchin eggs. J. Cell Biol. **103**, 2333—2342.

Talbot P. (1985). Sperm penetration through oocyte investments in mammals. Am. J. Anat. **174**, 331—346.

Talbot P., DiCarlantonio G., Zao P., Penkala J., Haimo L. T. (1985). Motile cells lacking hyaluronidase can penetrate the hamster oocyte cumulus complex. Dev. Biol. **108**, 387—398.

Tilney L. G., Bryan J., Bush D. J., Fujiwara K., Mooseker M. S., Murphy D. B., Snyder D. H. (1973). Microtubules: Evidence for thirteen protofilaments. J. Cell Biol. **59**, 267—275.

Tilney L. G., Kiehart D. P., Sardet C., Tilney M. (1978). Polymerization of actin. IV. Role of Ca^{2+} and H^{+} in the assembly of actin and in membrane fusion in the acrosomal reaction of echinoderm sperm. J. Cell Biol. **77**, 536—560.

Tombes R. M., Shapiro B. M. (1985). Metabolite channeling: A phosphocreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. Cell **41**, 325—334.

Turner P. R., Jaffe L. A., Fein A. (1986). Regulation of cortical vesicle exocytosis in sea urchin eggs by inositol 1,4,5-trisphosphate and GTP-binding protein. J. Cell Biol. **102**, 70—76.

Usui N., Yanagimachi R. (1976). Behaviour of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. J. Ultrastruct. Res. **57**, 276—288.

Uzzell T. M. (1964). Relation of the diploid and triploid species of the *Ambystoma jeffersonianum* complex. Copeia **1964**, 257—300.

Vacquier V. D. (1979). The interaction of sea urchin gametes during fertilization. Am. Zool. **19**, 839—849.

Vacquier V. D., Moy G. W. (1977). Isolation of bindin: The pro-

tein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 2456—2460.

Vacquier V. D., Payne J. E. (1973). Methods for quantitating sea urchin sperm in egg binding. Exp. Cell Res. **82**, 227—235.

Vacquier V. D., Tegner M. J., Epel D. (1973). Protease release from sea urchin eggs at fertilization alters the vitelline layer and aids in preventing polyspermy. Exp. Cell Res. **80**, 111—119.

Vincent J. P., Oster G. F., Gerhart J. C. (1986). Kinematics of gray crescent formation in *Xenopus* eggs. The displacement of subcortical cytoplasm relative to the egg surface. Dev. Biol. **113**, 484—500.

von Kolliker A. (1841). Beiträge zur Kenntnis der Geseclectuerhältnisse und der Samenfluüssigheist wirbelloger Thiere, nebst einem Versuch über Wesen und die Bedeutung der sogenannten Samenthiere. Berlin.

Ward G. E., Brokaw C. J., Garbers D. L., Vacquier V. D. (1985). Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. J. Cell Biol. **101**, 2324—2329.

Wassarman P. (1987). The biology and chemistry of fertilization. Science **235**, 553—560.

Whitaker M., Irvine R. F. (1984). Inositol 1, 4, 5-triphosphate microinjection activates sea urchin eggs. Nature **312**, 636—639.

Whitaker M., Steinhardt R. (1982). Ionic regulation of egg activation. Q. Rev. Biophys. **15**, 593—666.

Whitaker M. J., Steinhardt R. (1985). Ionic signalling in the sea urchin egg at fertilization. In: C. B. Metz and A. Monroy (eds.), Biology of Fertilization, Vol. 3. Academic Press, Orlando, Florida, pp. 167—221.

Williams W. L. (1972). Biochemistry of capacitation of spermatozoa. In: K. S. Moghissi and E. E. S. Hafez (eds.), Biology of Mammalian Fertilization and Implantation. Charles Thomas, Springfield, Illinois.

Wincek T. J., Parrish R. F., Polakoski K. L. (1979). Fertilization: A uterine glycosaminoglycan stimulates the conversion of sperm proacrosin to acrosin. Science **203**, 553—554.

Winkler M. M., Steinhardt R. A., Grainger J. L., Mimming L. (1980). Dual ionic controls for the activation of protein synthesis at fertilization. Nature **287**, 558—560.

Yanagimachi R. (1981). Mechanisms of fertilization in mammals. In: L. Mastroianni and J. D. Biggers (eds). Fertilization and Embryonic Development In Vitro. Plenum, New York, pp. 81—182.

Yanagimachi R., Noda Y. D. (1970). Electron microscope studies of sperm incorporation into the golden hamster egg. Am. J. Anat. **128**, 429—462.

Yanagimachi R., Usui N. (1974). Calcium dependence of the acrocome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. Exp. Cell Res. **89**, 161—174.

Yudin A., Cherr G., Katz D. (1988). The structure of the cumulus matrix and zona pellucida: A new view of sperm interaction with oocyte-associated extracellular matrices. Cell Tiss. Res., in press.

Zaneveld L. J. D., Williams W. L. (1970). A sperm enzyme that disperses the corona radiata and its inhibition by decapitation factor. Biol. Reprod. **2**, 363—368.

Глава 3
Дробление: создание многоклеточности

Следует выказывать величайшее уважение по отношению к любому явлению, которое возрастает экспоненциально, как бы незначительно оно ни было.

ГАРРЕТ ХАРДИН (1968)

История развития человека в течение девяти месяцев, предшествующих его рождению, вероятно, гораздо интереснее и содержит события более грандиозные, чем все последующие семьдесят лет его жизни.

СЭМЮЭЛЬ ТЕЙЛОР КОЛРИДЖ (1834)

Введение

Оплодотворение играет чрезвычайно важную роль в развитии, но оно — лишь только первая его ступень. Зигота с ее новым генетическим потенциалом и новым распределением цитоплазмы приступает к созданию многоклеточного организма. У всех известных животных это начинается с процесса, носящего название **дробления** — серии митотических делений, в результате которых огромный объем цитоплазмы яйца разделяется на многочисленные содержащие ядро клетки меньшего размера. Такие клетки, образующиеся в период дробления, называют **бластомерами**.

У большинства видов в период дробления объем зародыша не увеличивается. Это вызывает удивление, поскольку в большинстве других случаев клеточной пролиферации в период между митозами происходит рост клеток: клетка увеличивается в объеме почти вдвое и затем делится. Такой рост приводит к четкому увеличению общего объема клеток при сохранении относительно постоянного отношения объема ядра к объему цитоплазмы. Однако в период дробления зиготы объем цитоплазмы не возрастает: огромная масса цитоплазмы зиготы разделяется на все более мелкие клетки. Сначала яйцо разделяется на две половины, затем — на четыре части, восемь частей и т. д. Это деление цитоплазмы яйца, не сопровождающееся ростом, осуществляется путем выпадения интерфазного периода роста между делениями, тогда как деления ядер следуют друг за другом с такой большой скоростью, которая никогда не наблюдается в дальнейшем (даже у опухолевых клеток). Так, например, яйцо лягушки может разделиться на 37 000 клеток за 43 ч, а у дрозофилы в период дробления митозы в течение 2 ч происходят каждые 10 мин.

Скорость увеличения числа клеток в период дробления можно оценить, сравнив ее со скоростью увеличения их числа на других стадиях развития. На рис. 3.1 представлены изменения логарифма числа клеток у зародыша лягушки в зависимости от времени (Sze, 1953). Он иллюстрирует резкое изменение интенсивности клеточных делений при переходе от дробления к гаструляции. Одним из последствий высокой интенсивности делений в процессе дробления является постепенное уменьшение отношения объема цитоплазмы к объему ядра. Изменение скорости, с которой происходит снижение отношения объема цитоплазмы к объему ядра, у многих типов зародышей является решающим фактором, определяющим время активации некоторых генов.

У *Xenopus laevis* активация транскрипции новых матриц происходит лишь после 12 делений дробления. В это время снижается интенсивность делений дробления, бластомеры приобретают подвижность и в ядре начинают транскрибироваться гены. Полагают, что интенсивность дробления бластомеров за-

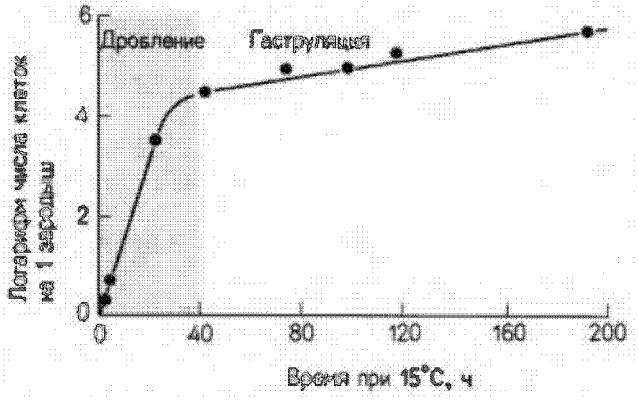


Рис. 3.1. Образование новых клеток в процессе раннего развития лягушки *Rana pipiens*. (По Sze, 1953.)

висят от какого-то фактора, синтез которого зависит от новообразованного хроматина, поскольку время перехода к следующей стадии развития может быть смещено путем изменения плоидности: чем больше хроматина содержит зародыш, тем раньше наступает переход. Если количество хроматина вдвое превышает нормальное, то переход осуществляется на одно деление раньше, чем в норме (Newport, Kirschner, 1982a, b). Таким образом, дробление начинается вскоре после оплодотворения и заканчивается, когда у зародыша достигается новое равновесие между ядром и цитоплазмой.

ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ДРОБЛЕНИЯ ЗАРОДЫША

Дробление — строго координированный процесс, находящийся под генетическим контролем. Видовые особенности процесса дробления определяются двумя основными параметрами: 1) количеством и распределением желточных белков в цитоплазме и 2) присутствующими в цитоплазме факторами, которые влияют на ориентацию митотического веретена и время его образования.

Если желток в яйце распределен неравномерно, то в области, содержащей меньше желтка (**анимальном полушарии**), клеточные деления проходят с большей скоростью, чем в противоположной, богатой желтком области (**вегетативном полушарии**). Ядро зиготы часто бывает смещено к анимальному полюсу. В табл. 3.1 дана классификация типов дробления и показано влияние желтка на симметрию дробления и его характер. В общей форме можно сказать, что желток подавляет дробление. У зигот, содержащих относительно мало желтка (изолецитальные и мезолецитальные яйца), дробление бывает **голобластическим**, что означает, что борозды дробления проходят через все яйцо. Зиготы, содержащие большие запасы белков желтка, претерпевают **меробластическое дробление**, при котором делятся не полностью. Борозды дробления не проникают в богатую желтком область цитоплазмы. Меробластическое дробление может быть **дискоидальным** (у птиц) или **поверхностным** (у насекомых) в зависимости от того, сосредоточены ли запасы желтка у одного полюса (телолецитальные яйца) или в центре цитоплазмы (центролецитальные яйца).

Желток является эволюционным приспособлением, позволяющим зародышу развиваться без поступления пищи извне. Животные, яйца которых не содержат больших запасов желтка, как, например, морские ежи, обычно достигают стадии личинки за короткий срок. Их свободноплавающие личинки способны к самостоятельному питанию и продол-

Таблица 3.1. Классификация типов дробления

Тип дробления	Тип яиц по количеству и распределению желтка	Симметрия дробления	Типичные представители
Голобластическое (полное дробление)	Изолецитальные (олиголецитальные) (одиночные желточные включения распределены равномерно)	Радиальное	Иглокожие, ланцетник
		Спиральное	Большинство моллюсков, плоских, круглых и кольчатых червей
		Билатеральное	Асцидии
		Асинхронное	Млекопитающие
	Мезолецитальные (умеренно телолецитальные)	Радиальное	Амфибии
Меробластическое (частичное дробление)	Телолецитальные (плотное скопление желтка у одного полюса яйца)	Билатеральное	Головоногие моллюски
		Дискоидальное (билатеральное)	Рыбы, рептилии, птицы
	Центролецитальные (желток сосредоточен в центре яйца)	Поверхностное	Большинство членистоногих

жают дальнейшее развитие. Яйца млекопитающих, которые также не содержат больших количеств желтка, прибегают к стратегии иного рода, а именно — образуют плаценту. Как мы увидим ниже, у млекопитающих в начале дифференцировки зародыша происходит обособление клеток, которые будут участвовать в образовании плаценты. Этот орган будет снабжать зародыша пищей и кислородом на протяжении длительного периода внутриутробного развития.

Другую крайность представляют яйца рыб, рептилий и птиц. Бо́льшую часть этих яиц занимает желток. Запасы желтка должны быть достаточными для того, чтобы обеспечить питание зародыша на протяжении длительного периода, так как они не имеют плаценты и в своем развитии могут не проходить личиночной стадии. Корреляция между большой концентрацией желтка и отсутствием личиночных форм обнаруживается у некоторых видов лягушек. У таких тропических лягушек, как, например, *Liopelma* и *Arthroleptella*, отсутствует стадия головастика. Яйца этих лягушек снабжены огромным количеством желтка (Lutz, 1947) и не нуждаются в том, чтобы их откладывали в воду, поскольку стадия головастика выпала из их развития. Явление прямого развития у амфибий будет подробнее рассматриваться в гл. 19.

Однако желток — только один из факторов, оказывающих влияние на характер дробления. Существуют также унаследованные особенности клеточных делений, которые накладываются на влияние желтка. Это легко увидеть на примере изолецитальных яиц, содержащих очень мало желтка. При отсутствии большого количества желтка наблюдаются четыре основных типа дробления: радиальное голобластическое, спиральное голобластическое, билатеральное голобластическое и асинхронное голобластическое.

Радиальное голобластическое дробление

Морской огурец *Synapta*

Наиболее простой пример для описания процесса дробления — это дробление радиального голобластического типа. Такой тип дробления присущ иглокожим и представителю бесчерепных — ланцетнику. Борозды при этом типе дробления ориентированы параллельно и перпендикулярно анимально-вегетативной оси яйца. На рис. 3.2 представлено дробление морского огурца *Synapta digita*. После соединения пронуклеусов ось первого митотического веретена ориентируется перпендикулярно анимально-вегетативной оси яйца. Следовательно, первая борозда дробления проходит непосредственно через анимальный и вегетативный полюсы и приводит к образованию двух дочерних клеток одинаковых размеров. Такое деление называют меридиональным, поскольку борозда проходит через два полюса подобно меридиану на глобусе. Митотические веретена второго деления дробления располагаются под прямыми углами к первому веретену, но так же, как и это веретено, они ориентированы перпендикулярно анимально-вегетативной оси яйца. Борозды дробления появляются одновременно в обоих бластомерах и также проходят через два полюса. Таким образом, два первых деления дробления меридиональны

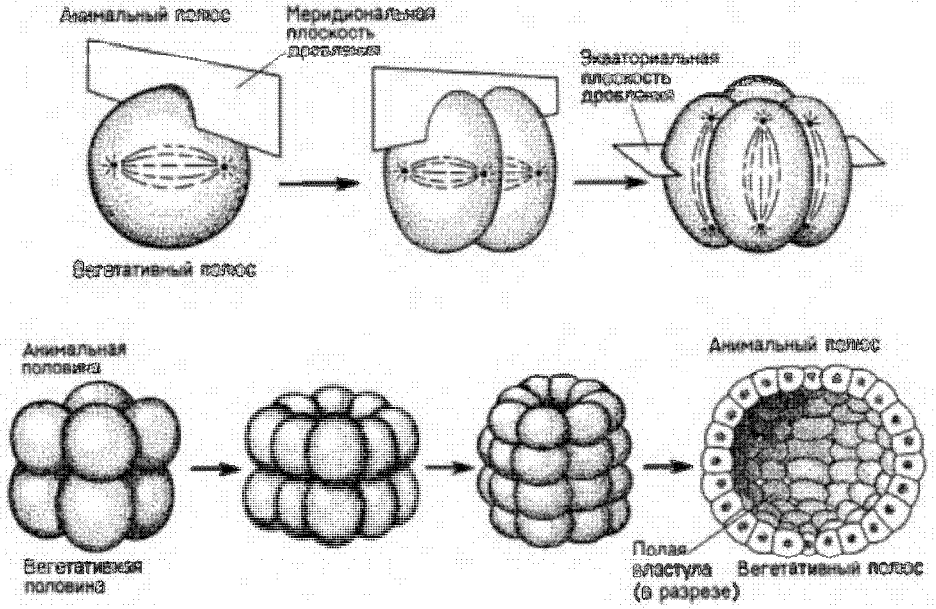


Рис. 3.2. Голобластическое дробление иглокожего *Synapta digita*, приводящее к образованию полой бластулы, которая изображена в разрезе во втором ряду справа. (По Saunders, 1982.)

и перпендикулярны друг другу. Третье деление бывает экваториальным: митотические веретена в каждом бластомере располагаются параллельно анимально-вегетативной оси, и возникающие борозды отделяют полюсы один от другого, причем зародыш разделяется на восемь бластомеров равной величины. Каждый бластомер анимальной половины зародыша теперь располагается непосредственно над бластомером вегетативной половины.

Четвертое деление бывает снова меридиональным и приводит к образованию двух ярусов по 8 клеток в каждом; пятое экваториальное деление дает начало четырем ярусам, в каждом из которых содержится по 8 клеток. Далее наблюдается чередование меридиональных и экваториальных делений, приводящих к образованию 64, 128 и 256 клеток. В результате возникает зародыш, у которого бластомеры располагаются горизонтальными рядами вдоль центральной полости. На обоих полюсах зародыша бластомеры сближаются, и возникает полый шар, стенка которого образована одним слоем клеток. Такой полый шар называют **бластулой**, а его центральную полость — **бластоцелем**.

Если провести разрез через зародыш *Synapta* в плоскости любого меридиана на любой стадии дробления, то этот разрез разделит его на две зеркальные половины. Такой тип симметрии присущ шару или цилиндру и носит название радиальной симметрии. Соответственно мы говорим, что у *Synapta* дробление радиальное голобластическое.

Морские ежи

Для морских ежей также характерно радиальное голобластическое дробление, но с некоторыми существенными модификациями. Первое и второе деления дробления очень сходны с такими же делениями у *Synapta*; оба они меридиональные и перпендикулярны друг другу. Третье деление также экваториальное и отделяет полюсы один от другого (рис. 3.3).

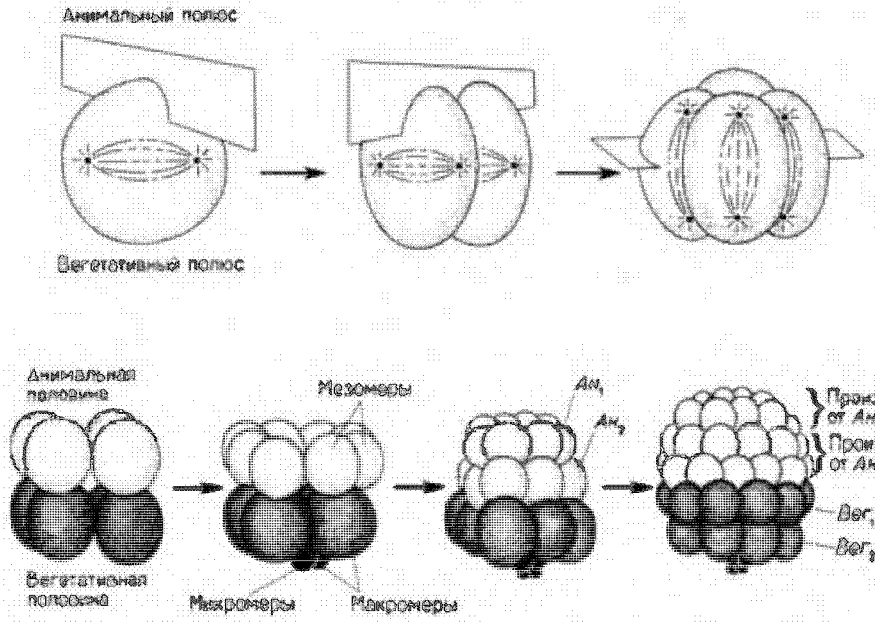
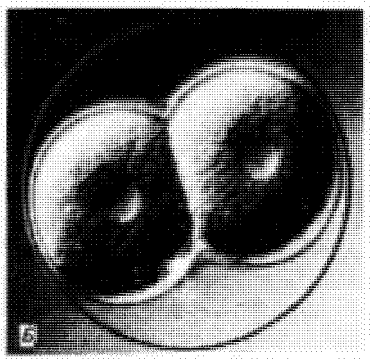
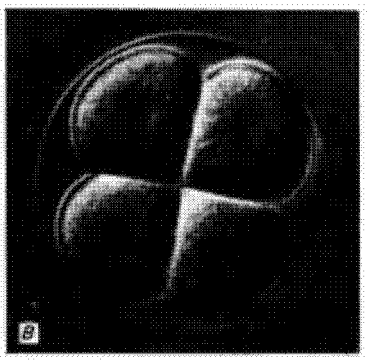
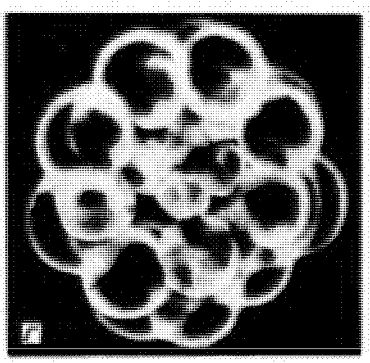


Рис. 3.3. Дробление у морского ежа. *А*. Плоскости деления при первых трех делениях дробления и образование отдельных ярусов клеток при 3—6 делениях. *Б*—*Г*. Микрофотографии живых зародышей морского ежа *Lytechinus pictus*; вид со стороны анимального полюса. *Б* — 2-клеточная и *В* — 4-клеточная стадии развития морского ежа. *Г*. 32-клеточная стадия представлена без оболочки оплодотворения, что позволяет различить мезомеры анимального полюса, центральные макромеры и вегетативные микромеры, которые видны в центре. (Фотографии с любезного разрешения G. Watchmaker.)







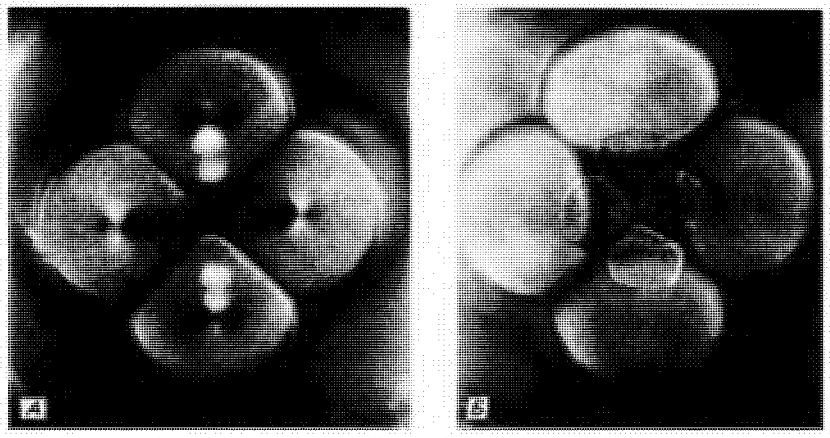


Рис. 3.4. Образование микромеров при четвертом делении у зародышей морского ежа. Вид на вегетативный полюс зародышей снизу. *А*. Положение и ориентация митотического веретена в нижней части вегетативных клеток при рассматривании живого зародыша в поляризованном свете. *Б*. Деление в соответствии с асимметричным расположением веретен привело к образованию микромеров и макромеров. (Из Inoué, 1982; фотографии с любезного разрешения S. Inoué.)

Четвертое деление, однако, происходит иначе, чем у *Synapta*. Четыре клетки анимального яруса разделяются меридионально на восемь бластомеров одинаковой величины. Эти клетки называют **мезомерами**. Вегетативный ярус претерпевает неравное экваториальное деление, в результате которого образуются четыре крупные клетки — **микромеры** и четыре клетки меньшего размера — **макромеры** у вегетативного полюса (рис. 3.4). При следующем делении восемь мезомеров 16-клеточного зародыша делятся экваториально и образуют два «анимальных» яруса, an_1 и an_2, расположенные один над другим. Макромеры делятся меридионально, образуя восьмиклеточный ярус ниже an_2. Микромеры также делятся; возникшая маленькая группа клеток примыкает к более крупным клеткам расположенного выше яруса. При шестом делении все борозды ложатся экваториально, при седьмом — меридионально. В результате седьмого деления возникает 128-клеточная бластула.

Свен Герстадиус (Hörstadius, 1939) проделал простой опыт, который показал, что время появления борозд дробления у морского ежа и их ориентация не зависят от предыдущих делений. Когда он подавлял первые одно, два или три деления, встряхивая яйца или помещая их в гипотоническую морскую воду, то неравное (четвертое) деление дробления, приводящее к образованию микромеров, все равно наступало в положенное время (рис. 3.5). На этом основании Герстадиус пришел к заключению, что существуют три фактора, которые детерминируют деление 8-клеточного зародыша: 1) «прогрессивные изменения цитоплазмы, которые определяют ориентацию веретен, образующихся спустя определенные интервалы времени после оплодотворения»; 2) в цитоплазме вегетативной области должен существовать особый материал, образующий микромеры; и 3) должен существовать какой-то механизм, который в соответствующий момент активирует материал, образующий микромеры (Hörstadius, 1973).

Природа «микромерных часов» до сих пор не выяснена. Однако Икеда (Ikeda, 1965) получил данные, согласно которым клетка может вести отсчет событий, происходящих при дроблении, благодаря циклическим изменениям в цитоплазме. Он обнаружил, что освобождение сульфгидрильных (—SH) групп белков происходит циклически. Чередование окисленной (—S—S—) и восстановленной (HS—SH) конформаций, вероятно, отражает глубокие изменения в клеточном метаболизме. Икеда показал, что свободные сульфгидрильные группы в наибольшем числе имеются в делящихся бластомерах и в наименьшем — в то время, когда клетки не делятся (рис. 3.6, *А*). Воздействия, которые предотвращают деления дробления, не оказывают влияния на этот цикл восстановления—окисления. Отделение микромеров всегда происходит на четвертом —SH-пике после оплодотворения независимо от того, какое число делений дробления было предварительно подавлено (рис. 3.6, *Б*). Напротив, если подавить возникновение сульфгидрильного пика (путем добавления к морской воде эфира), то отделение микромеров запаздывает. Возможно, что циклические процессы восстановления и окисления играют какую-то роль во внутриклеточном отсчете времени. Из яиц морского ежа был выделен белок (Sakai, 1966, 1968), который сокращается при окислении его свободных сульфгидрильных групп. Подобные белки, возможно, и обусловливают такие циклические изменения.

Стадия бластулы при развитии морского ежа начинается тогда, когда число клеток зародыша достигнет 128. Эти клетки образуют стенку полого шара, которая окружает центрально расположенный бластоцель (рис. 3.7). Каждая клетка находится в контакте с богатой белками жидкостью бластоцеля и с гиалиновым слоем. В это время контакт между клетками становится более тесным. Анализ этого процесса у морской звезды показал (Dan-Sohkawa, Fujisawa, 1980), что образование полого

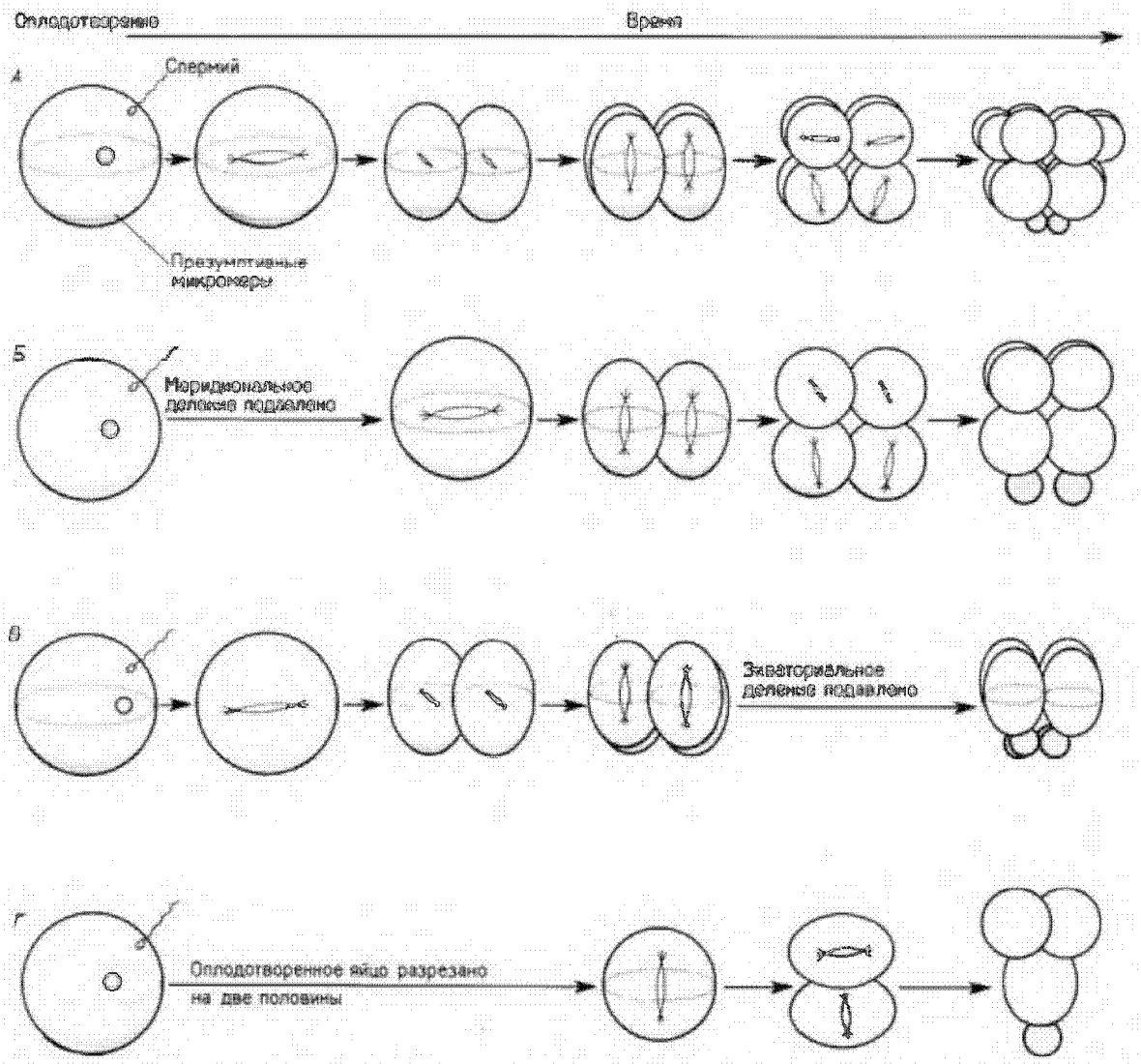


Рис. 3.5. Образование микромеров зависит от продолжительности развития, а не от числа делений. *А*. Нормальная последовательность делений дробления у морского ежа; микромеры образуются при четвертом делении. *Б, В*. Первое или третье деление подавлено воздействием гипотонической морской воды. *Г*. Оплодотворенное яйцо разрезано пополам в меридиональной плоскости, что привело к образованию половины структур, возникающих при нормальном дроблении. Во всех случаях микромеры (выделены серым цветом) появляются приблизительно в одно и то же время независимо от числа предшествующих делений. (По Hörstadius, 1939).

шара происходит одновременно с возникновением плотных контактов между бластомерами. Эти контакты объединяют слабо связанные между собой клетки в ткань и изолируют бластоцель от окружающей среды (рис. 3.8). Поскольку клетки продолжают делиться, поверхность клеточного пласта увеличивается и этот пласт утончается. На протяжении всего периода существования бластулы ее стенка сохраняет однослойность.

Для объяснения сопряженности процессов увеличения поверхности стенки бластулы и формирования бластоцеля были предложены две гипотезы. Согласно одной из них (Dan, 1960), первый процесс осуществляется под действием сил, исходящих от самого бластоцеля. Поскольку бластомеры секретируют в бластоцель белки, содержащаяся в бластоцеле жидкость становится вязкой. Эта жидкость поглощает большие количества воды путем осмоса, ее объем увеличивается, и она изнутри оказывает давление на бластомеры. Давление жидкости приводит также к тому, что длинная ось каждой клетки ориентируется определенным образом — так, что деление

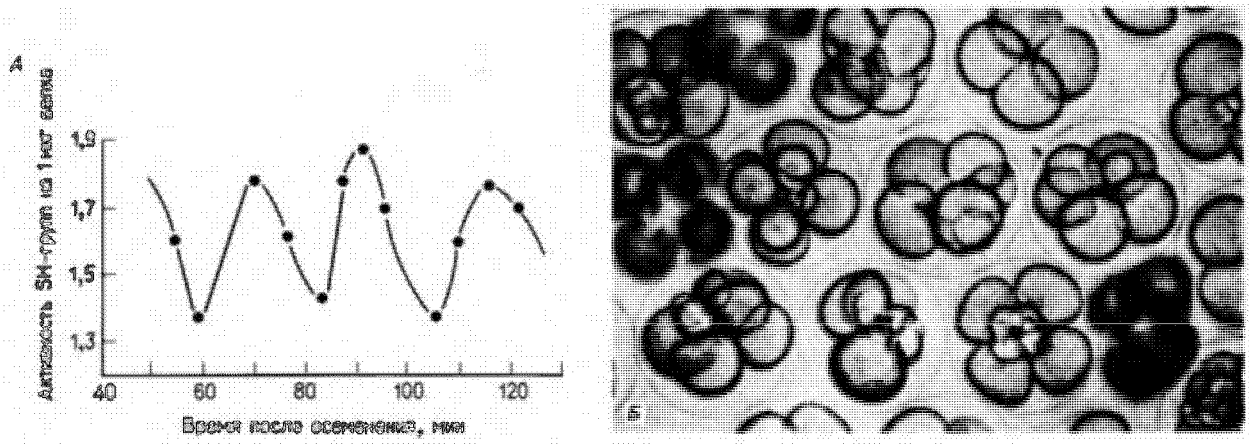


Рис. 3.6. *А*. Циклическая изменчивость числа свободных сульфгидрильных групп в белках. Максимумы совпадают с серединой митотического цикла делений дробления и наблюдаются независимо от того, было ли деление подавлено или не было. *Б*. Образование микромеров в 8-клеточных зародышах морского ежа после подавления делений ультрафиолетовым облучением. (По Ikeda, 1965.)

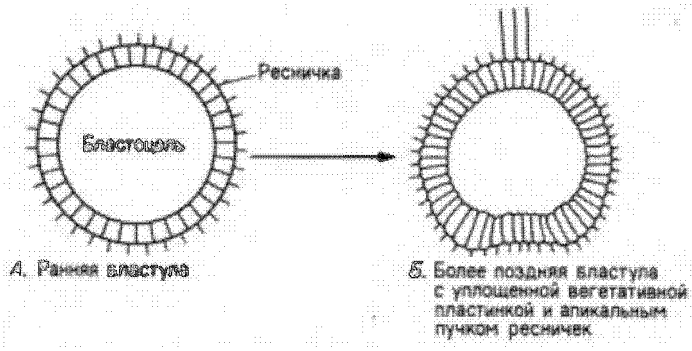


Рис. 3.7. Бластула морского ежа. *А*. Ранняя бластула морского ежа образована одним слоем клеток, имеющих округлую форму и окружающих обширный бластоцель. *Б*. По мере продолжения клеточных делений в форме клеток бластулы появляются различия: клетки в области вегетативной пластинки удлиняются. (По Giudice, 1973.)

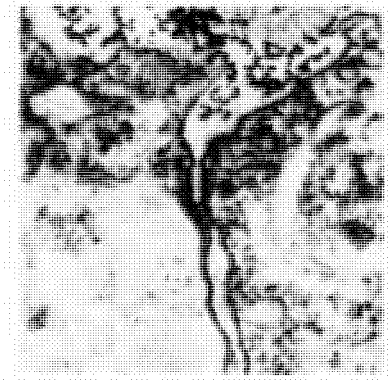


Рис. 3.8. Область контакта двух соприкасающихся клеток в 1024-клеточной бластуле морской звезды. Между плазматическими мембранами обеих клеток в области таких контактов не имеется свободного пространства; это так называемый плотный (замыкающий) контакт. (Из Dan-Sohkawa, Fujisawa, 1980; фотографии с любезного разрешения авторов.)

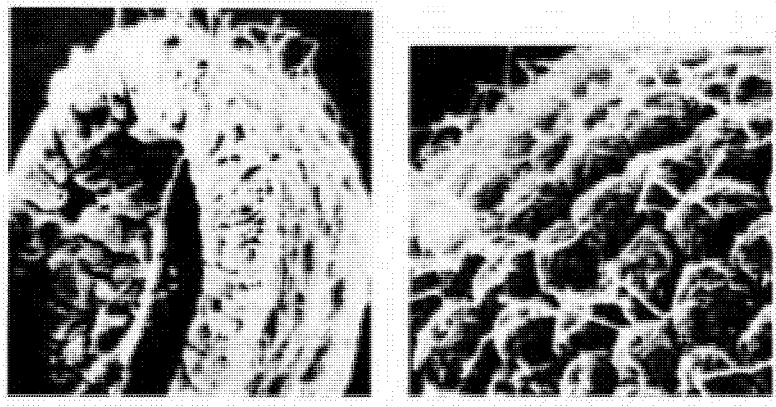


Рис. 3.9. Клетки бластулы, имеющие реснички. Каждая клетка обладает одной ресничкой. (Фотографии с любезного разрешения W. J. Humphreys.)

этих клеток никогда не бывает направлено в сторону бластоцеля; такая ориентация клеточной популяции в одной плоскости способствует ее дальнейшему распространению вширь. Согласно другому предположению (Wolpert, Gustafson, 1961; Wolpert, Mercer, 1963), давление жидкости бластоцеля не является необходимым условием получения наблюдаемого эффекта. Авторы этой гипотезы придают особое значение разной адгезивности клеток по отношению друг к другу и к гиалиновому слою. Предполагается, что, пока клетки остаются прочно связанными с гиалиновым слоем, единственной возможностью для них остается расширение поверхности клеточного пласта. Формирование бластулы является скорее следствием этой экспансии, чем какого-либо другого процесса.

На наружной поверхности клеток бластулы образуются ресички (рис. 3.9), что позволяет бластуле вращаться внутри оболочки оплодотворения. Вскоре клетки секретируют фермент вылупления, который переваривает оболочку. Зародыш вылупляется и становится свободноплавающей бластулой.

Амфибии

Дробление у зародышей большинства бесхвостых и хвостатых амфибий радиально-симметричное и голобластическое, как у иглокожих. Однако яйцо амфибий содержит гораздо больше желтка. Этот желток, сосредоточенный в вегетативном полушарии, затрудняет дробление. Так, первое деление начинается на анимальном полюсе и медленно распространяется вниз на вегетативную область (рис. 3.10). У хвостатой амфибии аксолотля борозда дробления распространяется в анимальной области со скоростью, близкой к 1 мм/мин. Ниже области серого серпа скорость ее распространения снижается и при приближении к вегетативному полюсу достигает 0,02—0,03 мм/мин (Нага, 1977).

На рис. 3.11, *А* представлена микрофотография яйца лягушки на стадии первого деления дробления, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Можно видеть складки в борозде дробления и различия между бороздами в анимальном и вегетативном полушариях. В то время, когда борозда первого деления дробления еще не завершила разделения богатой желтком цитоплазмы вегетативного полушария, борозды второго деления уже закладываются вблизи от анимального полюса. Борозды этого деления располагаются под прямыми углами к первой борозде и ложатся, так же, как и она, меридионально (рис. 3.11, *Б*). Третье деление, как это можно было ожидать, бывает экваториальным. Однако из-за большой концентрации желтка в вегетативной области борозды третьего деления дробления располагаются значительно ближе к анимальному полюсу. Они разделяют зародыш лягушки на четыре анимальных бластомера меньшего размера и четыре более крупных бластомера в вегетативной области (рис. 3,11, *В*). В результате этого неравного голобластического деления возникают область быстро делящихся бластомеров вблизи анимального полюса и область более медленно делящихся бластомеров. На последующих стадиях

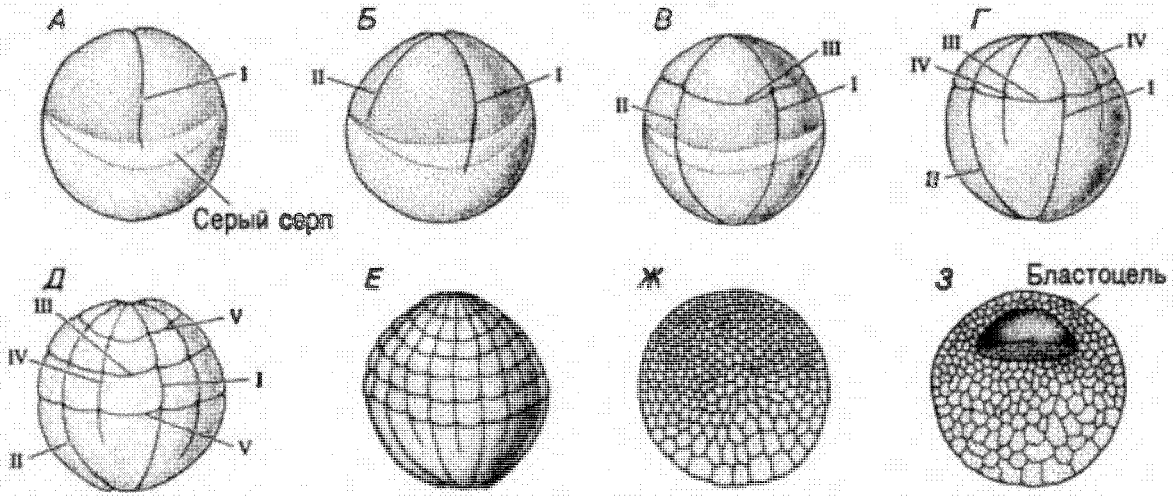


Рис. 3.10. Дробление яйца лягушки. Борозды дробления обозначены римскими цифрами в порядке их появления. *Б*. Желток, сконцентрированный в вегетативном полушарии, затрудняет дробление; поэтому второе деление дробления начинается в анимальной области яйца раньше, чем первая борозда разделит цитоплазму вегетативной области. *В*. Борозды третьего деления смещены в направлении анимального полюса. *Г—Ж*. После ряда последовательных делений в анимальном полушарии образуется большое число мелких бластомеров, а в вегетативном полушарии — меньшее число более крупных бластомеров. *З*. Поперечный разрез бластулы. (По Carlson, 1981.)

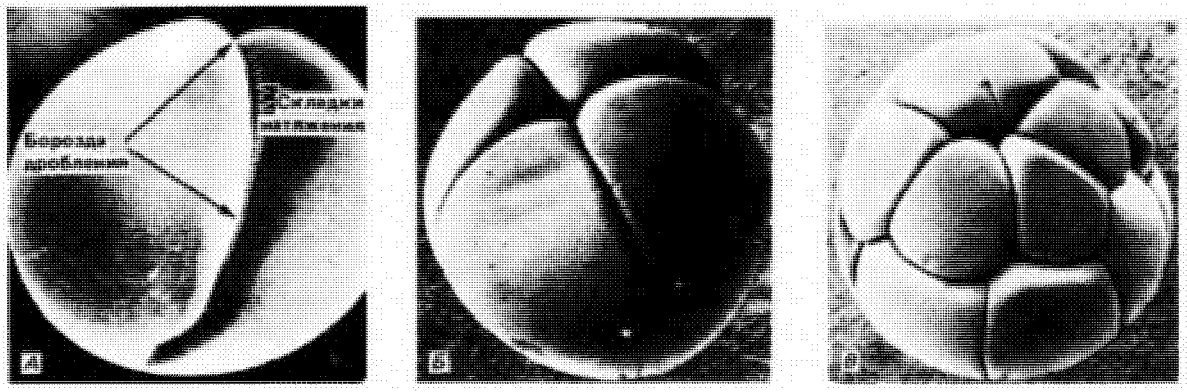


Рис. 3.11. Микрофотографии дробящегося яйца лягушки, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа. Первое (*А*), второе (*Б*) и четвертое (*В*) деления дробления. На последней фотографии (стадия 16 клеток) отчетливо видны различия в размерах анимальных и вегетативных клеток, возникших при третьем делении. (*А* — из Beams, Kessel, 1976; *Б*, *В* — из L. Biedler; фотографии с любезного разрешения авторов.)

дробления анимальная область содержит многочисленные мелкие клетки, тогда как в вегетативной области имеется лишь относительно небольшое число крупных богатых желтком бластомеров (рис. 3.10).

Зародыш амфибий, содержащий от 16 до 64 клеток, обычно называют морулой (от латинского названия тутовой ягоды, на которую он отдаленно похож). На 128-клеточной стадии появляется хорошо различимый бластоцель, и принято считать, что в это время зародыш достиг стадии бластулы. На самом деле образование бластоцеля прослеживается с самого первого деления дробления. Показано (Kalt, 1971), что у *Xenopus laevis* первая борозда дробления в анимальном полушарии образует расширение, причем между бластомерами возникает маленькая полость, изолированная от наружной среды плотными межклеточными контактами (рис. 3.12). Эта полость при последующих делениях расширяется и преобразуется в бластоцель.

Бластоцель, вероятно, выполняет две основные функции. Во-первых, он представляет собой полость, которая дает возможность клеткам при гаструляции мигрировать внутрь зародыша. Во-вторых, существование бластоцеля предотвращает преждевременное взаимодействие между клетками, которые находятся выше и ниже его. Когда Ньюкуп (Nieuwkoop, 1973) брал у зародыша тритона клетки из крыши бластоцеля и помещал их вблизи богатых желтком вегетативных клеток дна бластоцеля, то из

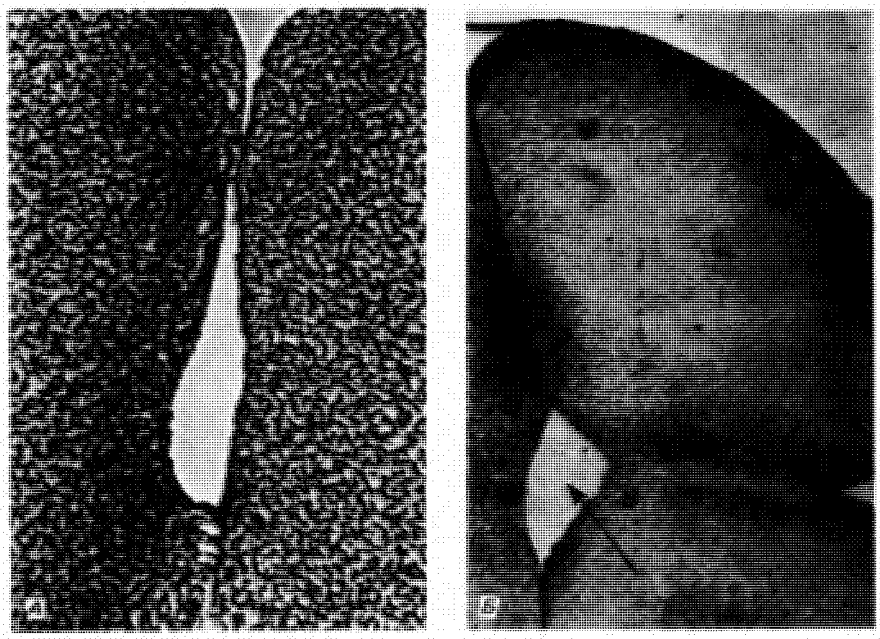


Рис. 3.12. Образование бластоцеля в яйце лягушки. *А*. Плоскость первого деления дробления; видно небольшое расширение, которое позднее превратится в бластоцель. *Б*. 8-клеточный зародыш с бластоцелем небольших размеров (указан стрелкой) в месте пересечения трех плоскостей дробления. (Из Kalt, 1971; фотографии с любезного разрешения M. R. Kalt.)

этих анимальных клеток развивались не производные эктодермы, а мезодермальная ткань. Поскольку в норме мезодерму образуют анимальные клетки, которые прилежат к предшественникам энтодермы, представляется вероятным, что вегетативные бластомеры оказывают влияние на прилежащие клетки, побуждая их дифференцироваться в мезодермальные ткани (см. гл. 4). Таким образом, наличие бластоцеля обеспечивает сохранение клетками, предназначенными для образования покровного эпителия и нервной системы, своих исходных свойств.

Спиральное голобластическое дробление

Спиральное дробление характерно для нескольких групп червей (кольчатых, турбеллярий, немертин) и всех моллюсков, за исключением головоногих. Оно во многих отношениях отличается от радиального дробления. Во-первых, яйца не делятся параллельно или перпендикулярно анимально-вегетативной оси. Плоскости делений дробления ориентированы наклонно, что приводит к «спиральному» расположению дочерних бластомеров. Во-вторых, число контактов между клетками больше, чем при радиальном дроблении. Фактически они принимают расположение, наиболее стабильное в термодинамическом отношении, подобное расположению контактирующих мыльных пузырьков (рис. 3.13). В-третьих, зародыши со спиральным типом дробления проходят меньше делений до начала гаструляции. Это позволило проследить судьбу каждой отдельной клетки бластулы. Когда сопоставили судьбы отдельных клеток зародышей кольчатых червей, плоских червей и моллюсков, то оказалось, что у клеток, занимающих одно и то же положение, судьба в принципе одинакова (Wilson, 1898). Возникающие таким образом бластулы не имеют бластоцеля и носят название **стерробластул**.

На рис. 3.14 и 3.15 показано дробление зародыша моллюска. Первые два деления почти меридиональны и приводят к образованию четырех крупных макромеров (обозначенных A, B, C и D). У многих видов эти бластомеры различаются по своим размерам (причем D бывает самым крупным) — это позволяет идентифицировать отдельные бластомеры. При последующих делениях каждый макромер на своем анимальном полюсе отделяет маленький микромер. Каждый последовательно появляющийся квартет микромеров смещается вправо или влево относительно сестринских макромеров, что приводит к характерному для данного типа дробления расположению бластомеров по спирали. Если смотреть на зародыш со стороны анимального полюса, то можно видеть, что верхние концы митотических веретен бывают наклонены поочередно то по часовой стрелке, то против нее. В результате микромеры оказываются смещенными по отношению к отделяющим их макромерам то влево, то вправо. При третьем делении макромер A дает две дочерние клетки — макромер 1A и микромер 1a. Бластомеры B, C и D ведут себя сходным образом, формируя первый квартет микромеров. Если на этой стадии смотреть на дробящиеся яйца со стороны анимального полюса, то у большинства видов микромеры оказываются смещенными вправо по отношению к отделившим их макромерам (дексиотропная спираль) в противоположность леотропной спирали при их смещении влево. При четвертом делении макромер 1A делится на макромер 2A и микромер 2a, а микромер 1a — на два микромера, $1a^1$ и $1a^2$. При последующем делении макромер 2A дает бластомеры 3A и 3a, а такие микромеры, как $1a^2$, дает клетки $1a^{21}$ и $1a^{22}$.

Смещение плоскости дробления влево или вправо контролируется цитоплазматическими факторами. Это было установлено путем изучения мутаций закручивания раковин у улиток. У некоторых улиток устье, которым открывается спираль раковины, находится с правой стороны от ее завитка, тогда как у других устье располагается слева. Обычно направление закручивания бывает одинаковым у всех особей данного вида. Однако иногда встречаются мутанты. Например, среди представителей видов с устьем, расположенным справа, встречаются особи, у которых оно расположено слева. Результаты

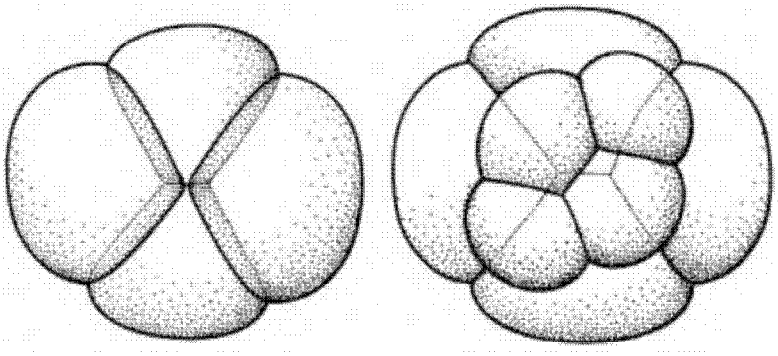


Рис. 3.13. Схематический рисунок, показывающий расположение четырех и восьми мыльных пузырьков в широком сосуде со слегка вогнутым дном. В соответствии с законами термодинамики пузырьки располагаются так, что площадь контакта между ними оказывается максимальной; такая картина очень напоминает картину спирального дробления зародышей.

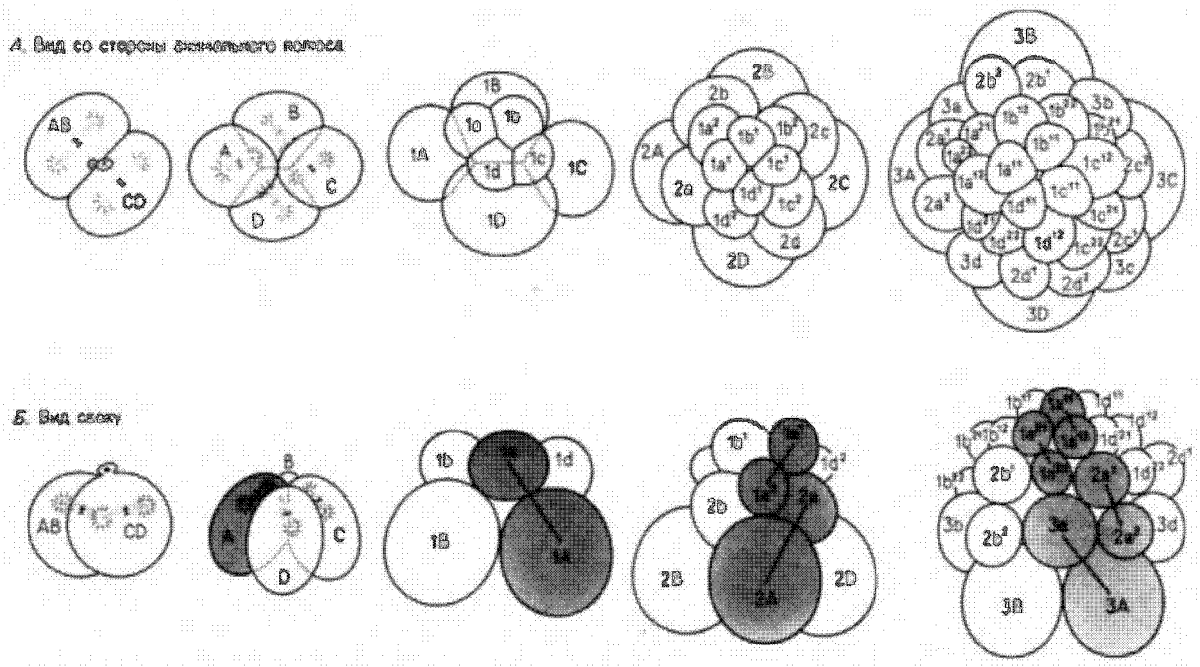


Рис. 3.14. Спиральное дробление у *Trochus* (*А* — вид со стороны анимального полюса; *Б* — вид сбоку). На рис. *Б* клетки — потомки бластомера А — выделены серым цветом. Митотические веретена, изображенные на ранних стадиях, разделяют клетки на неравные части и под углом к вертикальной и горизонтальной осям.

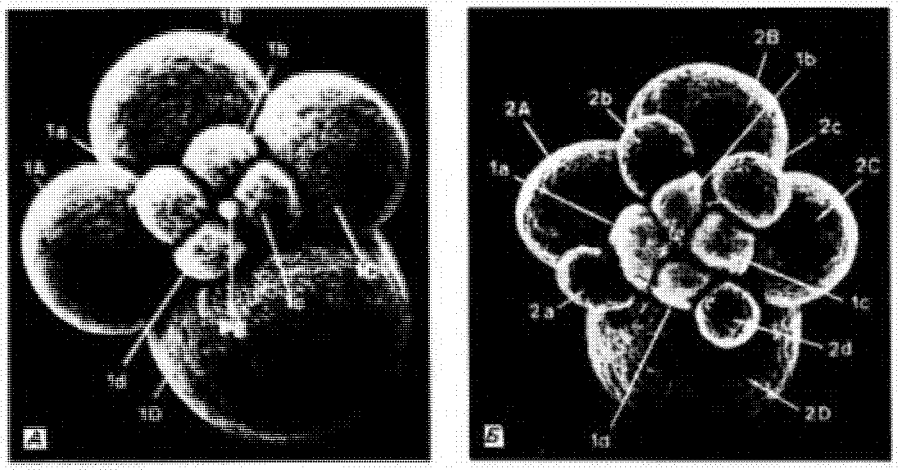


Рис. 3.15. Спиральное дробление яйца улитки *Ilyanassa*. Бластомер D больше остальных, что позволяет идентифицировать каждую клетку. Дробление дексиотропное. *А*. 8-клеточная стадия. *Б*. Стадия незавершенного четвертого деления, на которой макромеры уже разделились на крупные и мелкие спирально расположенные клетки. (Из Craig, Morrill, 1986; фотографии с любезного разрешения авторов.)

изучения зародышей таких улиток с уклоняющимся строением (Crampton, 1894) показали, что процесс дробления у них отличается от нормального. Положение клеток после второго деления дробления было у них иным (рис. 3.16). Это являлось следствием другой ориентации митотического аппарата у левозакрученных (леотропных) улиток. Все последующие деления леотропных зародышей были зеркальным отражением картин, наблюдающихся у дексиотропных зародышей. На рис. 3.16 можно видеть, что положение бластомера 4d (который играет важную роль, поскольку его потомки образуют мезодермальные органы) различно у зародышей с разным направлением спирализации. В конечном счете формируются две улитки, тела которых располагаются по разные стороны от устья.

Направление закручивания раковины улиток контролируется одной парой генов (Sturtevant, 1923; Boycott et al., 1930). У улитки *Limnaea peregra* большинство особей дексиотропные. Изредка встречающиеся леотропные мутанты были скрещены с улитками дикого типа. Эти скрещивания показали, что

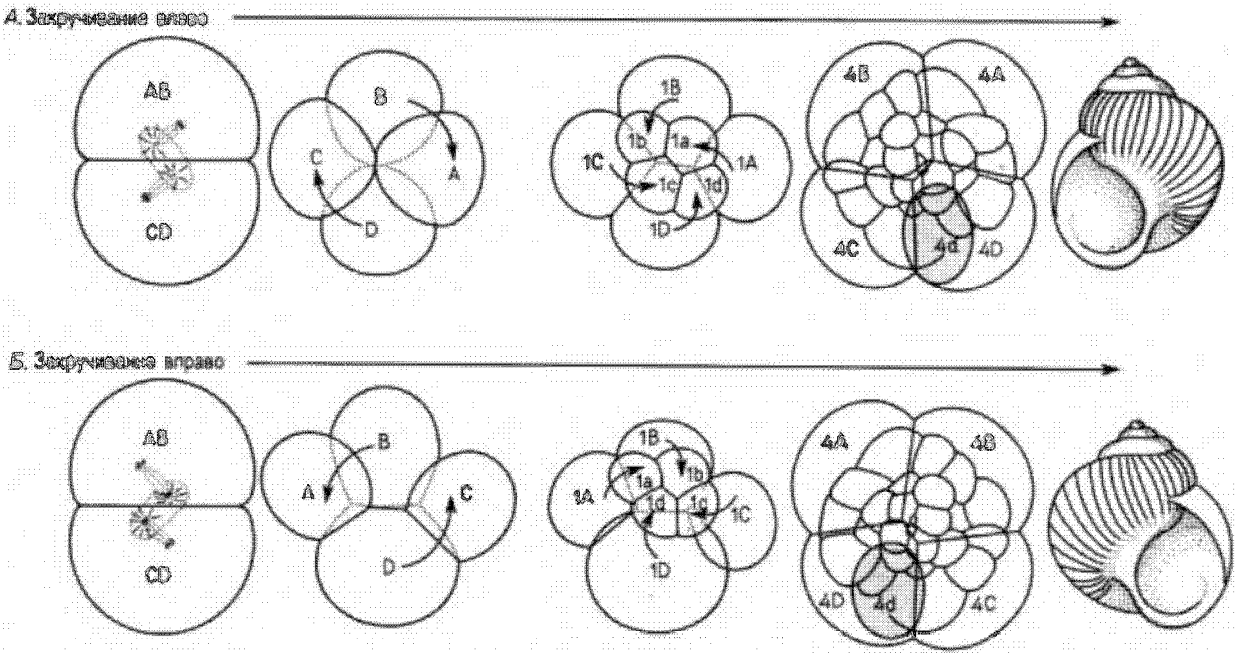


Рис. 3.16. Правозакрученная и левозакрученная улитки (вид со стороны анимального полюса). Направление закручивания раковины направо или налево может быть определено по ориентации митотического веретена на стадии второго деления. Левозакрученная (*А*) и правозакрученная (*Б*) улитки развиваются как зеркальное отражение одна другой. (По Morgan, 1927.)

имеется «правовращающий» аллель (*D*), доминантный по отношению к «левовращающему» (*d*). Однако направление смещения бластомеров при дроблении определяется не генотипом развивающейся улитки, а генотипом ее матери. Самка улитки *dd* может производить только левозакрученных потомков, даже если они имеют генотип *Dd*. Таким образом, особь *Dd* будет леотропной или декситропной в зависимости от материнского генома.

Скрещивания дают следующие результаты:

DD (самка) × *dd* (самец) → *Dd* (все правозакрученные)

DD (самец) × *dd* (самка) → *Dd* (все левозакрученные)

Dd × *Dd* → 1*DD* : 2*Dd* : 1*dd* (все правозакрученные)

Приведенные данные свидетельствуют о том, что генетические факторы, обусловливающие направление закручивания раковины у улиток, передаются зародышу через цитоплазму ооцита. Направление смещения бластомеров при дроблении определяется генотипом яичника, в котором развивается ооцит. Если в яйца матерей *dd* инъецировали небольшое количество цитоплазмы от декситропных улиток (Freeman, Lundelius, 1982), то развивавшиеся зародыши оказывались правозакрученными. Цитоплазма от леотропных улиток не влияла на декситропных зародышей. Это подтверждает представление, согласно которому матери дикого типа передают яйцам какой-то фактор, который у матерей *dd* отсутствует или дефектен.

Дополнительные сведения и гипотезы

Адаптация путем изменения процесса дробления зародыша

Эволюция осуществляется в результате наследственных изменений эмбрионального развития. (Когда мы говорим, что современная трехпалая лошадь произошла от пятипалого предка, мы имеем в виду, что в ходе эволюции лошади процесс закладки костей у зародыша претерпел изменения, и это привело к возникновению трехпалого организма.) Иногда мы можем установить, какая именно моди-

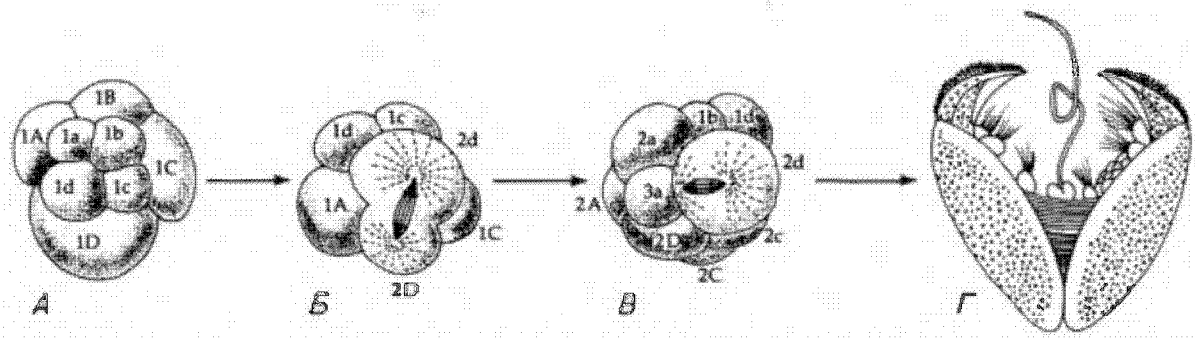


Рис. 3.17. Образование личинки моллюсков глохидия путем модификации спирального дробления. После того как сформировался 8-клеточный зародыш (*А*), положение митотического веретена приводит к тому, что бо́льшая часть цитоплазмы бластомера 1D попадает в бластомер 2d (*Б*). Крупный бластомер 2d делится (*В*) и в конечном счете образует массивную раковину личинки, построенную по типу «медвежьего капкана» (*Г*).

фикация морфогенеза позволила особи выжить в условиях, которые, не произойди такое изменение, были бы для нее крайне неблагоприятными. Одна из модификаций такого рода, открытая Фрэнком Лилли (Lillie, 1898), заключается в изменении типичного хода спирального дробления в семействе двустворчатых моллюсков Unionidae.

В отличие от большинства двустворчатых моллюсков *Unio* и родственные формы живут в реках с быстрым течением. Такие условия обитания обычно создают проблему расселения личинок: поскольку взрослые особи ведут оседлый образ жизни, свободноплавающие личинки должны были бы всегда сноситься течением вниз. Эти моллюски, однако, решили проблему расселения, осуществив два изменения в своем развитии. Первое из них касается дробления зародыша. При типичном для моллюсков дроблении либо все макромеры имеют одинаковые размеры, либо бластомер 2D является самой крупной клеткой на стадии 16 бластомеров. Однако в процессе дробления яиц *Unio* при переходе к этой стадии наибольшее количество цитоплазмы получает бластомер 2d (рис. 3.17). Эта клетка делится, и ее потомки образуют бо́льшую часть структур личинки, в том числе железу, способную образовать массивную раковину. Такая личинка (называемая глохидием) напоминает медвежий капкан в миниатюре. Глохидии имеют чувствительные волоски, которые вызывают захлопывание створок раковины, как только они прикоснутся к жабрам или плавникам проплывающей мимо рыбы. Глохидии занимаются «хич-хайкингом» (от англ. hitch-hike — путешествовать бесплатно на попутных машинах) с помощью рыбы, пока не достигнут стадии, на которой они готовы отделиться и метаморфизировать во взрослых моллюсков. Таким способом они могут расселяться вверх по течению.

У некоторых видов глохидии высвобождаются из выводковой камеры самки и просто ожидают, чтобы рыба подплыла близко к ним. Некоторые другие виды, как, например, *Lampsilis ventricola*, повысили вероятность встречи личинок с рыбой, осуществив еще одну модификацию развития (Welsh, 1969). У многих моллюсков развивается тонкая мантия, которая колышется около раковины и окружает выводковую камеру (marsupium). У некоторых унионид форма выводковой камеры и волнообразные движения мантии создают впечатление плывущей рыбы. Чтобы сделать иллюзию более полной, у них развивается черное «пятно-глаз» на одном конце и выступающий «хвост» на другом. «Рыба», которую мы видим на рис. 3.18, на самом деле не рыба, а выводковая ка-

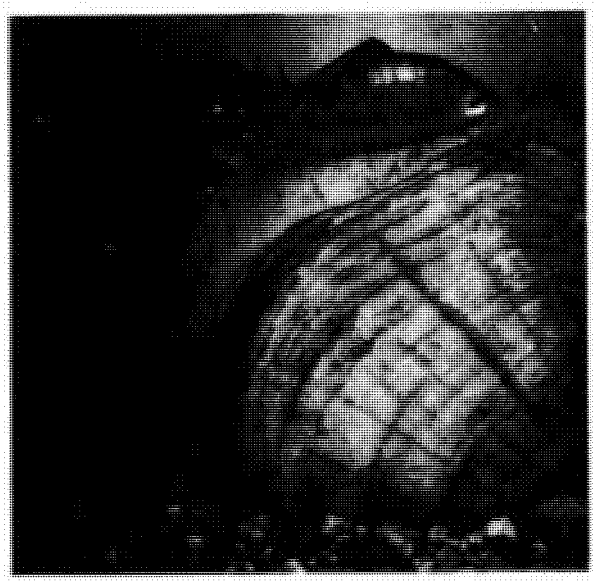


Рис. 3.18. Имитация «рыбы» у двустворчатого моллюска из семейства Unionidae *Lampsilis ventricosa*. На самом деле «рыба» является выводковой камерой и мантией моллюска. (Фотография с любезного разрешения J. H. Welsh.)

мера и мантия моллюска, находящегося внизу. Когда соблазненная видом «добычи» хищная рыба подплывает достаточно близко, моллюск выбрасывает глохидии из выводковой камеры.

Изменив таким образом ход развития, моллюски из семейства Unionidae сумели выжить в условиях, которые без таких модификаций были бы для них неблагоприятными.

При изучении дробления у моллюсков было сделано еще одно интереснейшее открытие, а именно что некоторые бластомеры сообщаются между собой. У моллюсков, имеющих на 4-клеточной стадии бластомеры одинаковых размеров, определение того, какой из них даст начало клетке-предшественнице мезодермы, происходит между пятым и шестым делениями. В это время макромер 3D образует направленное внутрь выпячивание, которое приходит в контакт с микромерами анимального полюса. Без такого контакта бластомер 4d, отделяемый макромером 3D, не образует мезодермы (Biggelaar, Guerrier, 1979)[1]. Де Лаат и др. (de Laat et al., 1980) показали, что в то время, когда осуществляется контакт (но не раньше), между макромером 3D и центральными микромерами может происходить обмен молекулами небольших размеров. Эти исследователи инъецировали в один из макромеров краситель люцифер желтый (молекулярная масса 457). При введении красителя до 32-клеточной стадии он остается в этом единственном макромере и его потомках. Однако при инъекции красителя в бластомер 3D в начале 32-клеточной стадии в желтый цвет окрашивается первый квартет микромеров (рис. 3.19). Низкомолекулярное вещество передается от одной клетки к другой именно в то время, когда микромеры изменяют проспективные потенции бластомера 3D. Исследование с помощью просвечивающего электронного микроскопа показывает, что в это время на поверхности клеток появляются **щелевые контакты**. Такие изменения плазматической мембраны облегчают межклеточный обмен небольшими молекулами и ионами, и они встречаются во многих тканях как зародышей, так и взрослых организмов. (Ультраструктура этих контактов будет рассмотрена в гл. 15.)

Билатеральное голобластическое дробление

Билатеральное голобластическое дробление встречается главным образом у асцидий (оболочники). На рис. 3.20 представлены стадии дробления у асцидии *Styela partita*. Наиболее замечательная особенность этого типа дробления заключается в том, что плоскость первого деления устанавливает единственную плоскость симметрии зародыша. Каждое последующее деление ориентируется по отношению к этой плоскости симметрии, так что половина зародыша по одну сторону от первой борозды представляет собой зеркальное отражение половины зародыша по другую ее сторону. Второе деление так же, как и первое, меридиональное, но в отличие от

[1] Не думайте, что мы забыли о зародышах моллюсков, у которых на 4-клеточной стадии бластомеры различаются по размерам. Им будет уделено достаточно внимания в гл. 7.

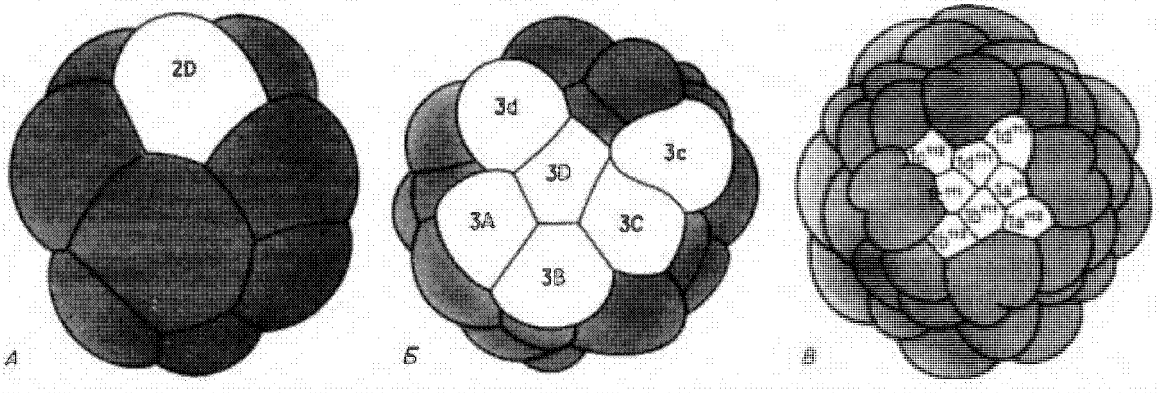


Рис. 3.19. Межклеточные связи при дроблении у моллюсков. На схематических рисунках показано, насколько широко распространяется краситель люцифер желтый (белая область) после инъекции в определенные макромеры у *Patella vulgata*. *А*. Положение метки через 20 мин после инъекции в 2D-макромер 16-клеточного зародыша свидетельствует о том, что краситель не переходит в соседние клетки. *Б*. Вид 32-клеточного зародыша с вегетативной стороны после инъекции красителя в 3D макромер; видно, что краситель перешел в соседние клетки (за исключением 2d[32]). *В*. Вид того же зародыша со стороны анимального полюса приблизительно через 45 мин после инъекции; краситель перешел из макромера 3D в центральную группу анимальных микромеров. (По de Laat et al., 1980.)

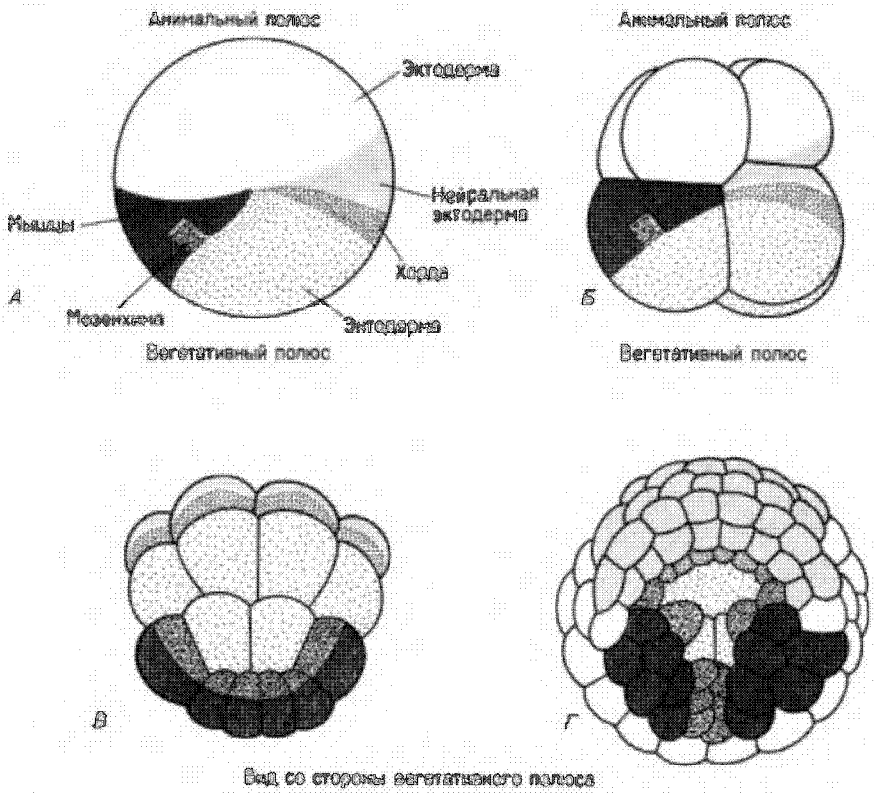


Рис. 3.20. Билатеральная симметрия яйца оболочника. *А*. Недробящееся яйцо. *Б*. 8-клеточный зародыш; изображены бластомеры и указана судьба различных клеток. Этот зародыш можно рассматривать как две 4-клеточные половины, начиная с этой стадии, каждое деление на правой стороне зародыша имеет зеркальное отражение слева. *В, Г*. Зародыши на более поздних стадиях (вид со стороны вегетативного полюса). (Области цитоплазмы, предназначенные для формирования отдельных органов, на всех рисунках обозначены одинаково.) (По Balinsky, 1981.)

первого борозды не проходят через центр яйца. В результате этого деления возникают две крупные передние клетки (A и D) и две задние меньшего размера (B и C). На каждой стороне теперь имеются один крупный и один небольшой бластомер. При трех последующих делениях различия в размерах и форме бластомеров подчеркивают билатеральную симметрию зародышей. На 32-клеточной стадии формируется небольшой бластоцель, и начинается гаструляция.

Как указывалось в предыдущей главе, у некоторых оболочников, как, например, у *S. partita*, в яйце имеются окрашенные области цитоплазмы. Эти окрашенные области распределены в соответствии с билатеральной симметрией зародыша по обе стороны от плоскости симметрии. При дроблении они распределяются между разными клетками. Существенно, что тип цитоплазмы, который получают клетки, предопределяет их окончательную судьбу. Клетки, в которые попадает светлая цитоплазма, образуют эктодерму; те, которые получают желтую цитоплазму, дают начало мезодермальным клеткам; клетки с серо-голубыми включениями становятся энтодермой, а с материалом светло-серого серпа образуют нервную трубку и хорду.

Чередующееся (rotational) голобластическое дробление

Неудивительно, что труднее всего изучать дробление у млекопитающих. Яйца млекопитающих относятся к числу самых мелких в животном царстве, что делает затруднительной экспериментальную работу с ними. Диаметр зиготы человека, например, составляет всего лишь 100 мкм, и ее объем меньше одной тысячной объема яйца шпорцевой лягушки. Кроме того, по количеству зигот, которые могут быть получены от одной особи, млекопитающие несравнимы с морскими ежами или лягушками. Обычно у самки млекопитающего одновременно овулирует менее 10 яиц, так что получить достаточное количество материала для биохимических исследований весьма затруднительно. И последняя трудность заключается в том, что развитие млекопитающих происходит в организме матери, а не во внешней среде. Только недавно появилась возможность воспроизводить некоторые из условий, имеющихся в организме, и наблюдать за развитием зародыша in vitro.

Преодоление всех этих трудностей для изучения дробления млекопитающих было оправданно, так как оказалось, что этот процесс резко отличается от того, как делится большинство эмбриональных кле-

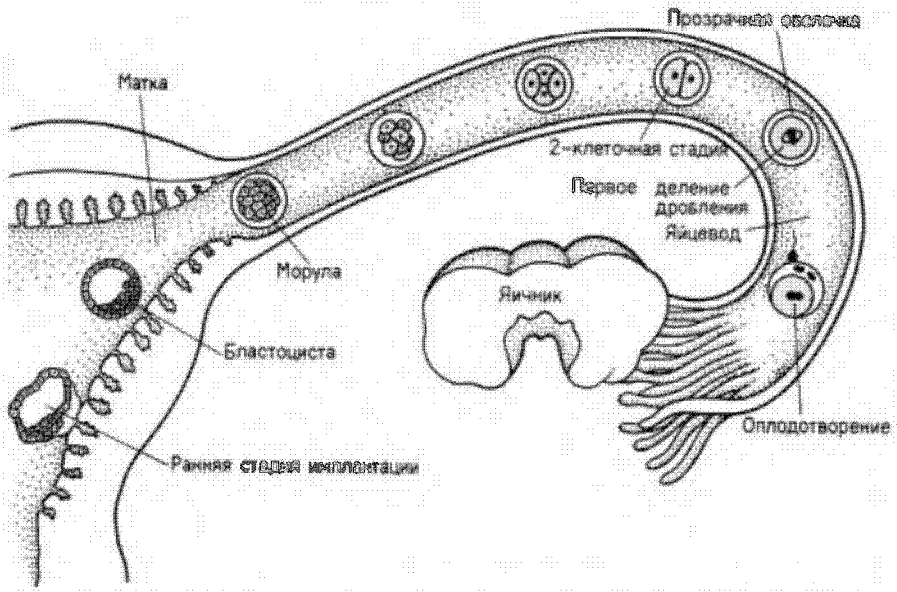


Рис. 3.21. Развитие зародыша человека от оплодотворения до имплантации. Яйцо освобождается от прозрачной оболочки (zona pellucida) по достижении матки. Эта оболочка, вероятно, предотвращает прилипание делящихся клеток к стенке яйцевода, и не тормозит продвижение зародыша к матке. (По Tuchmann-Duplessis et al., 1972.)

ток. Ооцит млекопитающих, высвобождаясь из яичника, попадает в яйцевод (рис. 3.21). Оплодотворение происходит в ампуле яйцевода — его отделе, расположенном вблизи яичника. В это время мейоз завершается, и приблизительно через сутки начинается первое деление дробления.

Деления дробления у млекопитающих относятся к числу самых медленных, встречающихся в животном царстве. Каждое из них продолжается от 12 до 24 ч. Тем временем реснички слизистой яйцевода продвигают зародыш по направлению к матке; первые деления происходят в время перемещения яйца по яйцеводу.

Дробление у млекопитающих отличается от других типов дробления по многим признакам. Первая его особенность заключается в относительно медленном темпе делений. Второе важное отличие состоит в своеобразном расположении бластомеров относительно друг друга. Первое деление представляет собой нормальное меридиональное деление; однако при втором делении один из двух бластомеров делится меридионально, а второй — экваториально (рис. 3.22). Этот тип дробления был назван **чередующимся** (rotational) (Gulyas, 1975).

Третьим важным отличием дробления у млекопитающих является выраженная асинхронность раннего дробления. Бластомеры у млекопитающих не делятся все одновременно, поэтому у зародышей не происходит равномерного нарастания числа бластомеров от 2-клеточной к 4- и 8-клеточным стадиям; зародыши часто содержат нечетное число клеток.

Компактизация

Быть может, самое важное отличие дробления у млекопитающих от всех других типов дробления заключается в явлении **компактизации**. Как видно из рис. 3.23, бластомеры млекопитающего на 8-

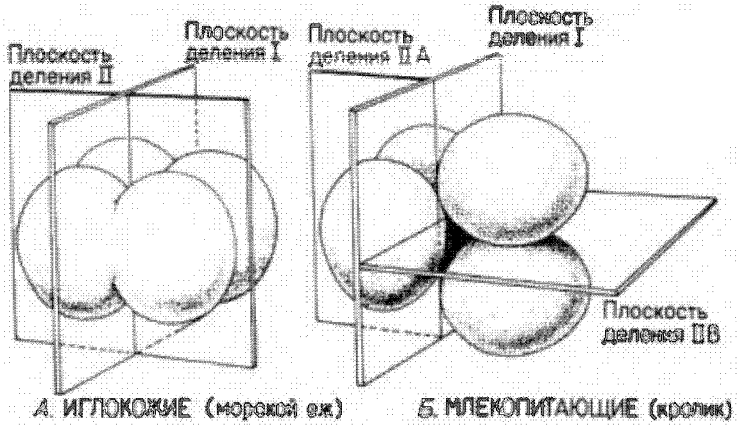


Рис. 3.22. Сравнение ранних стадий дробления у иглокожих (*А*) и млекопитающих (*Б*). (По Gulyas, 1975.)

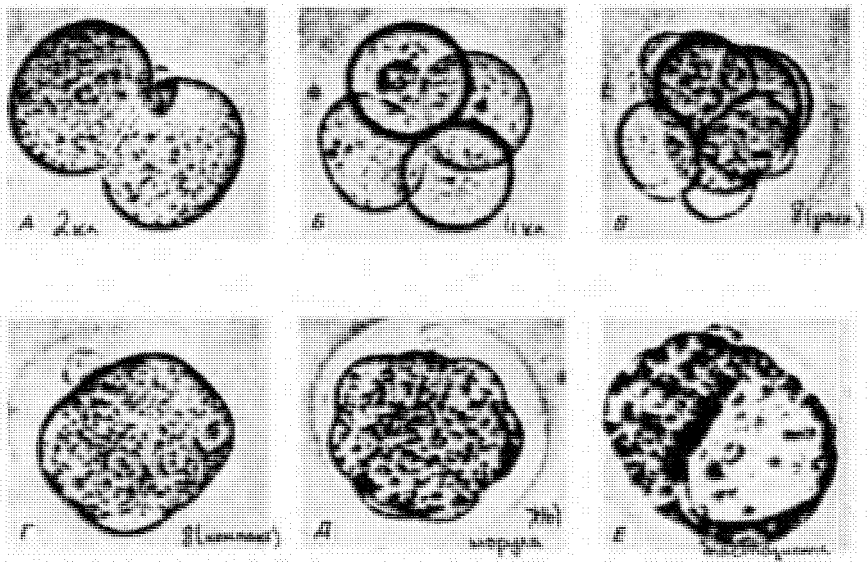


Рис. 3.23. Дробление зародыша мыши in vitro. *А* — 2-клеточная, *Б* — 4-клеточная и *В* — ранняя 8-клеточная стадии; *Г* — компактная 8-клеточная стадия; *Д* — морула; *Е* — бластоциста. (Из Mulnard, 1967; фотографии с любезного разрешения J. G. Mulnard.)

клеточной стадии располагаются рыхло, между ними остаются большие пространства. Однако после третьего деления поведение бластомеров резко изменяется. Они внезапно сближаются, площадь контакта между ними максимально увеличивается, и они образуют компактный клеточный шар (рис. 3.24). Эта тесная упаковка стабилизируется плотными контактами, которые образуются между клетками, расположенными на поверхности шара, и изолируют лежащие внутри клетки (рис. 3.25). Между клетками внутри шара возникают щелевые контакты, которые позволяют малым молекулам и ионам переходить из клетки в клетку.

Клетки компактизированного зародыша делятся и образуют 16-клеточную морулу. Такая морула состоит из небольшого числа внутренних клеток, окруженных более многочисленными наружными клетками (Barlow et al., 1972). Бóльшая часть потомков наружных клеток становится клетками **трофобласта** (или **трофэктодермы**). Эта группа клеток не образует эмбриональных структур, а превращается в хорион, участвующий в образовании плаценты. Ткани плаценты обеспечивают получение плодом кислорода и питательных веществ от матери; секретируют гормоны, необходимые для того, чтобы материнская матка продолжала вынашивать плод; синтезируют регуляторы иммунного ответа, благодаря которым мать не отторгает зародыш, как это произошло бы с пересаженным органом. Однако клетки трофобласта неспособны образовать ни одной клетки самого

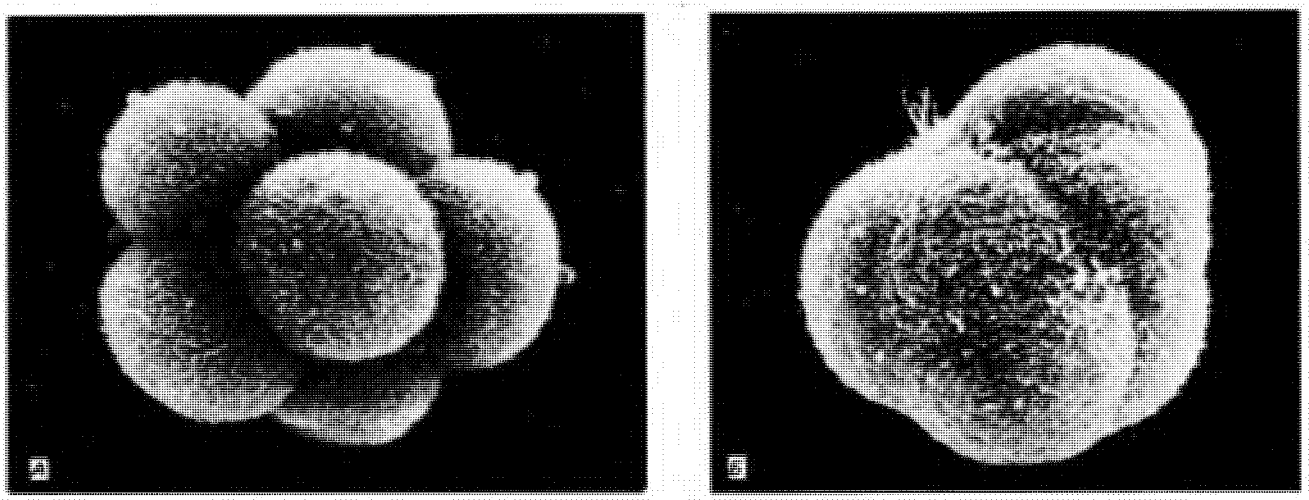


Рис. 3.24. 8-клеточный зародыш мыши до (*А*) и после (*Б*) компактизации. Микрофотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Фотографии с любезного разрешения C. Ziomek.)

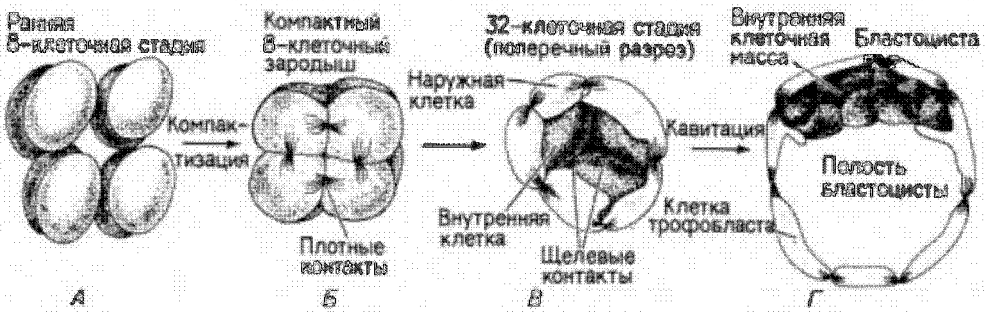


Рис. 3.25. Схематический рисунок компактизации и образования бластоцисты. *А*, *Б*. 8-клеточный зародыш. *В*. Морула. *Г*. Бластоциста.

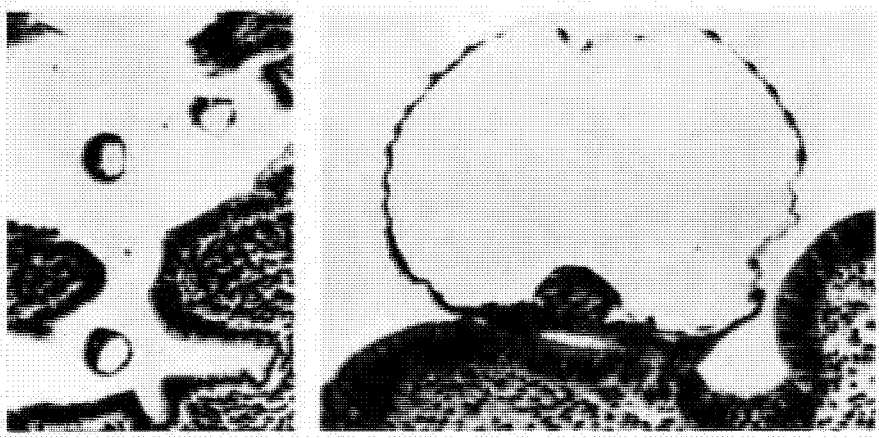


Рис. 3.26. Имплантация бластоцисты млекопитающего в матке. *А*. Бластоцисты мыши, входящие в матку. *Б*. Начальная стадия имплантации бластоцисты в стенку матки у макака-резуса. (*А* — из Rugh, 1967; *Б* — фотография Chester Reather, с любезного разрешения Института Карнеги в Вашингтоне.)

зародыша. Они необходимы для **имплантации** зародыша в стенку матки (рис. 3.26).

Зародыш формируется потомками внутренних клеток 16-клеточного зародыша, к которым иногда добавляется клетка, отделившаяся от трофобласта при переходе к 32-клеточной стадии (Pederson et al., 1986; Fleming, 1987). Эти клетки образуют **внутреннюю клеточную массу** (ВКМ), которая и дает начало зародышу. Клетки ВКМ отличаются от клеток трофобласта не только по своему виду, но и по спектру белков, которые они синтезируют на этой ранней стадии. К стадии 64 клеток внутренняя клеточная масса и клетки трофобласта превращаются в полностью сформированные клеточные слои, ни один из которых не поставляет клеток другой группе (Dyce et al., 1987). Таким образом, возникновение различий между бластомерами трофобласта и внутренней клеточной массы является первым процессом дифференцировки в развитии млекопитающих.

Первоначально морула не имеет внутренней полости. Однако в процессе так называемой **кавитации** клетки трофобласта секретируют в морулу жидкость, что приводит к образованию полости бластоцисты. Внутренняя клеточная масса располагается на одной стороне стенки полого шара, образованного клетками трофобласта (рис. 3.25 и 3.26). Эта структура называется **бластоцистой**, и ее образование является еще одной отличительной особенностью дробления млекопитающих.

Дополнительные сведения и гипотезы

Клеточная поверхность и механизм компактизации

Компактизация создает условия, обеспечивающие первый шаг в процессе дифференцировки в развитии млекопитающих, а именно отделение трофобласта от внутренней клеточной массы. Как это происходит? Появляется все больше данных о том, что компактизация связана с явлениями, происходящими на клеточных поверхностях соседних бластомеров.

Во-первых, до компактизации у каждого из восьми бластомеров наблюдаются далеко идущие изменения плазматической мембраны, известные под на-

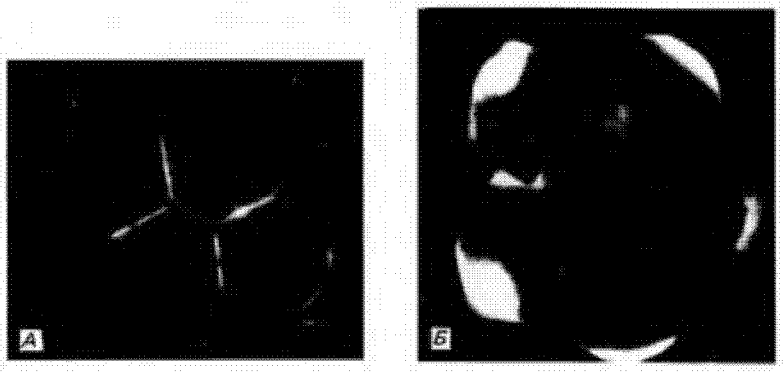


Рис. 3.27. Поляризация компонентов плазматической мембраны в бластомерах 8-клеточного зародыша мыши. *А*. Гомогенное неполярное распределение компонентов мембраны, меченных флуоресцентным конканавалином А на 4-клеточной стадии. *Б*. Гетерогенное полярное распределение этих компонентов на 8-клеточной стадии. (*А* — из Fleming et al., 1986; *Б* — из Levy et al., 1986; фотографии с любезного разрешения авторов.)

званием **поляризации**. Разные компоненты клеточной поверхности мигрируют в разные области клетки (Ziomek, Johnson, 1980). Это можно обнаружить, пометив определенные молекулы на клеточной поверхности флуоресцентными красителями. Мечение одним таким красителем, узнающим класс гликопротеинов, показывает, что на 4-клеточной стадии эти гликопротеины беспорядочно распределены по всей плазматической мембране (рис. 3.27, *А*). Однако на стадии незавершенного третьего деления меченые молекулы обнаруживаются преимущественно на полюсах бластомеров, наиболее удаленных от центра агрегата (рис. 3.27, *Б*). Это перемещение является, по-видимому, результатом межклеточных взаимодействий, так как оно наблюдается при выделении из зародыша двух связанных между собой бластомеров, но не бластомеров, изолированных поодиночке.

Во-вторых, в процессе компактизации участвуют специфические белки клеточной поверхности. Клетки опухоли, называемой тератокарциномой, сходны с клетками внутренней клеточной массы. При инкубации 8-клеточных мышиных зародышей в антисыворотке к стволовым клеткам тератокарциномы компактизация подавляется (рис. 3.28) (Kemler et al., 1977; Johnson et al., 1979). Таким образом, в клетках тератокарциномы и в бластомерах 8-клеточного зародыша имеется молекула (или молекулы), которая необходима для того, чтобы произошла компактизация. Одной такой молекулой является **увоморулин** — гликопротеин с молекулярной массой 120 000 дальтон, который обнаруживается на плазматической мембране клеток этих двух типов. Антитела к молекуле увоморулина вызывают декомпактизацию морулы и подавляют прикрепление клеток тератокарциномы друг к другу (Hyafil et al., 1981; Peyrieras et al., 1983). При осуществлении функции этого гликопротеина важную роль играет углеводная часть молекулы, поскольку **туникамицин** (вещество, подавляющее гликозилирование белков) также предотвращает компактизацию.

В-третьих, плазматическая мембрана при компактизации может также изменяться вследствие реорганизации цитоскелета. На соседних клеточных поверхностях в результате образования актиновых микрофиламентов возникают микроворсинки, прикрепляющие клетки друг к другу. Именно на микроворсинках, по-видимому, функционирует увоморулин как медиатор межклеточной адгезии. Уплощение поверхностей соседних бластомеров в месте их контакта может вызываться укорочением микроворсинок путем деполимеризации актина (Pratt et al., 1982; Sutherland, Calarco-Gillam, 1983). Таким образом, представление, что причиной компактизации являются изменения архитектоники поверхности бластомеров, получает все больше подтверждений.

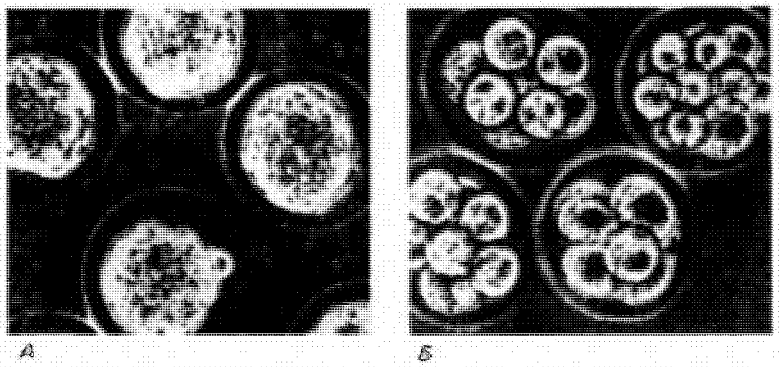
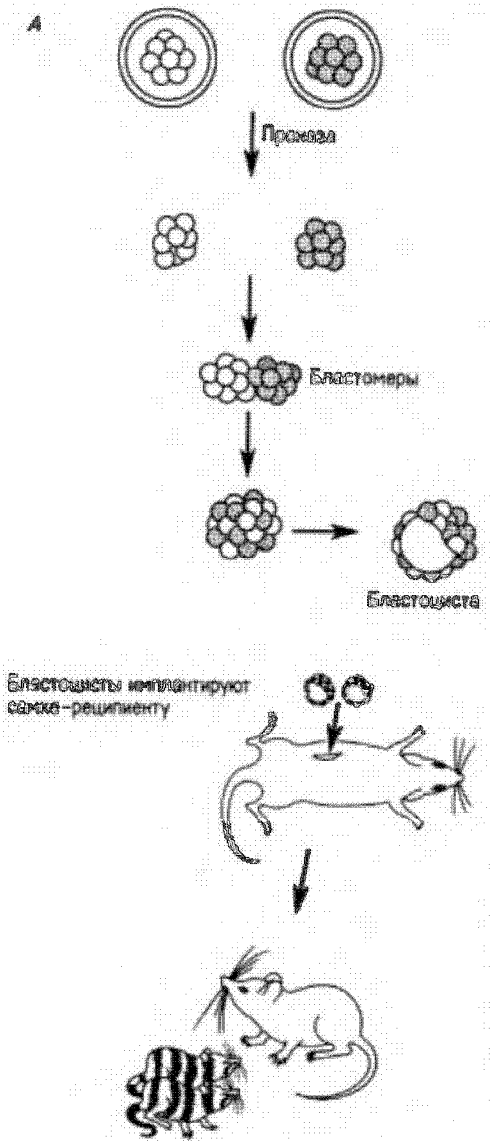


Рис. 3.28. Предотвращение компактизации с помощью антисыворотки к стволовым клеткам тератокарциномы. *А*. Нормальная компактизация в отсутствие сыворотки. *Б*. Пролиферация без компактизации в присутствии антител к стволовым клеткам тератокарциномы. (Фотографии с любезного разрешения С. Ziomek.)

Образование внутренней клеточной массы

Возникновение внутренней клеточной массы, отличающейся от трофобласта, является *важнейшим* событием в раннем развитии млекопитающих. Каким образом развитие клетки направляется по тому или другому из этих двух путей? Каким образом клетка получает информацию о том, что она должна участвовать в образовании организма взрослого млекопитающего или вспомогательной ткани, которая отбрасывается при рождении? Наблюдения, проведенные на живых зародышах, позволяют предположить, что это важное решение является просто результатом того, что в определенное время клетка оказывается в соответствующем месте. До завершения 8-клеточной стадии разные бластомеры явно не отличаются друг от друга по биохимии, морфологии или потенциям. Тем не менее компактизация приводит к образованию внутренних и наружных клеток, глубоко различающихся по своим свойствам. Путем маркировки разных бластомеров в многочисленных исследованиях было показано, что клетки, оказавшиеся снаружи, формируют трофобласт, тогда как клетки, оказавшиеся внутри, образуют зародыш (Tarkowski, Wróblewska, 1967)[1]. Если любой бластомер 4-клеточного зародыша мыши поместить на наружную поверхность рыхлой массы бластомеров другого зародыша, то из пересаженной клетки разовьется только ткань трофобласта (Hillman et al., 1972). Следовательно, будет ли клетка участвовать в образовании трофобласта или зародыша, определяется, по-видимому, тем, где оказалась клетка после компактизации — на поверхности или внутри зародыша.

Если большинство клеток бластоцисты дает начало трофобласту, то сколько же клеток фактически образует зародыш? Один из путей для получения ответа на этот вопрос заключается в создании аллофенных мышей. Аллофенные мыши являются результатом развития химерных зародышей, полученных путем слияния двух зародышей на ранних стадиях дробления (обычно 4- или 8-клеточных). Как показано на рис. 3.29, у двух генетически различаю-



[1] Установлено, что внутренние клетки чаще всего происходят от того бластомера, который на 2-клеточной стадии делится первым. Потомки этого бластомера обычно первыми достигают 8-клеточной стадии и делятся таким образом, что оказываются внутри рыхлого скопления бластомеров (Graham, Kelly, 1977).

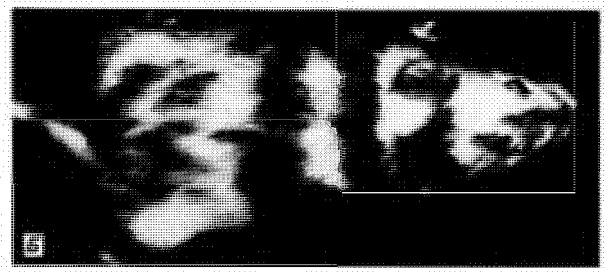


Рис. 3.29. Получение аллофенных мышей. *А*. Экспериментальные приемы, используемые для получения аллофенных мышей. Ранних 8-клеточных зародышей генетически различных линий мышей (в данном случае — линий с различной окраской шерсти) извлекают из яйцеводов и приводят в контакт, предварительно удалив прозрачную оболочку с помощью протеолитических ферментов (проназы). Клетки образуют химерную бластоцисту, которую экспериментатор имплантирует в матку самки-реципиента. *Б*. Взрослая аллофенная мышь, фенотип которой свидетельствует о вкладе зародышей пигментированной (черной) и непигментированной (белой) линий. (Фотографии с любезного разрешения B. Mintz.)

шихся зародышей удаляют прозрачную оболочку и зародышей приводят в контакт для их слияния и образования единой бластоцисты. Полученные бластоцисты имплантируют в матку самки-реципиента. Рождающиеся аллофенные мыши содержат клетки, которые произошли от обоих зародышей. Это хорошо видно в случаях, когда агрегированные бластомеры принадлежат мышам разных линий, отличающихся друг от друга по окраске шерсти. Когда агрегируют бластомеры белых и черных мышей, обычно развивается мышь с черными и белыми полосами (рис. 3.29, *Б*). Если бы зародыш развивался только из одной клетки бластоцисты, то такой результат не мог быть получен: потомки были бы либо белыми, либо черными. Если бы в образовании зародыша участвовали две клетки бластоцисты, то следовало бы ожидать, что аллофенный рисунок будет выражен только в половине случаев (1WW : 2WB : 1BB). Если бы зародыш формировали три клетки, то вероятность появления аллофенного рисунка возросла бы до 75% (1WWW : 3WWB : 3WBB : 1BBB); при наличии четырех таких клеток вероятность появления двухцветных мышей составила бы 87,5%. Согласно экспериментальным данным (Mintz, 1970), 73% химерных зародышей развивается в аллофенных мышей, что свидетельствует об участии трех бластомеров бластоцисты в образовании всего зародыша. Было также показано (Markert, Petters, 1978), что три 4-клеточных зародыша могут слиться и образовать общую компактную морулу (рис. 3.30 и цветной рисунок на внутренней стороне обложки). Из такой морулы может развиться мышь, покровы которой имеют участки, окрашенные в цвета трех разных линий. Таким образом, хотя и нет полной уверенности в том, что абсолютное число бластомеров, образующих зародыш, равно 3, очевидно, что оно не намного превышает эту величину и что большая часть клеток бластоцисты никогда не участвует в формировании взрослого организма.

Освобождение от прозрачной оболочки

В то время, когда зародыш перемещается по яйцеводу по направлению к матке, бластоциста увеличивается в объеме. В плазматических мембранах клеток трофэктодермы имеется натриевый насос (Na^+/K^+-АТФаза), который переносит ионы натрия в центральную полость. Такое накопление ионов натрия вызывает поступление в полость воды осмотическим путем, в результате чего размеры полости бластоцисты увеличиваются (Borland, 1977; Wiley, 1984). В период перемещения зародыша большое значение имеет тот факт, что прозрачная оболочка предотвращает прилипание бластоцисты к стенкам яйцевода. Когда у человека такое прилипание происходит, наблюдается «трубная беременность». Это опасное явление, поскольку имплантация зародыша в яйцевод может вызвать угрожающее жизни кровотечение. Однако, когда зародыш достигает матки, он должен освободиться от прозрачной оболочки для того, чтобы прикрепиться к стенке матки.

Бластоциста мыши освобождается от оболочки путем лизиса в ней небольшого отверстия, через которое она выдавливается при увеличении своего объема (рис. 3.31). Гистологические данные свидетельствуют о том, что одна из клеток трофобластической стенки (в части, не прилежащей к внутренней клеточной массе) образует вырост, который приходит в контакт с прозрачной оболочкой. На плазматической мембране этого выроста локализована трипсиноподобная протеаза, **стриппин**, которая лизи-

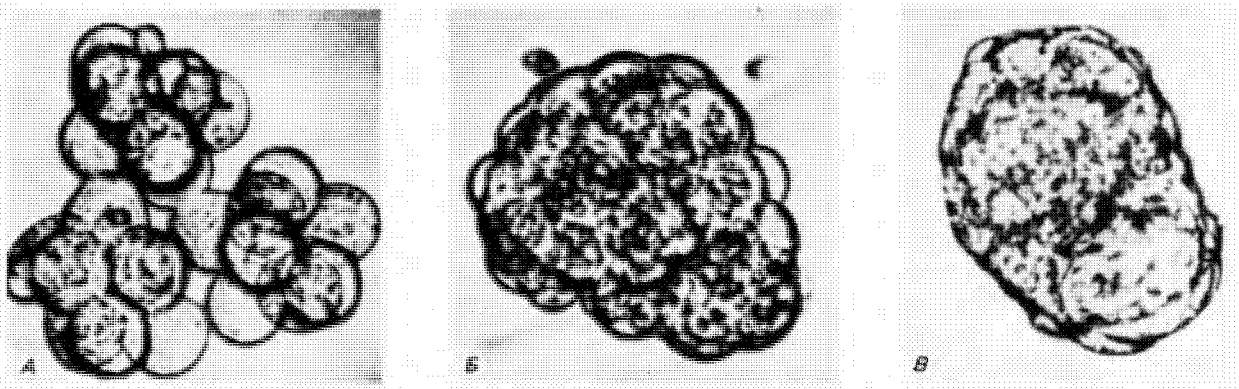


Рис. 3.30. Агрегация и компактизация трех 8-клеточных зародышей мыши, образующих единую компактную морулу. Клетки трех зародышей (*А*) агрегируют в единую морулу (*Б*), которая подвергается компактизации и преобразуется в бластоцисту (*В*). Развившаяся из такой бластоцисты аллофенная мышь представлена на внутренней стороне обложки. (Из Markert, Petters, 1978; фотографии с любезного разрешения С. Markert.)

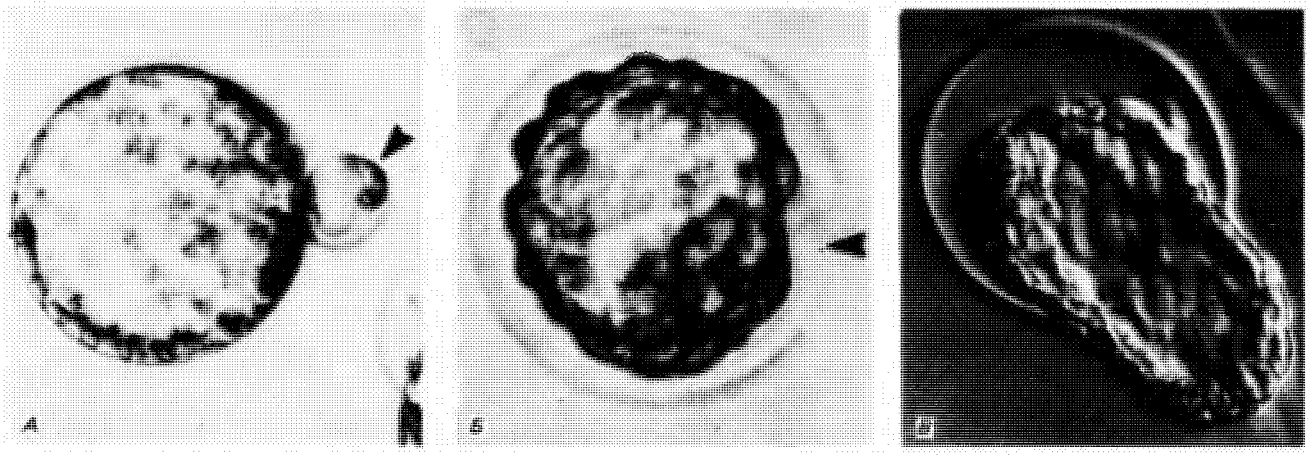


Рис. 3.31. Бластоцисты мыши, освобождающиеся от прозрачной оболочки. *А*. Увеличившаяся в объеме бластоциста с большой полостью и образовавшимся выростом (указан стрелкой). *Б*. Увеличившаяся в объеме бластоциста с одним отверстием (указано стрелкой) в прозрачной оболочке. *В*. Бластоциста, выходящая через отверстие в прозрачной оболочке. *Г*. Пустая прозрачная оболочка после выхода из нее бластоцисты. *Д*. Гистохимическая локализация стриписновой протеазы в стенке трофобласта, удаленной от ВКМ и прилежащей к прозрачной оболочке. Большая стрелка указывает локализацию стриписновой активности, стрелка меньшего размера — положение ВКМ. (*А—В, Д* — из Perona, Wassarman, 1986; *Г* — из Mark et al., 1985; фотографии с любезного разрешения R. Perona и E. Lacy.)

рует отверстие в фибриллярном матриксе оболочки (Perona, Wassarman, 1986).

Освободившись от оболочки, бластоциста может вступить в непосредственный контакт с маткой. Здесь трофобласт будет секретировать другую трипсиноподобную протеазу, активатор плазминогена. Полагают, что этот расщепляющий белок фермент необходим для разрушения ткани матки, чтобы бластоциста могла погрузиться в ее стенку (Strickland et al., 1976).

Дополнительные сведения и гипотезы

Близнецы

Близнецов человека разделяют на две основные группы: монозиготные (однояйцовые, идентичные) и дизиготные (двуяйцовые, неидентичные) близнецы. Дизиготные близнецы развиваются в результате двух независимых процессов оплодотворения, тогда как монозиготные происходят из одного зародыша, клетки которого каким-то образом разделились. Последнее означает, что изолированный бластомер млекопитающего способен образовать целый зародыш. Такое заключение было подтверждено опытом разрушения одного бластомера у 2-клеточного зародыша кролика (Seidel, 1952). Оставшийся бластомер был способен к формированию полноценного взрослого организма. Даже один бластомер 8-клеточного зародыша мыши может успешно развиться в полноценную взрослую особь (Kelly, 1977). Было также показано, что при инъекции клеток внутренней клеточной массы (но не трофобласта) в бла-

стоцисту они способны принимать участие в образовании нового зародыша (Gardiner, Rossant, 1976). Таким образом, идентичные близнецы возникают путем разделения бластомеров на ранних стадиях или даже разделения ВКМ на две части в пределах одной бластоцисты.

По-видимому, именно так оно и происходит при развитии примерно 0,25% детей. Около 33% идентичных близнецов имеют два полноценных независимых хориона, что указывает на разделение зародыша еще до образования ткани трофобласта на 5-е сутки беременности. У оставшихся 67% идентичных близнецов хорион общий; в этих случаях разделение ВКМ произошло, очевидно, после образования трофобласта (рис. 3.32, *А*). К 9 суткам зародыш человека завершает формирование другого внезародышевого образования — **амниона**. Из этой ткани образуется амниотический мешок (или водная оболочка), заполненный амниотической жидкостью, который окружает зародыш и защищает его от обезвоживания и последствий резких движений (гл. 4). Если бы разделение зародыша произошло между образованием хориона на пятые сутки и амниона на девятые, то зародыши должны были бы иметь один хорион и два амниона (рис. 3.32, *Б*). Так обстоит дело приблизительно у двух третей идентичных близнецов. Небольшой процент идентичных близнецов имеет общий хорион и общий амнион (рис. 3.32, *В*). Это означает, что разделение зародыша произошло после 9 сут беременности. Такие новорожденные рискуют оказаться сросшимися между собой («сиамские близнецы»).

Способность образовать целый зародыш из клеток, которые в норме участвовали бы в образовании только его части, называется **регуляцией**. Подробнее это явление будет рассмотрено в гл. 8. Регуляцией является также способность двух и большего числа ранних зародышей образовать одну аллофенную мышь, а не двойню, тройню или многоголового урода. Имеются данные в пользу того, что аллофенная

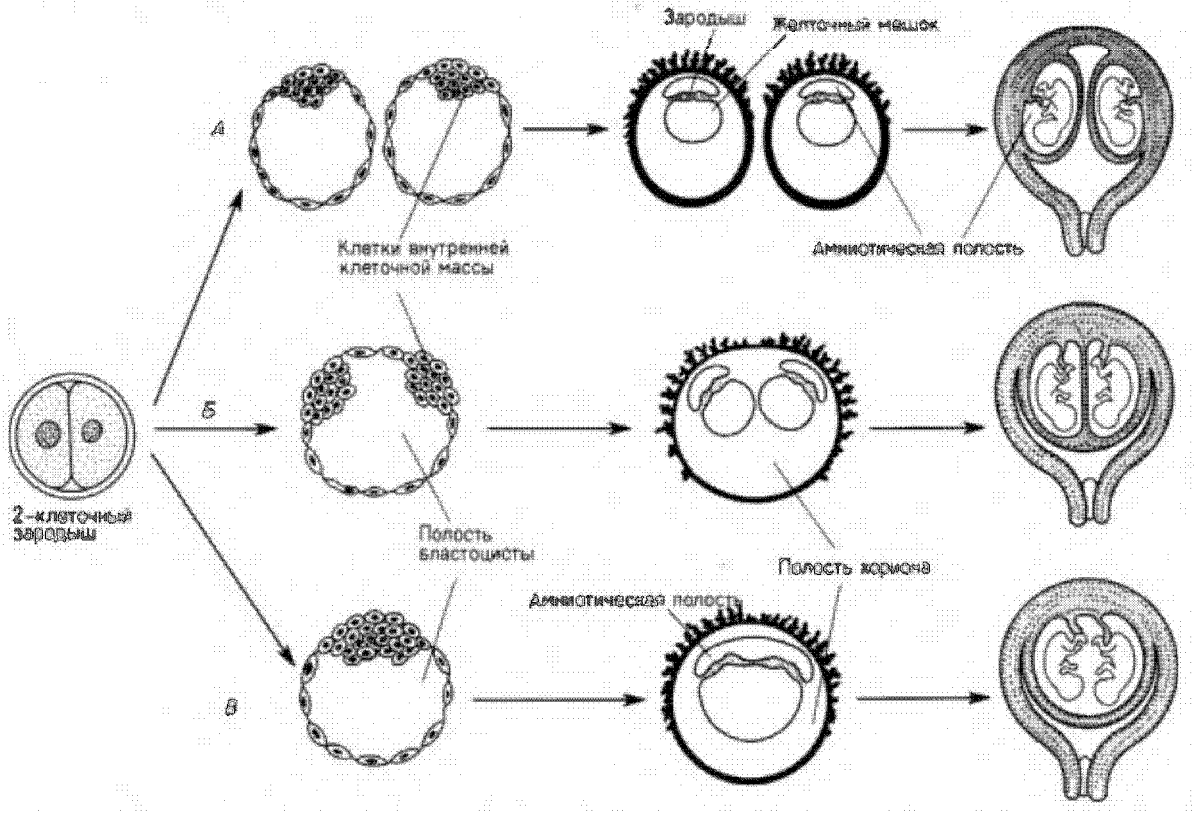


Рис. 3.32. Схематический рисунок, иллюстрирующий зависимость между временем разделения зародыша человека, приводящего к образованию монозиготных (идентичных, однояйцовых) близнецов, и их взаимоотношением с зародышевыми оболочками. *А*. Разделение происходит до образования трофэктодермы; при этом каждый из близнецов имеет собственные хорион и амнион. *Б*. Разделение происходит после образования трофэктодермы, но до образования амниона; в результате каждый из близнецов имеет собственный амниотический мешок, но хорион у них общий. *В*. При разделении после образования амниона близнецы находятся в общем амниотическом мешке и имеют общий хорион. (По Langman, 1981.)

регуляция может происходить и у человека (Chappelle et al., 1974; Mayr et al., 1979). Описаны индивидуумы, в организме которых имеются клетки двух разных генетических типов (XX и XY), каждый из которых обладает собственным набором генетических характеристик. Самое простое объяснение существования такого явления заключается в том, что эти индивидуумы возникли в результате слияния двух зародышей мужского и женского пола, которые развивались одновременно. Если такое объяснение правильно, то в этих случаях два близнеца, брат и сестра, слились для образования одной химерной особи.

Меробластические типы дробления

Как уже упоминалось в этой главе, количество желтка играет важную роль в дроблении яйца. Нигде это не выступает с большей очевидностью, чем при меробластических типах дробления. Здесь большое количество желтка препятствует разделению всей цитоплазмы яйца, за исключением небольшой ее части. **При дискоидальном дроблении** клеточные деления ограничены небольшим диском свободной от желтка цитоплазмы, располагающимся над желточной массой; **при поверхностном дроблении** яиц с желтком, расположенным в центре, деление возможно только в периферическом слое цитоплазмы.

Дискоидальное дробление

Дискоидальное дробление характерно для рыб, птиц и рептилий. На рис. 3.33 представлено дробление яйца птицы. Бо́льшая часть объема яйца занята желтком, так что дробление происходит только в области бластодиска у анимального полюса яйца. Поскольку деления дробления не распространяются на богатую желтком цитоплазму, на ранних стадиях дробления клетки у своего основания не отделены друг от друга. В результате экваториальных делений образуется однослойная **бластодерма**, затем она преобразуется в трех- или четырехслойный клеточный пласт. Между бластодермой и желтком имеется пространство, называемое **подзародышевой полостью**. На этой стадии четко различимы две области бластодиска: **светлое поле** (area pellucida), соответствующее той его части, которая располагается над полостью, и **темное поле** (area opaca), состоящее из клеток, расположенных по краю бластодиска и прилежащих к желтку.

К тому времени, когда курица откладывает яйцо, бластодерма содержит около 60 000 клеток. Некоторые из этих клеток выселяются в подзародышевую полость, где образуют второй слой (рис. 3.34). Таким образом, вскоре после откладки в яйце курицы имеются два слоя клеток: наружный эпибласт и лежащий под ним гипобласт. Между ними находится бластоцель.

Богатые желтком яйца рыб дробятся сходным образом: клеточные деления у них происходят только в бластодиске, располагающемся в области анимального полюса. Микрофотографии дробящегося яйца рыбы, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа (рис. 3.35), прекрасно демонстрируют неполный характер дискоидального дробления.

Поверхностное дробление

Яйцам насекомых свойственно поверхностное дробление, при котором из-за большой массы центрально расположенного желтка дробление ограничено поверхностным слоем цитоплазмы. Одна из примечательных особенностей этого типа дробления

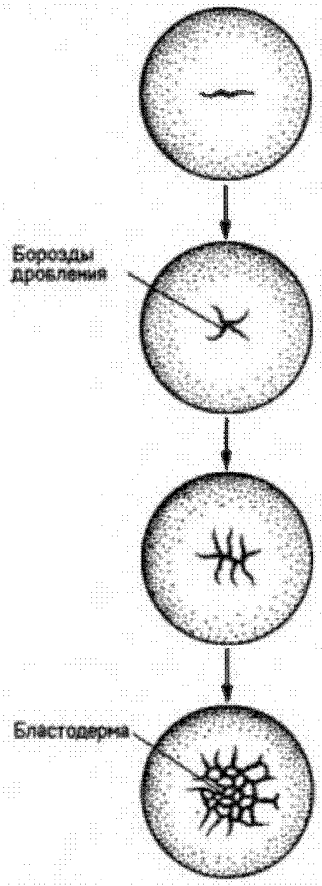


Рис. 3.33. Дискоидальное дробление куриного яйца (вид со стороны анимального полюса). Борозды дробления не распространяются на желток, и возникает бластодерма, состоящая из одного слоя клеток.

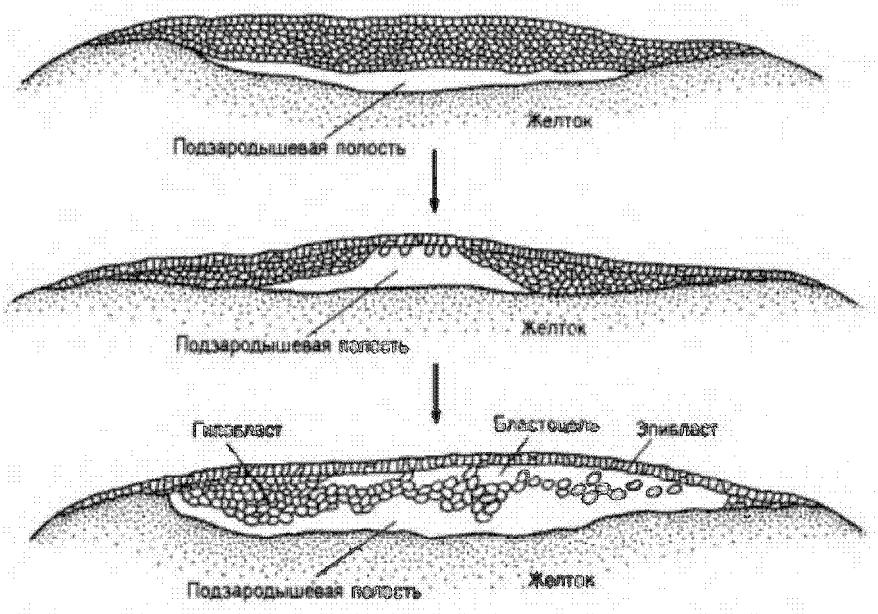


Рис. 3.34. Образование гипобласта в яйце птицы. (По Тоттеу, 1962.)

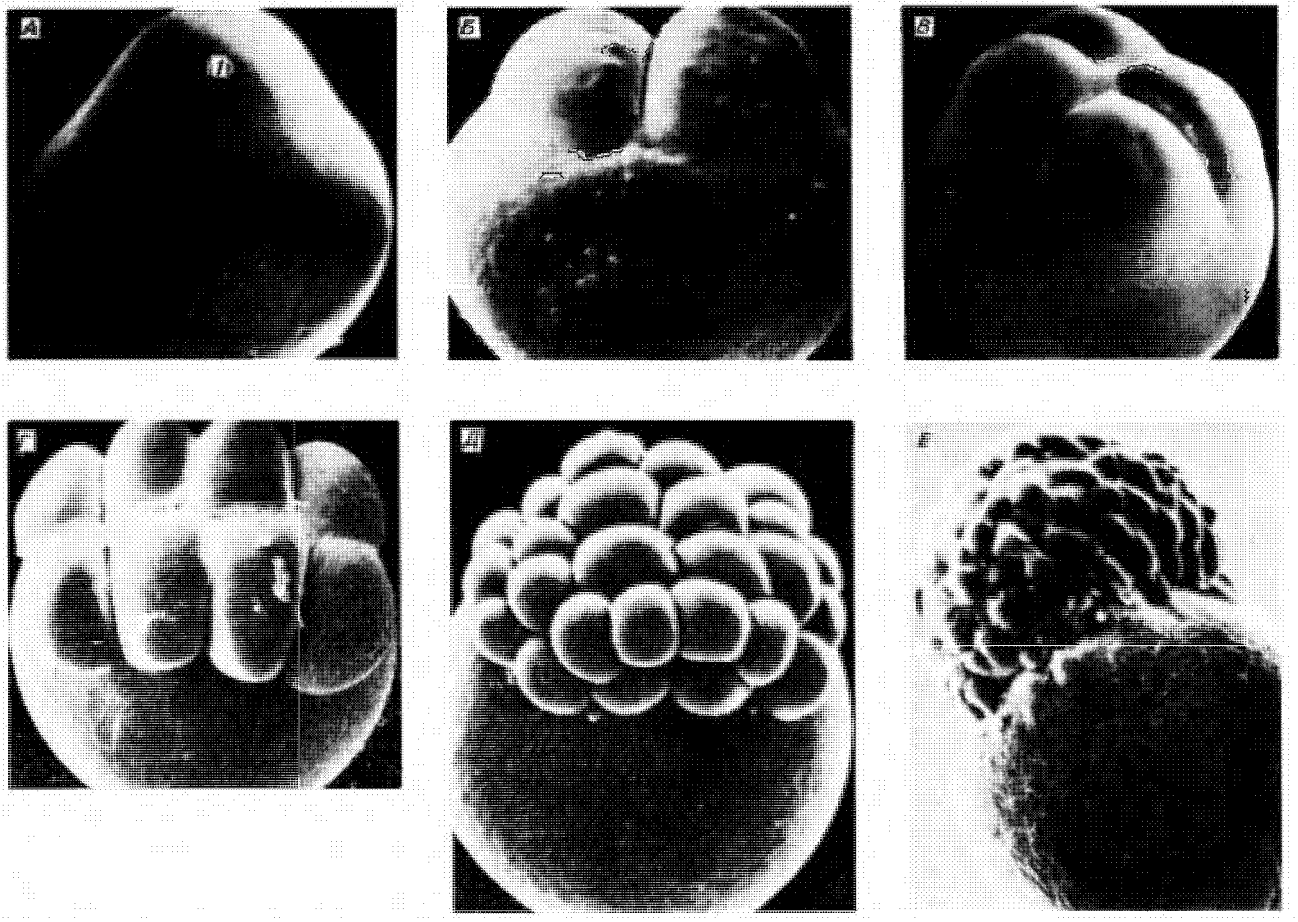


Рис. 3.35. Дискоидальное дробление у *Brachydanio rerio*. Образующийся в результате дробления бластодиск имеет клеточное строение и располагается на поверхности плотного желтка. *1* — область бластодиска. (Из Beams, Kessel, 1976; фотографии с любезного разрешения авторов.)

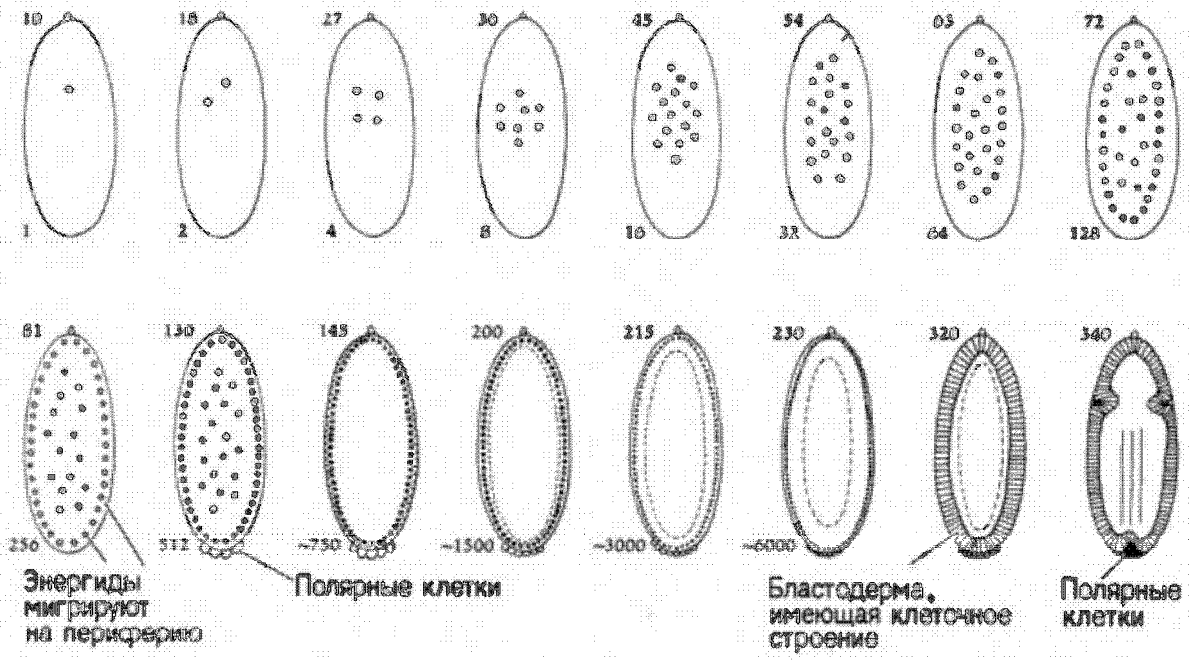


Рис. 3.36. Поверхностное дробление зародыша дрозофилы. Цифры над каждым зародышем соответствуют числу минут после откладки яйца; цифры внизу обозначают число имеющихся ядер. Полярные клетки (которые позднее образуют половые клетки) становятся заметными, начиная со стадии 512 ядер, хотя клеточная бластодерма образуется не раньше, чем спустя примерно 3 ч. (По Zalokar, Erk, 1976.)

заключается в том, что обособление клеток происходит только после многократного разделения ядер. Дробление яйца насекомого представлено на рис. 3.36. Ядро зиготы претерпевает несколько митотических делений в центральной области яйца. У дрозофилы в результате ряда таких делений продолжительностью 8 мин каждое образуется 256 ядер. Затем ядра с окружающими их островками цитоплазмы (**энергиды**) мигрируют на периферию яйца, где митозы продолжаются, но с убывающей скоростью. Теперь зародыш носит название **синцитиальной бластодермы**, так как все ядра дробления заключены в общей цитоплазме и какие-либо плазматические мембраны, кроме мембраны самого яйца, отсутствуют. Ядра, мигрирующие к заднему полюсу яйца, вскоре окружаются новыми плазматическими мембранами, образуя **полярные клетки** зародыша. Эти клетки дают начало половым клеткам взрослого организма. Таким образом, одним из первых событий в развитии насекомых является отделение будущих половых клеток от остальных частей зародыша.

После образования полярных клеток плазматическая мембрана яйца образует впячивания, которые углубляются между ядрами и в конечном счете обособляют каждое из них в отдельной клетке (рис. 3.37). В результате возникает **клеточная бластодерма**, клетки которой однослойным покровом одевают богатую желтком сердцевину яйца. У дрозофилы этот слой состоит приблизительно из 6000 клеток и формируется в первые 3 ч после оплодотворения. Распределение клеток в бластодерме не равномерное и не случайное: они концентрируются на вентральной поверхности, обозначая место, где возникнут зародышевые листки. Эта область, называемая **зародышевой полоской**, дает начало всем клеткам насекомого. Остальные клетки бластодермы образуют внезародышевые оболочки.

Хотя ядра первоначально делятся в общей цитоплазме, это не означает, что цитоплазма сама по себе однородна. Показано (Karr, Alberts, 1986), что каждое ядро синцитиальной бластодермы заключено в собственную маленькую территорию цитоскелетных белков. Когда ядра во время десятого митотического цикла дробления достигают периферии, каждое из них окружается микротрубочками и микрофиламентами. На рис. 3.38 показаны ядра на стадии профазы двенадцатого митотического деления и основная часть относящихся к ним территорий, в которых располагаются микрофиламенты и микротрубочки.

После того как ядра достигнут периферии, время, необходимое для осуществления каждого из четырех последующих делений, постепенно увеличивается, составляя для 14-го цикла 60 мин. Именно в это время происходит обособление клеток. Сформированные клетки делятся асинхронно. Скорость транс-

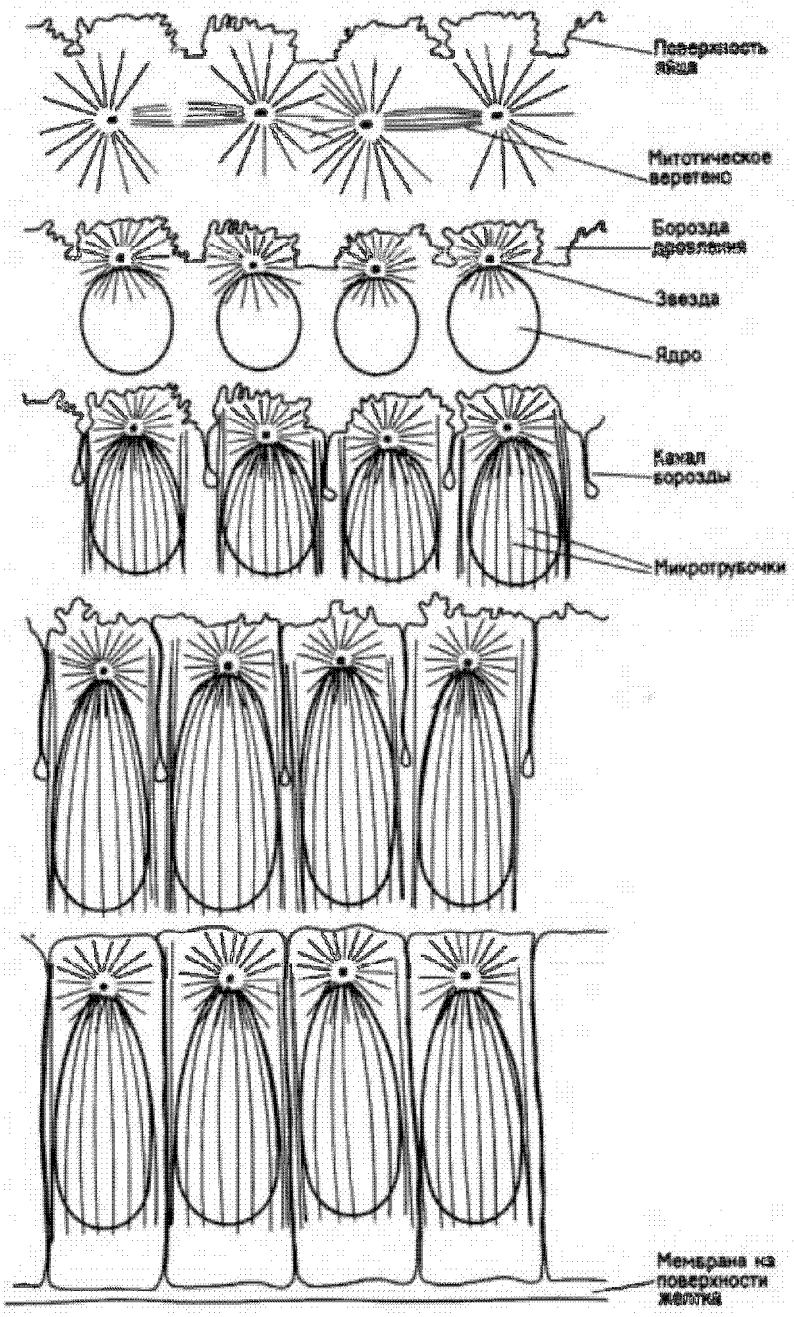


Рис. 3.37. Схематический рисунок, на котором показано удлинение ядер и обособление клеток в бластодерме дрозофилы. (По Fullilove, Jacobson, 1971.)

Рис. 3.38. Локализация цитоскелета вокруг ядер в синцитиальной бластодерме дрозофилы. Срезы зародыша дрозофилы, вступающего в профазу двенадцатого деления, были окрашены тремя способами. *А*. Ядра окрашены красителем, который связывается с ДНК. *Б*. Микрофиламенты идентифицированы с помощью флуоресцирующих антител к актину. *В*. Микротрубочки выявлены с помощью флуоресцирующих антител к тубулину. Можно видеть, что вокруг каждого ядра имеется область, включающая цитоскелетные структуры. (Из Karr, Alberts, 1986; фотографии с любезного разрешения T. L. Karr.)

крипции (начинающейся приблизительно на одиннадцатом цикле) сильно возрастает. Замедление ядерных делений и ускорение синтеза РНК у дрозофилы напоминают ситуацию, наблюдающуюся у зародышей лягушки и морского ежа. Контроль за замедлением делений (у зародышей *Xenopus*, морского ежа и дрозофилы), по-видимому, осуществляется через соотношение между ядром и цитоплазмой (Newport, Kirschner, 1982a; Edgar et al., 1986). Эдгар и его соавторы в цитированной работе сравнили раннее развитие зародышей дрозофилы дикого типа с развитием гаплоидных мутантов. Гаплоидные зародыши дрозофилы при каждом клеточном делении содержат вдвое меньше хроматина, чем зародыши дикого типа. Следовательно, гаплоидный зародыш на восьмом клеточном цикле имеет такое же количество хроматина, что и зародыш дикого типа на седьмом цикле. Эти исследователи установили, что тогда как зародыши дикого типа формировали клеточную бластодерму во время 14-го цикла, гаплоидные зародыши для достижения того же результата должны были осуществить еще одно, дополнительное 15-е деление. Более того, продолжительность 11—14 циклов у зародышей дикого типа соответствовала продолжительности 12—15 циклов у гаплоидных зародышей. Таким образом, ход развития гаплоидных зародышей сходен с ходом развития зародышей дикого типа, отличаясь лишь отставанием на одно клеточное деление.

Если это отставание обусловлено тем, что ядерно-плазменное отношение у гаплоидных мутантов на каждом данном цикле вдвое меньше, чем у зародышей дикого типа, то можно было бы ускорить образование клеточной бластодермы, отшнуровывая (наложением лигатуры) часть цитоплазмы, чтобы гаплоидные ядра делились в меньшем ее объеме. Когда такой опыт был проведен, образование клеточной бластодермы у гаплоидных зародышей ускорилось. Завершающее деление клеток бластодермы, свидетельствующее об окончании периода дробления, у дрозофилы происходит тогда, когда на одно ядро приходится 61 мкм² цитоплазмы. У *Xenopus* сходное замедление митотических делений наблюдается после 12-го деления. И здесь деления также впоследствии становятся асинхронными. Момент перехода к средней бластуле тоже связан с ядерно-плазменным отношением. Гаплоидные зародыши *Xenopus laevis* осуществляют этот переход после 13-го митотического цикла, тогда как тетраплоидные зародыши (содержащие вдвое больше хроматина на клетку, чем зародыши дикого типа) приступают к переходу после 11-го деления (Newport, Kirschner, 1982a, b).

Как у дрозофилы, так и у *Xenopus laevis* транскрипция и подвижность клеток могут быть инициированы преждевременно путем искусственного удлинения клеточного цикла. При задержке клеточных делений циклогексимидом (ингибитор белкового синтеза) переход к средней бластуле у *Xenopus laevis* индуцируется рано, а у дрозофилы происходит вспышка транскрипции (Edgar et al., 1986; Kimelman et al., 1987).

МЕХАНИЗМЫ ДРОБЛЕНИЯ

Инициация дробления

Клеточный цикл соматических клеток по функциональному признаку делится на четыре стадии (или фазы). За митозом (М) следует пресинтетический период (G_1), после которого происходит синтез ДНК (*S*). Затем наступает премитотический цикл (G_2), за которым следует митоз (рис. 3.39,*А*). Наступление этих фаз регулируется факторами роста, которые будут подробно рассмотрены в гл. 20. Клеточный цикл бластомеров на ранних стадиях дробления может быть, однако, гораздо более простым. Бластомеры у морского ежа на этих стадиях не имеют фазы G_1; репликация ДНК осуществляется в телофазе предыдущего митоза (Hinegardner et al., 1964). На тех же стадиях у *Xenopus laevis* и дрозофилы отсутствуют две фазы, G_1 и G_2. (У *Xenopus laevis* эти фазы появляются в клеточном цикле при переходе к средней бластуле после 12-го деления, а у дрозофилы — после 14-го. В обоих случаях это изменение цикла сочетается с увеличением клеточной подвижности и транскрипции РНК.) В течение первых 12 делений клетки *Xenopus* делятся синхронно и клеточный цикл бывает двухфазным: S-фаза сменяется М-фазой и М-фаза — S-фазой (рис. 3.39, *Б*; Laskey et al., 1977; Newport, Kirschner, 1982a).

Факторы, регулирующие этот двухфазный цикл, локализованы в цитоплазме. В норме преобразования растущих ооцитов *Xenopus laevis* останавливаются на стадии профазы первого деления мейоза. Такие ооциты неспособны к делению. Когда в них пересаживают ядра делящихся клеток, эти ядра перестают делиться. Нормальные ооциты, подвергнутые стимулирующему воздействию прогестерона, возоб-

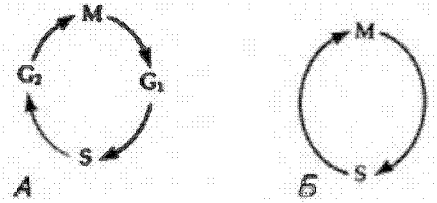


Рис. 3.39. Клеточные циклы соматических клеток и бластомеров на ранних стадиях дробления. *А*. Клеточный цикл типичной соматической клетки. За митозом (М) следует «интерфазное» состояние. Период между митозами подразделяется на фазы G_1, *S* (синтез) и G_2. *Б*. Более простой двухфазный цикл бластомеров амфибий на ранних стадиях дробления, имеющий только две фазы — *S* и *M*.

новляют мейотические преобразования, которые идут до стадии метафазы второго деления мейоза и на этой стадии останавливаются. Если в цитоплазму обработанных прогестероном ооцитов помещают ядра делящихся клеток (например, нейронов), то такие ядра тоже инициируют деление (Gurdon, 1968). В цитоплазме происходят периодические сокращения кортикального слоя (характерные для деления) даже при отсутствии ядер или центриолей. Если в энуклеированные зародыши инъецируют клонированные фрагменты ДНК, то их репликация происходит под контролем этих циклов (Hara et al., 1980; Harland, Laskey, 1980; Karsenti et al., 1984). Таким образом, способность клетки к делению регулируется цитоплазмой.

Недавно были выявлены факторы, осуществляющие эту регуляцию. Фактор, индуцируемый прогестероном, который позволяет ооциту возобновить мейоз, представляет собой белок с молекулярной массой 100 000 дальтон; его называют **фактором, стимулирующим созревание** (maturation promoting factor, MPF). После первого деления мейоза повышается концентрация другого белка — **цитостатического фактора** (cytostatic factor, CSF), что приводит к остановке преобразований ооцита на метафазе второго деления мейоза. Ионы кальция, высвобождающиеся при оплодотворении из эндоплазматического ретикулума, по-видимому, инактивируют CSF, что делает возможным завершение мейоза и слияние пронуклеусов (Meyerhof, Masui, 1977).

Те же самые факторы — MPF, CSF и ионы кальция — важны и после оплодотворения, поскольку они регулируют двухфазный клеточный цикл на ранних стадиях дробления *Xenopus*. Показано (Gerhart et al., 1984), что в делящихся клетках уровень активности MPF претерпевает циклические изменения. Активность MPF в бластомерах лягушки на ранних стадиях дробления наивысшая в М-фазе и не выявляется в S-фазе. Такая же цикличность обнаруживается и в энуклеированных бластомерах. Установлено (Newport, Kirschner, 1984), что даже при отсутствии белкового синтеза наступление репликации ДНК (S-фаза) и вступление в митоз (М-фаза) определяются исключительно увеличением и утратой активности MPF. Дробящиеся клетки могут быть блокированы в S-фазе путем инкубации их с ингибитором белкового синтеза. Когда в такие клетки инъецируют MPF, они вступают в М-фазу. Ядерная оболочка этих клеток разрушается, и происходит конденсация хроматина с образованием видимых хромосом. Через 1ч активность MPF снижается и хромосомы возвращаются к состоянию, характерному для S-фазы. MPF действует, вероятно, путем изменения структуры ядерной оболочки. Через 15 мин после его введения наблюдается гиперфосфорилирование трех основных белков ядерной оболочки. В течение следующих 15 мин оболочка деполимеризуется и разрушается (Miake-Lye, Kirschner, 1985).

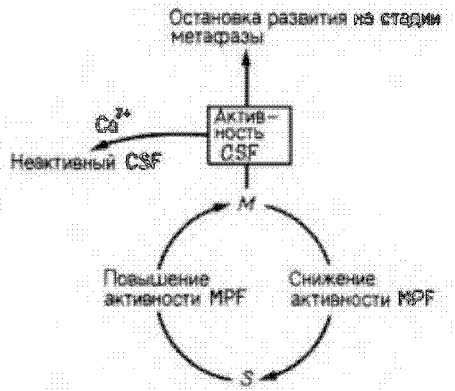


Рис. 3.40. Модель регуляции клеточного цикла бластомеров на ранних стадиях дробления у амфибий. В присутствии MPF S-фаза клеточного цикла переходит в М-фазу. Когда активность MPF прекращается (в результате его разрушения или функциональной инактивации), совершается переход от М-фазы к S-фазе. CSF стабилизирует MPF, задерживая клетку в М-фазе. Ионы кальция противодействуют эффекту CSF, т. е. они возвращают клетку в фазу S. (По Newport, Kirschner, 1984.)

Модель регуляции двухфазного клеточного цикла представлена на рис. 3.40. В цитоплазме продолжается образование MPF (либо путем трансляции мРНК для MPF, уже запасенной в клетке, либо путем активации предшественника MPF). MPF побуждает клетку к переходу от S-фазы к М-фазе. Когда MPF инактивируется, клетка возвращается в S-фазу. Таким образом, MPF управляет клеточным циклом. CSF и ионы кальция регулируют работу регулятора, контролируя содержание MPF в клетке. CSF, по-видимому, стабилизирует MPF, удерживая клетку в состоянии митоза. Ионы кальция, инактивируя CSF, тем самым создают возможность инактивации MPF. При добавлении CSF прекращаются также циклические сокращения кортикального слоя цитоплазмы, а последующая инъекция ионов кальция снова их стимулирует. Таким образом, на ранних стадиях развития цитоплазма определяет скорость клеточных делений и продолжительность S- и М-фаз цикла.

Цитоскелетный механизм митоза

Дробление является результатом двух координированных процессов. Первый из этих процессов — **кариокинез** (митотическое деление ядра). Механическим аппаратом этого деления является митотическое веретено с его **микротрубочками**, состоящими из тубулина (белка того же типа, что и белок, образующий жгутик спермия). Второй процесс — **цитокинез**,

Таблица 3.2. Кариокинез и цитокинез

Процесс	Механический аппарат	Основная белковая структура	Локализация	Основное вещество, нарушающее процесс
Кариокинез	Митотическое веретено	Тубулиновые микротрубочки	Центральная цитоплазма	Колхицин, нокодазол[1]
Цитокинез	Сократимое кольцо	Актиновые микрофиламенты	Кортикальная цитоплазма	Цитохалазин В

[1] Недавно было установлено, что колхицин подавляет независимым образом разные функции мембран, включая осморегуляцию, а также транспорт ионов и нуклеозидов. По этой причине в качестве ингибитора процессов, опосредованных микротрубочками, начинают использовать главным образом нокодазол (см. Hardin, 1987).

или деление клетки. Механическим аппаратом цитокинеза является сократимое кольцо микрофиламентов, состоящих из актина (белка того же типа, что и белки, осуществляющие удлинение микроворсинок и акросомного выроста спермия). В табл. 3.2 сравниваются эти два процесса. Взаимоотношение и координация между ними схематически представлены на рис. 3.41. На нем изображено яйцо морского ежа на стадии первого деления дробления. Митотическое веретено и сократимое кольцо расположены перпендикулярно друг другу, и веретено находится внутри сократимого кольца. Борозда дробления в дальнейшем разделяет плоскость митоза, создавая при этом два генетически равноценных бластомера.

Микрофиламенты актина встречаются в кортикальном слое яйца в большем количестве, чем в центральной цитоплазме. С помощью электронного микроскопа можно видеть, что микрофиламенты образуют в кортикальном слое хорошо различимое кольцо толщиной 0,1 мкм (рис. 3.42). Сократимое кольцо существует только во время деления и простирается на 8—10 мкм по направлению к центру яйца. Именно оно ответственно за разделение зиготы на бластомеры, поскольку, если его разрушить, цитокинез останавливается. Шредер (Schroeder, 1973) предложил модель дробления, согласно которой сократимое кольцо разделяет яйцо подобно «внутриклеточному ремешку, затягивающему кошелек», сокращаясь по мере продвижения процесса деления. Результатом этого сокращения кольца микрофиламентов является образование борозды дробления.

Обычно кариокинез и цитокинез координированы между собой, но в некоторых естественных или экспериментальных условиях они оказываются разъединенными. Было обнаружено (Harvey, 1936), что яйца морского ежа после хирургического удаления ядра могут продолжать делиться вплоть до образования бластулоподобной структуры. (По-видимому, в них со временем истощаются мРНК и белки, запасенные в оогенезе, и дальнейшее развитие становит-

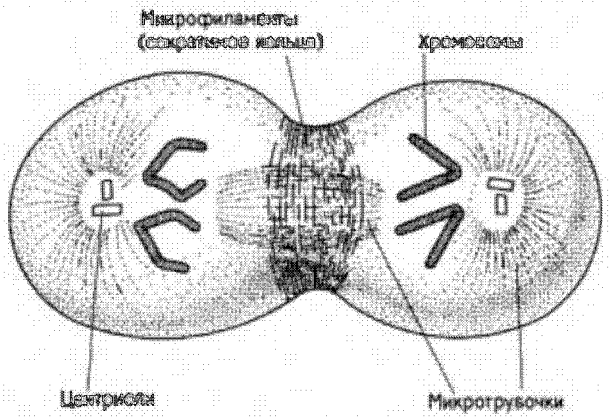


Рис. 3.41. Роль микротрубочек и микрофиламентов в клеточном делении. В представленной здесь телофазной клетке микротрубочки притягивают хромосомы к центриолям, тогда как в результате сокращения микрофиламентов происходит перешнуровывание цитоплазмы.

Рис. 3.42. Кортикальное кольцо микрофиламентов (отмечено стрелкой) вокруг борозды второго деления дробления у *Brachydanio rerio*. (Из Beams, Kessel, 1976; фотография с любезного разрешения авторов.)

тся невозможным без нового процесса транскрипции.) Точно так же кариокинез может происходить при отсутствии клеточных делений. Мы уже говорили о яйцах насекомых, в которых ядра делятся многократно, прежде чем произойдет разделение цитоплазмы на отдельные клетки. Такой же результат может быть получен при обработке зародышей цитохалазином В. Это вещество препятствует образованию микрофиламентами сократимого кольца. Если цитохалазин В добавляют к морской воде до того, как в зиготе морского ежа сформировалось сократимое кольцо, то борозды дробления не возникает. Если добавить его после закладки борозды дробления, то существующее сократимое кольцо дезорганизуется и деление останавливается (Schroeder, 1972). Однако деление ядра при этом не нарушается. Показано (Lillie, 1902; Whittaker, 1979), что при блокировании дробления деления ядер и экспрессия синтезируемых в них регуляторных продуктов продолжаются в положенное время.

Один из наиболее захватывающих нерешенных вопросов, связанных с дроблением зародыша,— это вопрос о том, каким образом достигается координация между цито- и кариокинезом. Механизмы такой координации в деталях еще не выяснен, однако существуют три группы данных в пользу того, что локализация борозд дробления определяется положением звезд митотического веретена. Эти звезды (рис. 3.43) образованы «лучами» микротрубочек, отходящими от полюсов митотического веретена к периферии клетки. Одним из указаний на то, что звезды могут контролировать локализацию борозд дробления, является зависимость числа закладывающихся борозд от числа имеющихся звезд. Дробление протекает нормально только в том случае, если яйцо содержит *две* звезды. Если поблизости от периферии клетки звезды отсутствуют, то борозды дробления не возникают. Если вызвать исчезновение звезд (добавляя эфир к морской воде, в которой развиваются зародыши морского ежа), то дробление прекращается (Wilson, 1901); когда зародышей затем переносили в нормальную морскую воду, звезды появлялись вновь и дробление продолжалось. При полиспермном оплодотворении яйца могут образоваться три или четыре звезды. Если возникли три звезды, то появляются три эквидистантные борозды, а при четырех звездах возникают четыре борозды дробления (см. рис. 2.21). Таким образом представляется, что звезды являются sine qua non (непременным условием) дробления.

Вторая группа данных, свидетельствующих в пользу существования зависимости между наличием звезд и образованием борозд дробления, получена в опытах, в которых направление деления изменяется в результате сдавливания яйца. Пфлюгер (Pflüger, 1884) обнаружил, что если зиготы лягушки слегка сдавить между двумя стеклянными пластинками, то направление борозд трех первых делений будет перпендикулярным плоскости пластинок. То же самое наблюдали Дриш и Морган (см. Morgan, 1927) на зародышах морского ежа; в опытах обоих авторов плоскость третьего деления дробления (в норме параллельная экватору ооцита) была смещена на 90°.

Эти и другие эксперименты показали, что сдавливание вызывает вытягивание яйца в плоскости пластинки и что митотические веретена ориентируются по длинной оси клетки. Борозды дробления всегда перпендикулярны веретену, так что, изменяя положение митотического веретена, экспериментатор может изменить локализацию борозды дробления.

Раппапорт (Rappaport, 1961) расширил экспери-

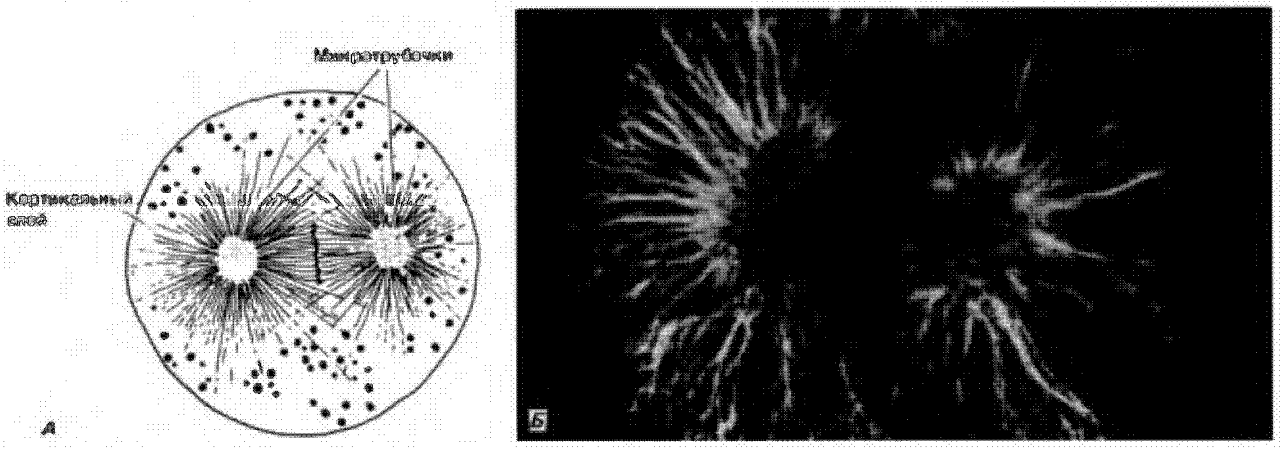


Рис. 3.43. Микротрубочки, идущие от митотических полюсов через цитоплазму к кортикальному слою клетки при первом делении дробления яйца морского ежа. Рисунок *А* сделан почти на 100 лет ранее, чем фотография, представленная на *Б*. (*А* — из Wilson, 1896; *Б* — из White et al., 1987.)

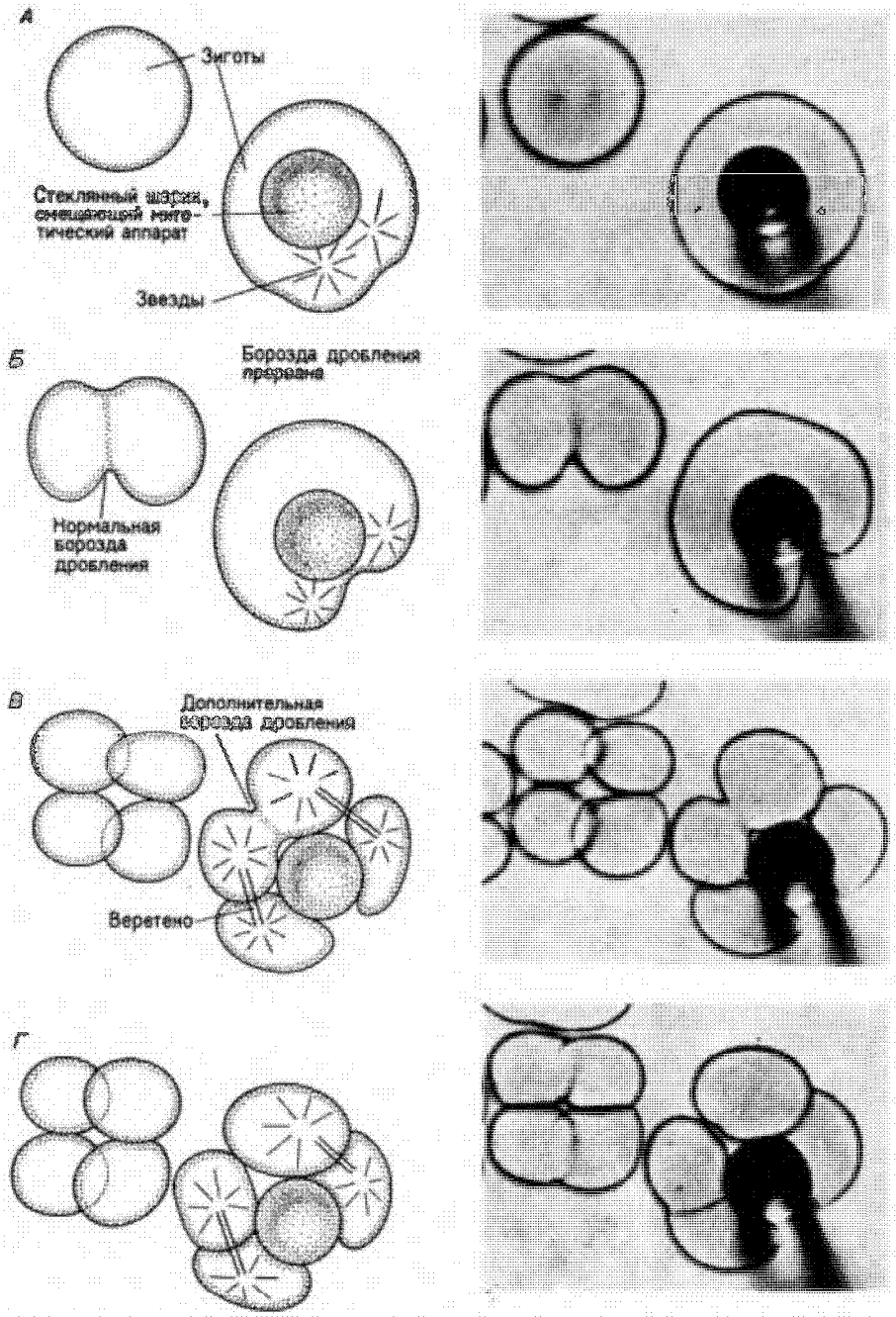


Рис. 3.44. Возникновение дополнительной борозды дробления при перемещении звезд. *А*, *Б*. Прерывая распространение борозды дробления с помощью стеклянного шарика, создают клетку подковообразной формы. При следующем делении (*В*, *Г*) возникает дополнительная борозда дробления, хотя она и не служит плоскостью разделения хромосом. (Из Rapaport, 1961; фотографии с любезного разрешения R. Rapaport.)

менты такого типа, смещая митотические веретена на периферию клеток. В опыте, представленном на рис. 3.44, для этого был использован стеклянный шарик. Образовавшаяся борозда дробления распространялась только до шарика и не переходила на другую его сторону. В результате возникала двухъядерная клетка подковообразной формы. При следующем делении между четырьмя звездами сформировались два веретена, однако возникали три борозды дробления! Каждый конец подковы имел свое собственное митотическое веретено, и там, как и следовало ожидать, закладывалась борозда, но, кроме того, между двумя звездами в средней части подковы возникала *третья* борозда дробления (рис. 3.44, *В*). Это ясно показывает, что если две звезды располагаются достаточно близко друг к другу, то их взаимодействие приводит к образованию борозды дробления даже в отсутствие митотического верете-

на между ними. Здесь мы видим также, что клеточное деление может происходить без разделения ядра, если только имеются звезды.

Образование новых мембран

Рассматривая в общих чертах дробление зародыша, мы говорили об образовании новых клеточных мембран. Синтезируются ли эти мембраны заново или же они образуются просто путем растягивания плазматической мембраны социта? Ответ на этот вопрос будет, вероятно, заключаться в том, что оба этих механизма участвуют в образовании внутриклеточных мембран. У морских ежей плазматическая мембрана зиготы продолжается в многочисленные микроворсинки. Во время дробления эти микроворсинки уменьшаются в размерах, по-видимому, в результате растягивания плазматической мембраны яйца при образовании борозд. Однако площадь плазматической мембраны недостаточно для того, чтобы обеспечить образование всех мембран, имеющихся к концу дробления. Поэтому можно думать, что происходит и синтез новых мембран.

Данные, свидетельствующие в пользу синтеза компонентов плазматической мембраны на ранних стадиях дробления, были получены на некоторых видах амфибий, яйца которых имеют пигментированный поверхностный слой цитоплазмы. На рис. 3.45, *А* мы видим первую борозду дробления в пигментированной зиготе лягушки. И если ранее существовавшая плазматическая мембрана имеет ассоциированный с ней пигментированный поверхностный слой, то новая мембрана белая. Кроме того, эта новая мембрана по своей электрической проводимости отличается от ранее существовавшей. Эти данные, не являясь решающим доказательством, свидетельствуют в пользу того, что новые плазматические мембраны бластомеров у лягушки даже на стадии первого деления дробления образуются преимущественно путем синтеза.

В связи с формированием большого количества новых мембран возникает важный вопрос: каким образом эти новые формирующиеся мембраны соединяются с существовавшими ранее? Байерс и Армстронг (Byers, Armstrong, 1986) метили радиоактивными соединениями мембранные компоненты яиц *Xenopus laevis* сразу после оплодотворения и прослеживали распределение этих молекул методом радиоавтографии. Во время первого деления мембрана на наружной поверхности зародыша и мембрана ведущего конца борозды дробления были интенсивно меченными. Обширная область между ними не имела радиоактивной метки (рис. 3.45, *Б*). Следовательно, борозда дробления представляет собой мозаику из различных частей. Мембрана ведущего конца борозды произошла от предсуществовавшего меченого наружного слоя яйца, тогда как большая часть мембраны борозды образована материалом, который был недоступен при мечении поверхности. Байерс и Армстронг высказали предположение, что интенсивно меченный участок мембраны на ведущем конце борозды содержит структуры, с помощью которых происходит заякоривание расположенного глубже кольца микрофиламентов.

РЕЗЮМЕ

Дробление представляет собой совокупность процессов, результатом которых является превращение оплодотворенного яйца в многоклеточную структуру. Характерные особенности каждого типа дробления зависят от эволюционного пути вида и от способности яиц обеспечить потребности зародыша в питательных веществах. Некоторые животные нуждаются в больших количествах желтка для того, чтобы поддерживать развитие зародыша до его перехода на активное питание, тогда как другие жи-

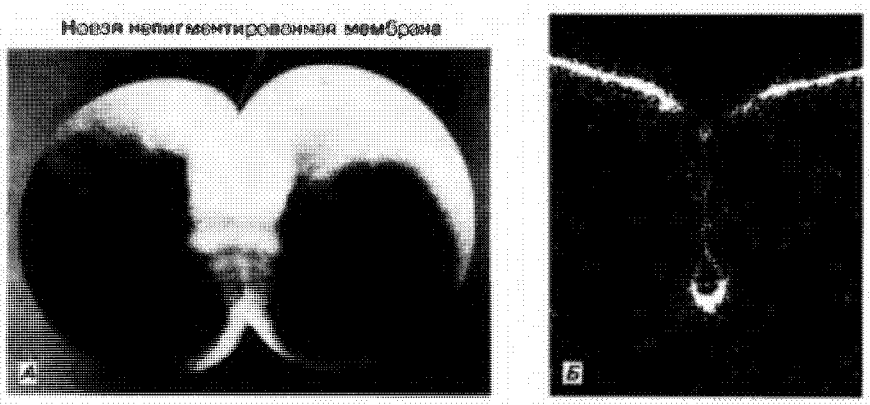


Рис. 3.45. Образование новых мембран при первом делении дробления яйца *Xenopus*. *А*. С ранее существовавшей мембраной связаны пигментные гранулы. Новая мембрана выглядит светлой, поскольку с ней не связаны такие гранулы. *Б*. Радиоавтограф белков плазматической мембраны в области борозды первого деления дробления. Белки на поверхности яйца до начала деления были маркированы радиоактивной меткой. Видны светлые пятна в областях, содержащих белки, которые до деления находились на поверхности зиготы. (*А* — из de Laat, Bluemink, 1974; *Б* — из Byers, Armstrong, 1986; фотографии с любезного разрешения авторов.)

вотные проходят в своем развитии стадию питающейся личинки, и для них не требуется присутствия большого количество желтка в цитоплазме яйца. У млекопитающих в результате своеобразного типа дробления возникают элементы зачатка плаценты, которая будет снабжать зародыш питательными веществами. За невероятным многообразием типов дробления скрывается, однако, общность функций и механизмов. Во всех случаях кариокинез и цитокинез должны быть координированы и яйцо разделено на клеточные области. В процессе дробления восстанавливается характерное для соматических клеток ядерно-плазменное отношение и важная для развития информация распределяется между разными клеточными областями. В следующей главе речь пойдет о перемещениях и взаимодействиях бластомеров, образовавшихся в период дробления, и о том, как в результате этих процессов возникает основной план строения тела животного.

ЛИТЕРАТУРА

Balinsky B. I. (1981). Introduction to Embryology. 5th Ed. Saunders, Philadelphia.

Barlow P., Owen D. A. J., Graham C. (1972). DNA synthesis in the preimplantation mouse embryo. J. Embr. Exp. Morphol. **27**, 432—445.

Beams H. W., Kessel R. G. (1976). Cytokinesis: A comparative study of cytoplasmic division in animal cells. Am. Sci. **64**, 279—290.

Biggelaar J. A. M. van der, Guerrier P. (1979). Dorsoventral polarity and mesentoblast determination as concomitant results of cellular interactions in the mollusc *Patella vulgata*. Dev. Biol. **68**, 462—471.

Borland R. M. (1977). Transport processes in the mammalian blastocyst. Dev. Mammals **1**, 31—67.

Boycott A. E., Diver C., Garstang S. L., Turner F. M. (1930). The inheritance of sinestrality in *Limnaea peregra* (Mollusca: Pulmonata). Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Series B] **219**, 51—131.

Byers T. J., Armstrong P. B. (1986). Membrane protein redistribution during *Xenopus* first cleavage. J. Cell Biol. **102**, 2176—2184.

Carlson B. M. (1981). Patten's Foundations of Embryology. McGraw-Hill, New York.

Chappelle A. de la, Schroder J., Rantanen P., Thomasson B., Niemi M., Tilikainen A., Sanger R., Rohson E. E. (1974). Early fusion of two human embryos? Ann. Human Genet. **38**, 63—75.

Craig M. M., Morrill J. B. (1986). Cellular arrangements and surface topography during early development in embryos of *Ilyanassa obsoleta*. Int. J. Invert. Reprod. Dev. **9**, 209—228.

Crampton H. E. (1894). Reversal of cleavage in a sinistral gastropod. Ann. N. Y. Acad. Sci. **8**, 167—170.

Dan K. (1960). Cytoembryology of echinoderms and amphibia. Int. Rev. Cytol. **9**, 321—367.

Dan-Sohkawa M., Fujisawa H. (1980). Cell dynamics of the blastulation process in the starfish, *Asterina pectinifera*. Dev. Biol. **77**, 328—339.

de Laat S. W., Bluemink J. G. (1974). New membrane formation during cytokinesis in normal and cytochalasin B-treated eggs of *Xenopus laevis*. II. Electrophysical observation. J. Cell Biol. **60**, 529—540.

de Laat S. W., Tertoelen L. G. J., Dorresteijn A. W. C., Biggelaar J. A. M. van der (1980). Intercellular communication patterns are involved in cell determination in early muscular development. Nature **287**, 546—548.

Dulcibella T. (1977). Surface changes of the developing trophoblast cell. In: M. H. Johnson (ed.). Development in Mammals 1. Elsevier North-Holland, New York, pp. 5—30.

Dyce J., George M., Goodall H., Fleming T. P. (1987). Do trophectoderm and inner cell mass cells in the mouse blastocyst maintain discrete lineages? Development **100**, 685—698.

Edgar B. A., Kiehle C. P., Schubiger G. (1986). Cell cycle control by the nucleo-cytoplasmic ratio in early *Drosophila* development. Cell **44**, 365—372.

Fleming T. P. (1987). Quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo. Dev. Biol. **119**, 520—531.

Fleming T. P., Pickering S. J., Qasim F., Maro B. (1986). The generation of cell surface polarity in mouse 8-cell blastomeres: The role of cortical microfilaments analyzed using cytochalasin D. J. Embryol. Exp. Morphol. **95**, 169—191.

Freeman G., Lundelius J. W. (1982). The developmental genetics of dextrality and sinistrality in the gastropod *Limneae peregra*. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **191**, 69—83.

Fullilove S. L., Jacobson A. G. (1971). Nuclear elongation and cytokinesis in *Drosophila montana*. Dev. Biol. **26**, 560—577.

Gardiner R. C., Rossant J. (1976). Determination during embryogenesis in mammals. Ciba Found. Symp. **40**, 5—18.

Gerhart J. W., Wu M., Kirschner M. (1984). Cell dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. J. Cell Biol. **98**, 1247—1255.

Giudice A. (1973). Developmental Biology of the Sea Urchin Embryo. Academic, New York.

Graham C. F., Kelly S. J. (1977). Interaction between embryonic cells during early development of the mouse. In: Karkinen-Jaaskelainen, L. Saxén and L. Weiss (eds.), Cell Interactions in Differentiation. Academic, New York, pp. 45—57.

Gulyas B. J. (1975). A reexamination of the cleavage patterns in eutherian mammalian eggs: Rotation of the blastomere pairs during second cleavage in the rabbit. J. Exp. Zool. **193**, 235—248.

Gurdon J. B. (1968). Changes in somatic nuclei inserted into growing and maturing amphibian oocytes. J. Embryol. Exp. Morphol. **20**, 401—414.

Hara K. (1977). The cleavage pattern of the axolotl egg studied by cinematography and cell counting. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **181**, 73—87.

Hara K., Tydeman P., Kirschner M. W. (1980). A cytoplasmic clock with the same period as the division cycle in *Xenopus* eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 462—466.

Hardin J. D. (1987). Archenteron elongation in the sea urchin embryo is a microtubule independent process. Dev. Biol. **121**, 253—262.

Harland R. M., Laskey R. A. (1980). Regulated replication of DNA microinjected into eggs of *X. laevis*. Cell **21**, 761—771.

Harvey E. G. (1936). Parthenogenetic merogony or cleavage without nuclei in *Arbacia punctulata*. Biol. Bull. **71**, 101—121.

Hinegardner R. T., Rao B., Feldman D. E. (1964). The DNA synthetic period during early development of the sea urchin egg. Exp. Cell Res. **36**, 53—61.

Hillman N., Sherman H. I., Graham C. F. (1972). The effects of spatial arrangement of cell determination during mouse development. J. Embryol. Exp. Morphol. **28**, 263—278.

Hörstadius S. (1939). The mechanics of sea urchin development, studied by operative methods. Biol. Rev. **14**, 132—179.

Hörstadius S. (1973). Experimental Embryology of Echinoderms. Clarendon, Oxford.

Hyafil F., Babinet C., Jacob F. (1981). Cell-cell interactions in early embryogenesis: A molecular approach to the role of calcium. Cell **26**, 447—454.

Ikeda M. (1965). Behaviour of sulfhydryl groups of sea urchin eggs under the blockage of cell division by UV and heat shock. Exp. Cell Res. **40**, 282—291.
Inoué S. (1982). The role of self-assembly in the generation of biologic form. In: S. Subtelny and B. P. Green (eds.), Development Order: Its Origin and Regulation, Alan R. Liss, New York, pp. 35—76.
Johnson M. H., Chakraborty J., Handyside A. H., Willison K., Stern P. (1979). The effect of prolonged decompaction on the development of the preimplantation mouse embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. **54**, 241—261.
Kalt M. R. (1971). The relationship between cleavage and blastocoel formation in *Xenopus laevis*. I. Light microscopic observations. J. Embryol. Exp. Morphol. **26**, 37—49.
Karr T. L., Alberts B. M. (1986). Organization of the cytoskeleton in early *Drosophila embryos*. J. Cell Biol. **102**, 1494—1509.
Karsenti E., Newport J., Hubble R., Kirschner M. (1984). The interconversion of metaphase and interphase microtubule arrays, as studied by the injection of centrosomes and nuclei into *Xenopus* eggs. J. Cell Biol. **98**, 1730—1745.
Kelly S. J. (1977). Studies of the developmental potential of 4- and 8- cell stage mouse blastomeres. J. Exp. Zool. **200**, 365—376.
Kemler R., Babinet C., Eisen H., Jacob F. (1977). Surface antigen in early differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 4449—4452.
Kimelman D., Kirschner M., Scherson T. (1987). The events of the midblastula transition in *Xenopus* are regulated by changes in the cell cycle. Cell **48**, 399—407.
Langman J. (1981). Medical Embryology. Williams & Wilkins, Baltimore.
Laskey R. A., Mills A. D., Morris N. R. (1977). Assembly of SV40 chromatin in a cell-free system from *Xenopus* eggs. Cell **10**, 237—243.
Levy J. B., Johnson M. H., Goodall H., Maro B. (1986). The timing of compaction: Control of a major developmental transition in mouse early embryogenesis. J. Embryol. Exper. Morphol. **95**, 213—237.
Lillie F. R. (1898). Adaptation in cleavage. In: Biological Lectures of the Marine Biological Laboratory of Woods Hole. Ginn and Co., Boston, pp. 43—67.
Lillie F. R. (1902). Differentiation without cleavage in the egg of the annelid *Chaetopterus pergamentaceous*. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **14**, 477—499.
Lutz B. (1947). Trends towards non-aquatic and direct development in frogs. Copeia **4**, 242—252.
Mark W. H., Signorelli K., Lacy E. (1985). An inserted mutation in a transgenic mouse line results in developmental arrest at day 5 of gestation. Cold Spring Harbor symp. Quant. Biol. **50**, 453—463.
Markert C. L., Petters R. M. (1978). Manufactured hexaparental mice show that adults are derived from three embryonic cells. Science **202**, 56—58.
Mayr W. R., Pausch V., Schnedl W. (1979). Human chimaera detectable only by investigation of her progeny. Nature **277**, 210—211.
Meyerhof P. G., Masui Y. (1977). Ca^{++} and Mg^{++} control of cytostatic factor from *Rana pipiens* oocytes which cause metaphase and cleavage arrest. Dev. Biol. **61**, 214—229.
Miake-Lye R., Kirschner M. W. (1985). Induction of early mitotic events in a cell-free system. Cell **41**, 165—175.
Mintz B. (1970). Clonal expression in allophenic mice. Symp. Int. Soc. Cell Biol. **9**, 15.
Morgan T. H. (1927). Experimental Embryology. Columbia University Press, New York.
Mulnard J. G. (1967). Analyse microcinematographique du developpement de l'oeuf de souris du stage II au blastocyste. Arch. Biol. (Liege) **78**, 107—138.
Newport J. W., Kirschner M. W. (1982a). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at midblastula stage. Cell **30**, 675—686.
Newport J. W., Kirschner M. W. (1982b). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription. Cell **30**, 687—696.
Newport J. W., Kirschner M. W. (1984). Regulation of the cell cycle during *Xenopus laevis* development. Cell **37**, 731—742.
Nieuwkoop P. D. (1973). The "organization center" of the amphibian embryo: Its origin, spatial organization, and morphogenetic action. Adv. Morphog. **10**, 1—39.
Pederson R. A., Wu K., Batakier H. (1986). Origin of the inner cell mass in mouse embryos: Cell lineage analysis by microinjection. Dev. Biol. **117**, 581—595.
Perona R. M., Wassarman P. M. (1986). Mouse blastocysts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophectoderm. Dev. Biol. **114**, 42—52.
Peyrieras N., Hyafil F., Louvard D., Ploegh H. L., Jacob F. (1983). Uvomorulin: A non-integral membrane protein of early mouse embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 6274—6277.
Pflüger E. (1884). Uber die Einwirkung der Schwerkraft und anderer Bedingungen auf die Richtung der Zeiltheilung. Arch. Ges. Physiol. **3**, 4.
Pratt H. P. M., Ziomek Z. A., Reeve W. J. D., Johnson M. H. (1982). Compaction of the mouse embryo: An analysis of its components. J. Embryol. Exp. Morphol. **70**, 113—132.
Rappaport R. (1961). Experiments concerning cleavage stimulus in sand dollar eggs. J. Exp. Zool. **148**, 81—89.
Rugh R. (1967). The Mouse. Burgess, Minneapolis.
Sakai H. (1966). Studies on sulfhydryl groups during cell division of sea urchin eggs. VIII. Some properties of mitotic apparatus proteins. Biochim. Biophys. Acta **112**, 132—145.
Sakai H. (1968). Contractile properties of protein threads from sea urchin eggs in relation to cell division. Int. Rev. Cytol. **23**, 89—112.
Saunders J. W., Jr. (1982). Developmental Biology. Macmillan, New York.
Schroeder T. E. (1972). The contractile ring. II. Determining its brief existence, volumetric changes, and vital role in cleaving *Arbacia* eggs. J. Cell Biol. **53**, 419—434.
Schroeder T. E. (1973). Cell constriction: Contractile role of microfilaments in division and development. Am. Zool. **13**, 687—696.
Seidel F. (1952). Die Entwicklungspotenzen einer isolierten Blastomere des Zweizellenstadiums im Säugetierei. Naturwissenschaften **39**, 355—356.
Strickland S., Reich E., Sherman M. I. (1976). Plasminogen activator in early embryogenesis: Enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. Cell **9**, 231—240.
Sturtevant A. H. (1923). Inheritance of direction of coiling in *Limnaea*. Science **58**, 269—270.
Sutherland A. E., Calarco-Gillam P. G. (1983). Analysis of compaction in the preimplantation mouse embryo. Dev. Biol. **100**, 327—338.
Sze L. C. (1953). Changes in the amount of deoxyribonucleic acid in the development of *Rana pipiens*. J. Exp. Zool. **122**, 577—601.
Tarkowski A. K., Wróblewska J. (1967). Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8- cell stage. J. Embryol. Exp. Morphol. **18**, 155—180.
Torrey T. (1962). Morphogenesis of the Vertebrates. Wiley, New York.
Tuchmann-Duplessis H., David G., Haegel P. (1972). Illustrated Human Embryology, Vol. 1. Springer-Verlag, New York.
Welsh J. H. (1969). Mussels on the move. Nat. Hist. **78**, 56—59.
White J. G., Amos W. B., Fordham M. (1987). An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structu-

res by fluorescence light microscopy. J. Cell Biol. **105**, 41—48.

Whittaker J. R. (1979). Cytoplasmic determinants of tissue differentiation in the ascidian egg. In: S. Subtelny and I. R. Konigsberg (eds.), Determinants of Spatial Organization. Academic Press, New York, pp. 29—51.

Wiley L. M. (1984). Cavitation in the mouse preimplantation embryo: Na/K ATPase and the origin of nascent blastocoel fluid. Dev. Biol. **105**, 330—342.

Wilson E. B. (1896). The Cell in Development and Inheritance. Macmillan, New York.

Wilson E. B. (1898). Cell lineage and ancestral reminiscences. Biological Lectures of the Marine Biological Laboratory of Woods Hole, Ginn and Co., Boston, pp. 21—42.

Wilson E. B. (1901). Experiments in cytology. II. Some phenomena of fertilization and cell division in etherized eggs. III. The effect on artificial obliteration of the first cleavage furrow. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **13**, 353—395.

Wolpert L., Gustafson T. (1961). Studies in the cellular basis of morphogenesis of the sea urchin embryo: Development of the skeletal pattern. Exp. Cell Res. **25**, 280—300.

Wolpert L., Mercer E. H. (1963). An electron microscopic study of the development of the blastula of the sea urchin embryo and its radial polarity. Exp. Cell. Res. **30**, 280—300.

Zalokar M., Erk I. (1976). Division and migration of nuclei during early embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. J. Microsc. Biol. **25**, 97—106.

Ziomek C. A., Johnson M. H. (1980). Cell surface interactions induce polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. Cell. **21**, 935—942.

Глава 4

Гаструляция: перераспределение клеток

Мой дорогой друг, жизнь несравненно причудливее, чем все, что способно создать воображение человека. Нам и в голову не пришли бы многие вещи, которые в действительности представляют собой нечто совершенно банальное.

А. КОНАН ДОЙЛЬ (1891)[1]

Не рождение, супружество или смерть, а гаструляция на самом деле является наиважнейшим событием в вашей жизни.

ЛЬЮИС ВОЛПЕРТ (1983)

Введение: основные черты гаструляции

Гаструляция представляет собой в высшей степени интегрированный процесс миграции клеток и тканей, приводящий к резкому перераспределению клеток бластулы. Бластула состоит из большого числа клеток, локализация которых определяется в период дробления. Во время гаструляции эти клетки занимают новое положение и приобретают новых соседей. В этот период устанавливается план строения многослойного тела животного. Клетки, которые в будущем образуют энтодермальные и мезодермальные органы, попадают внутрь зародыша, тогда как клетки, из которых возникнут кожа и нервная система, распространяются по его поверхности. Таким образом, три зародышевых листка — наружная эктодерма, внутренняя энтодерма и лежащая между ними мезодерма — впервые формируются в процессе гаструляции. Кроме того, в этот период создаются условия для взаимодействия между ними.

Движения гаструляции охватывают всего зародыша, и миграции клеток в одной его части должны быть очень точно координированы с происходящими одновременно движениями в другой. Характер гаструляции в животном царстве необычайно сильно варьирует, однако осуществляется она при участии сравнительно немногочисленных механизмов. Как правило, при гаструляции наблюдается сочетание нескольких основных типов движений:

Эпиболия. Движение эпителиальных пластов клеток (обычно эктодермальных), которые распространяются как одно целое, а не индивидуально и окружают глубокие слои зародыша.

Инвагинация. Впячивание участка клеточной стенки зародыша подобно тому, как вдавливается внутрь мягкая стенка резинового мяча, когда на него нажимают.

Инволюция. Вворачивание внутрь зародыша увеличивающегося в размерах наружного пласта клеток, который распространяется по внутренней поверхности оставшихся снаружи клеток.

Интрессия (*иммиграция, вселение*). Миграция клеток по отдельности из поверхностного слоя внутрь зародыша.

Деламинация. Расщепление единого клеточного пласта на два более или менее параллельных.

Гаструляция охватывает весь зародыш, открывая эмбриологу неповторимое зрелище хорошо оркестрованного движения клеток. Она также дает возможность анализировать механизмы взаимодействия между различными областями зародыша. Поскольку мы рассматриваем феномен гаструляции

---

[1] Цитировано по переводу на русский язык: Артур Конан Дойль. «Установление личности», т. 1, с. 315, М.: Издво «Правда», 1966. — *Прим. перев.*

в разных типах зародышей, мы не можем не задуматься над следующими вопросами (Trinkaus, 1984):

1. *Что является единицей миграционной активности?* Зависит ли миграция от движения отдельных клеток или же эти клетки составляют лишь часть мигрирующего пласта? Каким бы ни показалось это на первый взгляд удивительным, но независимые от образования клеток цитоплазматические факторы могут полностью контролировать региональные миграционные свойства цитоплазмы. Ф. Лилли (Lillie, 1902) удалось вызвать партеногенетическую активацию яиц кольчатого червя *Chaetopterus* и подавить в них деление клеток. Однако даже в отсутствие клеток происходили многие события раннего развития. Цитоплазма зиготы делилась на определенные области, и в соответствующих местах дифференцировались реснички. Более того, светлая цитоплазма, локализованная в анимальной области яйца, перемещалась книзу над вегетативными участками, напоминая эпиболию клеток анимального полушария при нормальном развитии. Это движение наблюдалось точно в то время, когда должна была происходить эпиболия у нормального зародыша. Таким образом, эпиболия (по крайней мере в некоторых отношениях) не зависит от формирования клеток, образующих мигрирующую область.
2. *Обусловливают ли растяжение клеточного пласта или образование складки в нем факторы, заключенные в самом пласте, или же эти процессы являются результатом действия внешних сил, растягивающих или разрушающих пласт?* Знать ответ на этот вопрос крайне важно, если мы хотим понять, каким образом интегрируются разные движения гаструляции. Например, втягивают ли вслед за собой клетки, претерпевающие инволюцию, клетки, движущиеся по поверхности, или движения инволюции и эпиболии не зависят одно от другого?
3. *Происходит ли активное распространение всей ткани или активно распространяется только ее ведущий край, а вся остальная часть клеточного пласта тянется за ним пассивно?*
4. *Являются ли изменения в форме и подвижности клеток в период гаструляции результатом изменений в свойствах клеточной поверхности, таких, как адгезивность к субстрату или другим клеткам?* Эти изменения включают в себя взаимоотношения одних клеток с другими и с окружающей их внеклеточной средой.
5. *Как эти изменения проявляются на внутриклеточном уровне? Необходима ли реорганизация массы микротрубочек или микрофиламентов для начала миграции клеток?*

Помня об этих вопросах, рассмотрим теперь различные формы гаструляции у иглокожих, амфибий, птиц и млекопитающих [1].

Гаструляция у морского ежа

Бластула у морского ежа образована одним слоем, содержащим от 1000 до 2000 клеток. Эти клетки, происходящие из разных участков зиготы, различаются по своим размерам и свойствам. На рис. 4.1 показана судьба различных участков зиготы на разных стадиях развития, начиная со стадий дробления и гаструляции и кончая характерной для морского ежа личинкой плутеусом. На этом рисунке можно также проследить судьбу каждого клеточного слоя по его движениям в период гаструляции.

Выселение первичной мезенхимы

Примерно через 24 ч после вылупления бластулы из оболочки оплодотворения вегетативный участок стенки сферической бластулы начинает уплощаться. В центре этой плоской **вегетативной пластинки** находится скопление мелких клеток, на поверхности которых, обращенной в бластоцель, появляются длинные тонкие (30 × 5 мкм) выросты, называемые **филоподиями**. Растягиваясь и сокращаясь, филоподии совершают пульсирующие движения. Затем клетки отделяются друг от друга и мигрируют в бластоцель. Они называются **первичной мезенхимой** и происходят из микромеров (рис. 4.2).

Густафсон и Волперт (Gustafson, Wolpert, 1961) с помощью цейтраферной киносъемки проследили под микроскопом движения этих клеток в бластоцеле. Сначала движения мезенхимных клеток вдоль стенок клеток бластоцеля имеют, вероятно, случайный характер. С помощью филоподий они то активно устанавливают связь со стенками бластоцеля, то прекращают ее. В конце концов эти клетки локализуются в центральной области бластоцеля, где контакты их филоподий со стенкой бластоцеля, по-видимому, становятся наиболее прочными. Затем клетки первичной мезенхимы сливаются в **синцитиальные тяжи** (позже они будут называться скелетными иглами), которые образуют впоследствии оси известковых спикул личиночного скелета (рис. 4.3).

События, происходящие в цитоплазме и на поверхности клеток, являются ключевыми для выселения и миграции первичных мезенхимных клеток. Густафсон и Волперт (Gustafson, Wolpert, 1967) предложили модель, согласно которой иммиграция микромеров происходит благодаря изменениям их адгезивных

[1] Обсуждение гаструляции у дрозофилы отложено до гл. 18, в которой она рассматривается в связи с формированием характерных черт развития у этих насекомых.

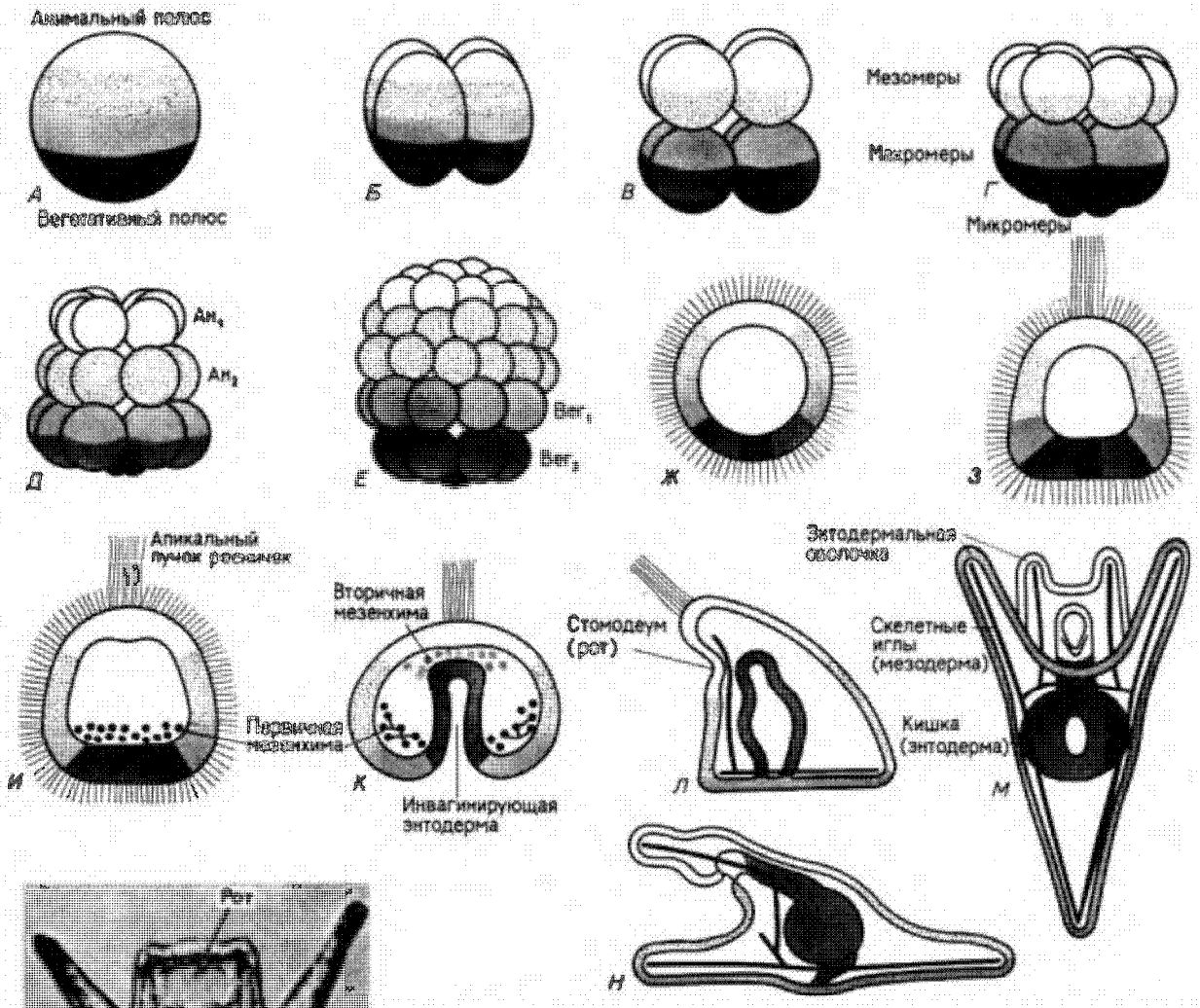


Рис. 4.1. Схематические рисунки нормального развития морского ежа, позволяющие проследить судьбу различных групп клеток бластулы. *А—Е*. Период дробления до стадии 64 бластомеров (стадия 2 бластомеров опущена). *Ж*. Ранняя бластула, покрытая ресничками. *З*. Поздняя бластула с апикальным пучком ресничек и уплощенной вегетативной пластинкой. *И*. Бластула с первичной мезенхимой. *К*. Гаструла с вторичной мезенхимой. *Л*. Личинка на стадии призмы. *М, Н*. Личинка на стадии плутеуса. Судьба различных участков цитоплазмы зиготы (рис. *А*), показанных белым, различными оттенками серого и черным цветом, может быть прослежена в течение всего развития. *О*. Микрофотография живой личинки морского ежа на стадии плутеуса. (*А—Н* — по Hörstadius, 1939; фотография с любезного разрешения G. Watchmaker.)

свойств по отношению к другим клеткам и окружающему их внеклеточному матриксу. Первоначально все клетки бластулы соединены по своей наружной поверхности с **гиалиновым слоем** (возникающим при оплодотворении из кортикальных гранул), а по внутренней — с **базальной мембраной** (внеклеточным матриксом, секретируемым клетками). Внеклеточный матрикс нельзя увидеть в световом микроскопе, но его можно обнаружить с помощью сканирующего электронного микроскопа (рис. 4.4). С боковых сторон каждая клетка имеет в качестве соседа другую клетку. Финк и Мак-Клей (Fink, McClay, 1985) подтвердили предположение Густафсона и Волперта, измерив силу адгезии бластомеров морского ежа с гиалиновым слоем, базальной мембраной и с другими клетками. Они обнаружили, что потомки макромеров и мезомеров очень прочно связаны друг с другом и с гиалиновым слоем, но

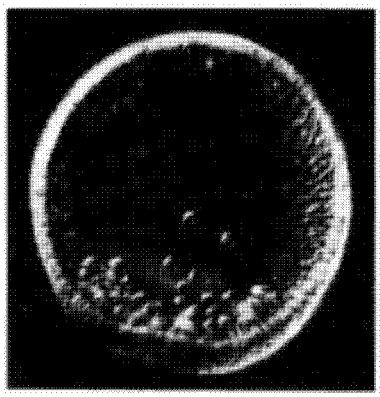


Рис. 4.2. Мезенхимная бластула морского ежа *S. purpuratus*. (С любезного разрешения M. Harkey.)

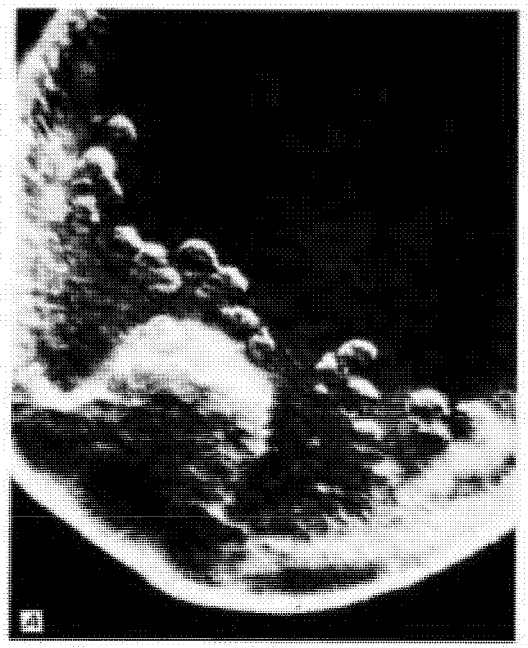


Рис. 4.3. Формирование спикулярных тяжей и скелетных игл из мезенхимных клеток у морского ежа *S. purpuratus*. *А*. Мезенхимные клетки выстраиваются в одну линию и сливаются, секретируя затем матрикс известковой спикулы. *Б*. Изолированные мезенхимные клетки, образующие скопления (фотография получена с помощью фазово-контрастного микроскопа). *В*. Тот же участок (микрофотография в поляризованном свете); видны спикулы, формирующиеся в скоплениях клеток. (Из Harkey, Whiteley, 1980; фотографии с любезного разрешения авторов).

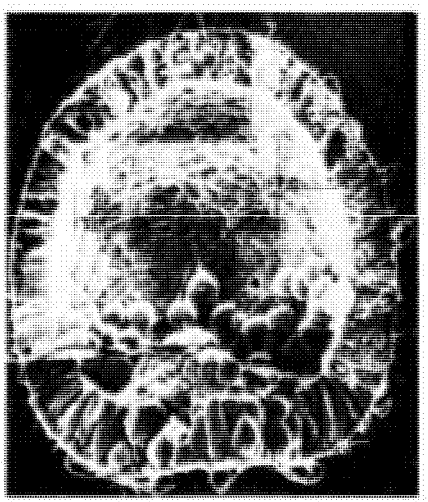


Рис. 4.4. Мезенхимная бластула *Lytechinus variegatus*; видны гиалиновый слой (снаружи) и обширная базальная мембрана в бластоцеле. Фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Из Morrill, 1986; фотография с любезного разрешения J. B. Morrill.)

очень рыхло — с базальной мембраной (табл. 4.1). Характер связывания микромеров на стадии бластулы вначале был сходным. Однако в ходе гаструляции адгезивные свойства микромеров менялись. И если другие клетки сохраняли плотную связь с гиалиновым слоем и с соседними клетками, то микромеры гаструлы теряли свое сродство к этим структурам (оно уменьшалось до 2% первоначального значения), а сродство к базальной мембране *увеличивалось* в 100 раз. Эти изменения свойств микромеров приводят к тому, что они открепляются от наружного гиалинового слоя и от своих соседей и, притягиваемые базальной мембраной, мигрируют в бластоцель (рис. 4.5). Изменения в сродстве коррелировали

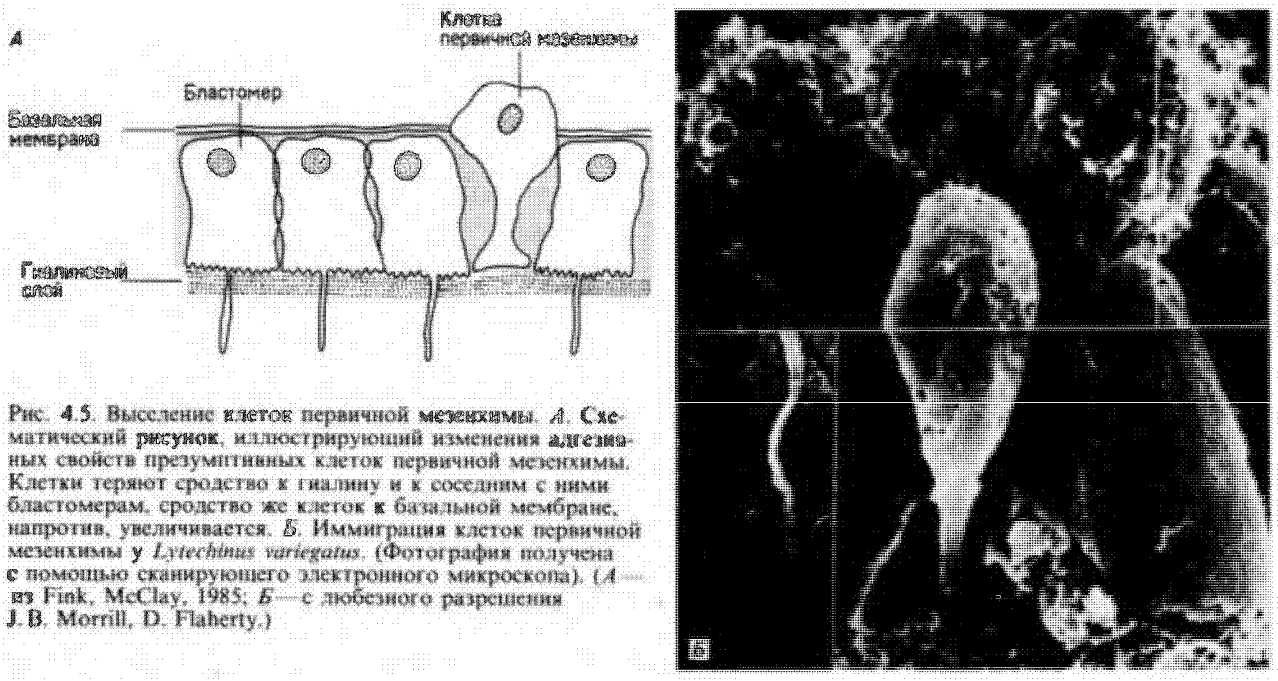


Рис. 4.5. Выселение клеток первичной мезенхимы. *А*. Схематический рисунок, иллюстрирующий изменения адгезивных свойств презумптивных клеток первичной мезенхимы. Клетки теряют сродство к гиалину и к соседним с ними бластомерам, сродство же клеток к базальной мембране, напротив, увеличивается. *Б*. Иммиграция клеток первичной мезенхимы у *Lytechinus variegatus*. (Фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа). (*А* — из Fink, McClay, 1985; *Б* — с любезного разрешения J.B. Morrill, D. Flaherty.)

Таблица 4.1. Сродство мезенхимных и немезенхимных клеток к клеточным и неклеточным компонентам[1] (Fink, McClay, 1985)

Тип клеток	Сила смещения, дин		
	Гиалин	Мономеры клеток гаструлы	Материал базальной мембраны
Микромеры со стадии 16 клеток	5.8×10^{-5}	6.8×10^{-5}	4.8×10^{-7}
Стадия миграции мезенхимных клеток	1.2×10^{-7}	1.2×10^{-7}	1.5×10^{-5}
Эктодерма и энтодерма гаструлы	5.0×10^{-5}	5.0×10^{-5}	5.0×10^{-7}

[1] Клетки помещали на пластинки, на которых находились либо гиалин, либо материал базальной мембраны, либо клеточные мономеры. После прилипания клеток к субстрату пластинки переворачивали и центрифугировали с разной скоростью, чтобы вызвать смещение этих клеток. Силу, требующуюся для их смещения, вычисляли по скорости центрифугирования, необходимой для удаления испытуемых клеток с субстрата.

с происходившими в это время изменениями в составе молекул клеточной поверхности. Антиген клеточной поверхности, Мезо 1, обнаруживался точно тогда, когда наблюдалась миграция мезенхимных клеток из стенки бластулы (рисунок на внутренней стороне обложки).

Как видно из рис. 4.4, вокруг вселяющихся в бластоцель клеток первичной мезенхимы концентрируется внеклеточный матрикс (Galileo, Morrill, 1985). Кроме того, попав внутрь бластоцеля, первичные мезенхимные клетки с помощью филоподий мигрируют по внеклеточному матриксу (рис. 4.6; Galileo, Morrill, 1985; Karp, Solursh, 1985). По-видимому, для их миграции важны два белка. Один из них — **фибронектин**, высокомолекулярный (400 000 дальтон) гликопротеин, который является обычным компонентом базальных мембран, в том числе и базальной мембраны у морского ежа (Wessel et al., 1984). Финк и Мак-Клей (Fink, McClay, 1985) показали, что во время гаструляции сродство микромеров к этому белку резко возрастает, а Като и Хайяши (Katoh, Hayashi, 1985) обнаружили, что миграция мезенхимных клеток зависит от концентрации фибронектина. Второй набор молекул — это сульфатированные гликопротеины, обнаруженные на клеточной поверхности выселяющихся в бластоцель мезенхимных клеток (Sugiyama, 1972; Heifetz, Lennarz, 1979). Если синтез (или сульфатирование) этих гликопротеинов подавлен, то мезенхимные клетки будут выселяться в бластоцель, но не станут двигаться в нем (Karp, Solursh, 1974; Anstrom et al., 1987; рис. 4.7).

Гиббинс и др. (Gibbins et al., 1969) показали, что для формирования и миграции мезенхимных клеток чрезвычайно важное значение имеет ориентация микротрубочек. В клетках ранней бластулы микротрубочки распределены асимметрично вдоль длинной оси клетки (рис. 4.8). По мере того как клетки первичной мезенхимы приобретают амебоидную форму и теряют контакт с бластодермой, микротрубочки

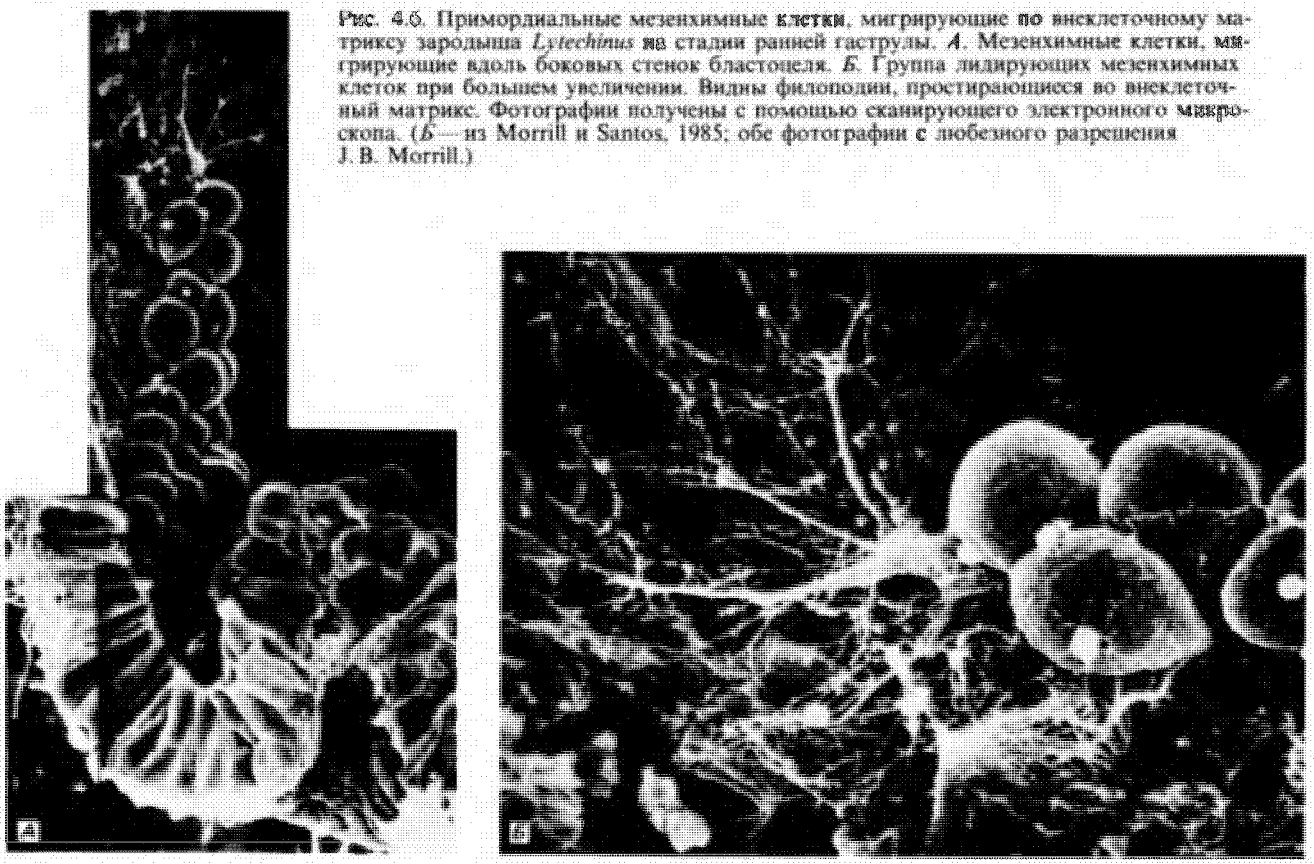


Рис. 4.6. Примордиальные мезенхимные клетки, мигрирующие по внеклеточному матриксу зародыша *Lytechinus* на стадии ранней гаструлы. *А*. Мезенхимные клетки, мигрирующие вдоль боковых стенок бластоцеля. *Б*. Группа лидирующих мезенхимных клеток при большем увеличении. Видны филоподии, простирающиеся во внеклеточный матрикс. Фотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа. (*Б* — из Morrill и Santos, 1985; обе фотографии с любезного разрешения J. B. Morrill.)

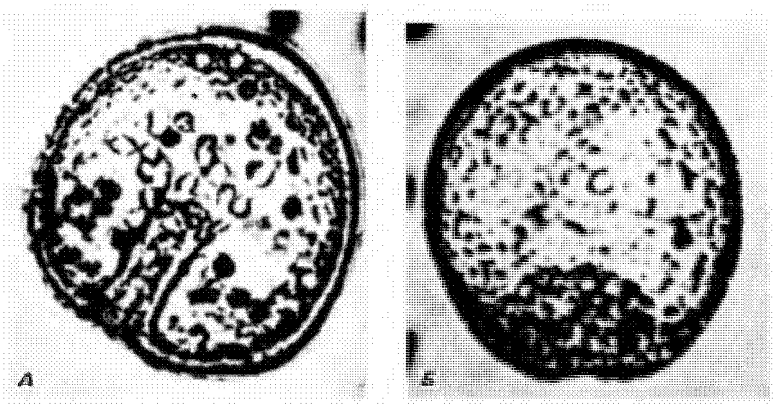


Рис. 4.7. Влияние отсутствия сульфата на движение клеток первичной мезенхимы у морского ежа *Lytechinus*. *А*. Нормальная гаструла. *Б*. Аномальная гаструла, образующаяся при инкубации яиц в морской воде без сульфата. (Из Karp, Solursh, 1974; фотографии с любезного разрешения M. Solursh.)

утрачивают свою ориентацию и их расположение становится случайным. Микротрубочки перемещаются в область филоподий мигрирующих клеток и позже обнаруживаются в синцитиальных тяжах. Если эти микротрубочки разрушить (например, колхицином), то мезенхимные клетки теряют свои филоподиальные отростки и миграция прекращается (Tilney, Gibbins, 1969).

Первая фаза инвагинации

Пока в вегетативной области бластоцеля формируется кольцо клеток первичной мезенхимы, в клетках, которые остаются в вегетативной пластинке, происходят важные изменения. Эти клетки связаны между собой и с гиалиновым слоем яйца и движутся, чтобы заполнить пространства, образованные в ре-

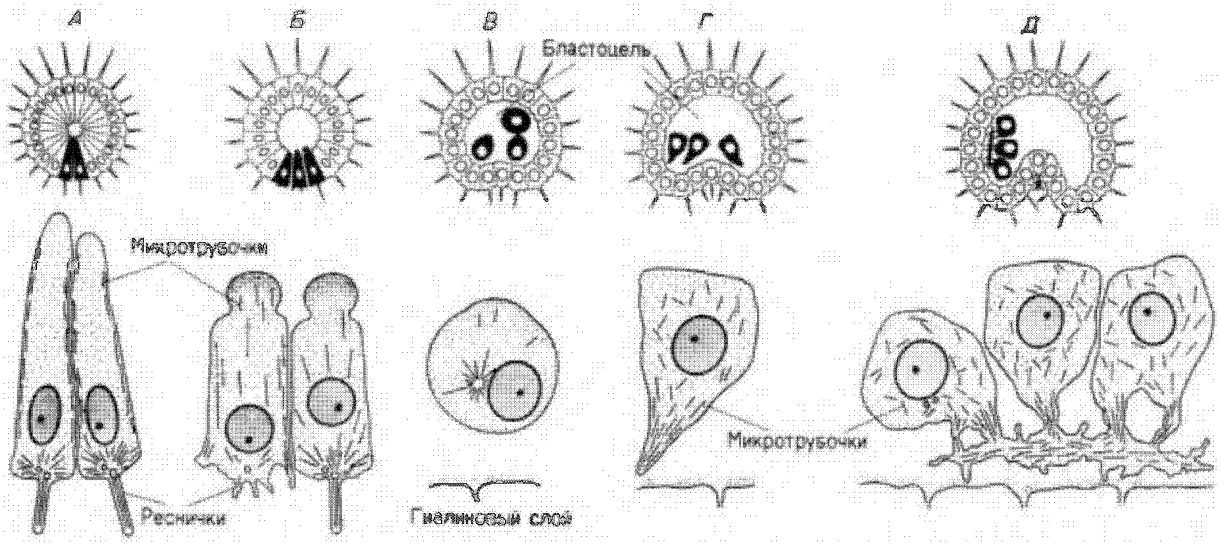


Рис. 4.8. Схематические рисунки, иллюстрирующие выселение клеток первичной мезенхимы (обозначены черным цветом; более детальные изображения даны в нижнем ряду рисунков) и переориентацию микротрубочек. *А*. Ранняя бластула. Микротрубочки ориентированы параллельно длинной оси клеток, на дистальных концах клеток образовались реснички. *Б*. Поздняя бластула. Реснички исчезают, и клетки начинают округляться. *В*. Мезенхимная бластула. Micromeres отделяются от гиалинового слоя и проникают в бластоцель. *Г*. Ранняя гаструла с подвижными клетками. *Д*. Средняя гаструла. Формируется спицатий; отложение скелетного матрикса еще не началось. (По Gibbins et al., 1969.)

зультате иммиграции мезенхимы; поэтому пластинка продолжает уплощаться. Далее она изгибается и впячивается в бластоцель примерно на 1/4—1/2 своего пути (рис. 4.9). Затем инвагинация внезапно прекращается. Инвагинировавшая область называется **архентеропом** или **гастроцелем**, а отверстие архентерона в вегетативной области называется **бластопором**.

Эта первая фаза инвагинации вегетативной пластинки, по-видимому, обусловлена силами, заключенными в самой вегетативной пластинке, и никак не связана с давлением клеток, лежащих над нею. Мур и Барт (Moore, Burt, 1939) разрезали зародышей иглокожих на анимальную и вегетативную половины. Вегетативная половина начинала инвагинировать даже в отсутствие анимальной половины. Инвагинация при этом достигала только 1/4—1/3 расстояния до анимального полюса, т. е. была примерно такой же величины, как и на первой фазе инвагинации при нормальном развитии (рис. 4.10). По мере того как впячивание углублялось, края разреза вегетативной половины вворачивались внутрь и сливались, так что в результате формировалась миниатюрная «гаструла».

Предположение Мура (Moore, 1941), что эта фаза инвагинации обусловлена различиями в когезивности клеток, получило поддержку в исследованиях Густафсона и Волперта (Gustafson, Wolpert, 1961), про-

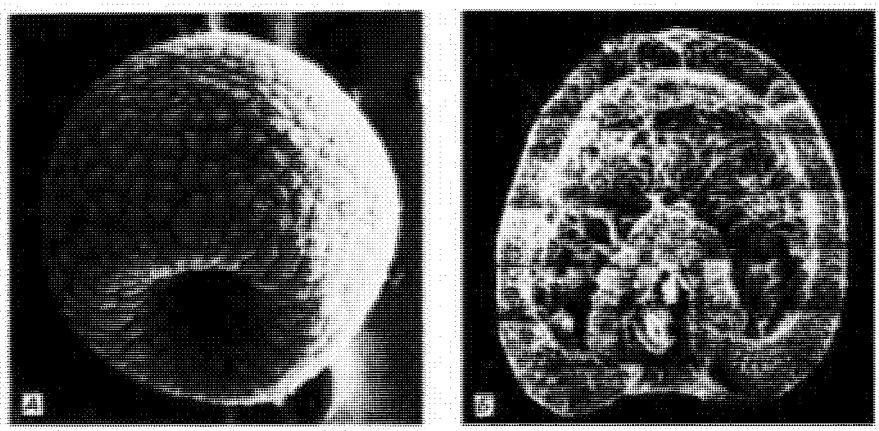


Рис. 4.9. Инвагинация вегетативной пластинки у *Lytechinus variegatus*. *А*. Наружная поверхность ранней гаструлы; можно различить отдельные клетки, видна инвагинация вегетативной пластинки (фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа). *Б*. Монтаж фотографий, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа. Изображен поперечный срез через центр зародыша. На этом срезе видны клетки первичной мезенхимы, мигрирующие по внеклеточному матриксу. (Из Morrill, Santos, 1985; фотографии с любезного разрешения J. B. Morrill.)

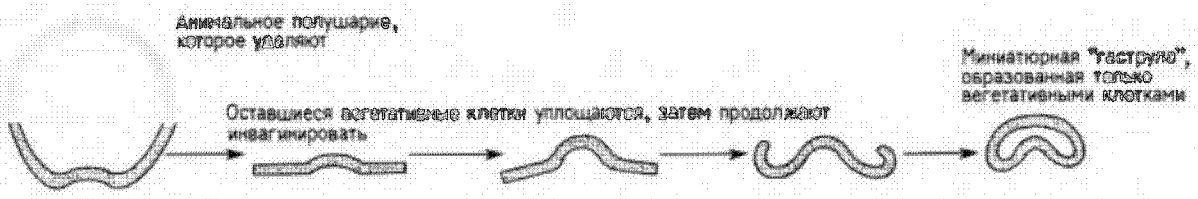


Рис. 4.10. Инвагинация вегетативной пластинки в отсутствие анимального полушария. У морской звезды *Patiria* на стадии гаструлы были изолированы вегетативные участки. Они с успехом инвагинировали, не будучи прикрепленными к анимальному полушарию. (По Moore, Burt, 1939.)

веденных с помощью цейтраферной съемки. Их фильм показал, что цилиндрические клетки вегетативной пластинки утрачивают свой контакт с другими клетками и с гиалиновым слоем; это изменение приводит к увеличению поверхности клеточного пласта. Авторы полагают, что очень плотный контакт между клетками вегетативной пластинки по их внутренней поверхности вызывает изгиб пластинки внутрь, а не наружу.

Вторая фаза инвагинации

Инвагинация клеток вегетативной половины разделяется на две отчетливо различающиеся фазы. После короткой паузы начинается вторая фаза формирования архентерона. В течение этой фазы происходит чрезвычайно резкое удлинение архентерона, его длина почти утраивается, и короткий широкий зачаток архентерона трансформируется в длинную тонкую трубку; однако при этом не заметно, чтобы формировались новые клетки. Такое растяжение обусловлено перераспределением его клеток посредством миграции одних клеток по другим и их уплощения (Ettensohn, 1985; Hardin, Cheng, 1986). У некоторых (но не у всех) видов морских ежей (Schroeder, 1981; Trinkaus, 1984) направление, в котором удлиняется гастроцель, может быть задано **клетками вторичной мезенхимы**, которые формируются на верхушке архентерона и остаются там (рис. 4.11). Филоподии этих клеток, простираясь через жидкость, содержащуюся в бластоцеле, устанавливают контакт с поверхностью его внутренней стенки. Они прикрепляются к стенке в промежутках между клетками бластодермы и затем укорачиваются.

Когда передний край архентерона приближается к стенке бластоцеля в анимальной области, клетки

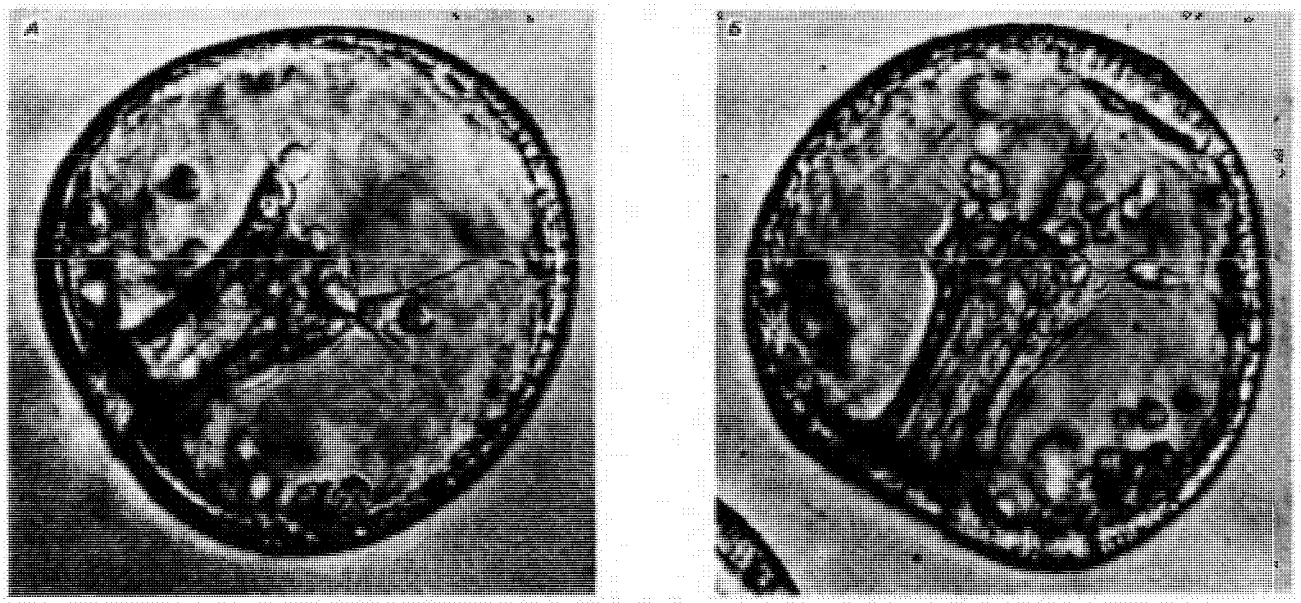


Рис. 4.11. Зародыш морского ежа *Lytechinus pictus* на стадии средней гаструлы. Можно видеть филоподиальные отростки клеток вторичной мезенхимы, тянущиеся от верхушки гастроцеля к наружной стенке бластоцеля. *А*. Мезенхимные клетки с филоподиями, простирающимися от верхушки гастроцеля в бластоцель. *Б*. Тяжи филоподий, соединяющие верхушку гастроцеля с наружной стенкой бластоцеля. О натяжении филоподий можно судить по уплощению стенки бластоцеля в месте их прикрепления. (Фотографии с любезного разрешения С. Ettensohn.)

вторичной мезенхимы рассеиваются в бластоцеле, где происходит их пролиферация, необходимая для формирования ими мезодермальных органов. На месте контакта архентерона со стенкой бластоцеля со временем формируется ротовое отверстие, которое, сливаясь с архентероном, образует непрерывную пищеварительную трубку. Таким образом, бластопор, как это характерно для вторичноротых, маркирует положение ануса.

При гаструляции у морского ежа наблюдается сочетание нескольких процессов, а именно иммиграция мезенхимных клеток, независимой инвагинации клеток вегетативной пластинки и дальнейшей инвагинации архентерона, опосредованной перераспределением клеток эпителиального пласта.

Гаструляция у амфибий

Изучение гаструляции у амфибий является одной из старейших и вместе с тем одной из новейших областей экспериментальной эмбриологии; гаструляция у амфибий широко изучалась в течение прошлого столетия, однако бо́льшая часть наших теорий, касающихся механизмов этих морфогенетических движений, была пересмотрена в семидесятые годы. Изучение гаструляции у амфибий осложняется тем, что строение зародышей бесхвостых и хвостатых амфибий на этих стадиях несколько различается и они используют разные средства для достижения одной и той же цели (Smith, Malacinski, 1983; Lundmark, 1986). В последние годы наиболее интенсивные исследования проводились на *Xenopus laevis* (гладкой шпорцевой лягушке), поэтому мы сконцентрируем внимание на способе гаструляции у этого вида.

Подготовка клеток к гаструляции осуществляется в период дробления. Как упоминалось в гл. 3, у амфибий на стадии перехода к средней бластуле происходит перестройка клеточного цикла, он замедляется (в результате включения в него фаз G_1 и G_2), деления клеток становятся асинхронными, клетки приобретают способность перемещаться, и впервые в жизни животного в ядрах клеток происходит транскрипция новых мРНК. У *Xenopus laevis* эта перестройка начинается непосредственно после 12-го деления дробления (Newport, Kirschner, 1982).

Движения клеток в период гаструляции у амфибий: обзор

Перед бластулой амфибий встают те же задачи, что и перед бластулой иглокожих, а именно: нужно привести внутрь зародыша области, предназначенные для образования энтодермальных органов, окружить зародыш клетками, способными к формированию эктодермы, и поместить между ними в надлежащие места мезодермальные клетки. Движения, посредством которых это достигается, могут быть визуализированы методом витального окрашивания. В. Фогт (Vogt, 1929) насыщал кусочки агара красителями, такими, как нейтральный красный или нильский голубой сернокислый, которыми можно окрашивать клетки зародыша, не повреждая их. Окрашенные кусочки агара затем помещали на поверхность бластулы, и часть красителя из них переходила в клетки, контактирующие с этими кусочками (рис. 4.12). Движения каждой группы окрашенных клеток были прослежены в течение периода гаструляции и результаты этих движений суммированы в форме карты презумптивных зачатков. Эти карты недавно подтверждены результатами наблюдений с помощью сканирующего электронного микроскопа и методом инъекции красителей (Smith, Malacinski, 1983; Lundmark, 1986).

Исследования Лёвтрупа (Løvtrup, 1975; Landstrom, Løvtrup, 1979) и Келлера (Keller, 1975, 1976) с использованием витальных красителей показали, что клетки бластулы шпорцевой лягушки имеют разную судьбу в зависимости от того, находятся ли они в глубоком или в поверхностном слоях зародыша (рис. 4.13). У шпорцевой лягушки (но не у аксолотля или некоторых других амфибий) предшественники мезодермы находятся в глубоком слое клеток, тогда как эктодерма и энтодерма происходят из наружного слоя клеток зародыша. Предшественники хорды и других мезодермальных тканей локализованы под поверхностью в экваториальной (маргинальной, или краевой) области зародыша. У хвостатых амфибий (таких, как тритоны или аксолотли) предшественники хорды и мезодермы обнаружены как в поверхностных, так и в глубоких краевых клетках (Landstrom, Løvtrup, 1979; Keller, 1976).

У зародышей лягушки гаструляция начинается на будущей спинной стороне зародыша, чуть ниже экватора, в области серого серпа (рис. 4.14). Здесь происходит инвагинация энтодермальных клеток с образованием бластопора. Форма этих клеток чрезвычайно резко изменяется. Основная часть тела каждой клетки смещается внутрь зародыша, сохраняя в то же время контакт с наружной поверхностью посредством узкого цитоплазматического тяжа (рис. 4.15). Эти колбовидные клетки окаймляют зачаток архентерона. Следовательно, как и у морского ежа, инвагинация клеток инициирует формирование гастроцеля. Однако в отличие от морского ежа гаструляция у амфибий начинается не в центре вегетативной области, а в краевой зоне вблизи экватора бластулы. Здесь энтодермальные клетки не столь велики и не содержат так много желтка, как большинство вегетативных бластомеров.

Следующая фаза гаструляции включает в себя инволюцию клеток краевой зоны; клетки анимальной области в это время распространяются посредст-

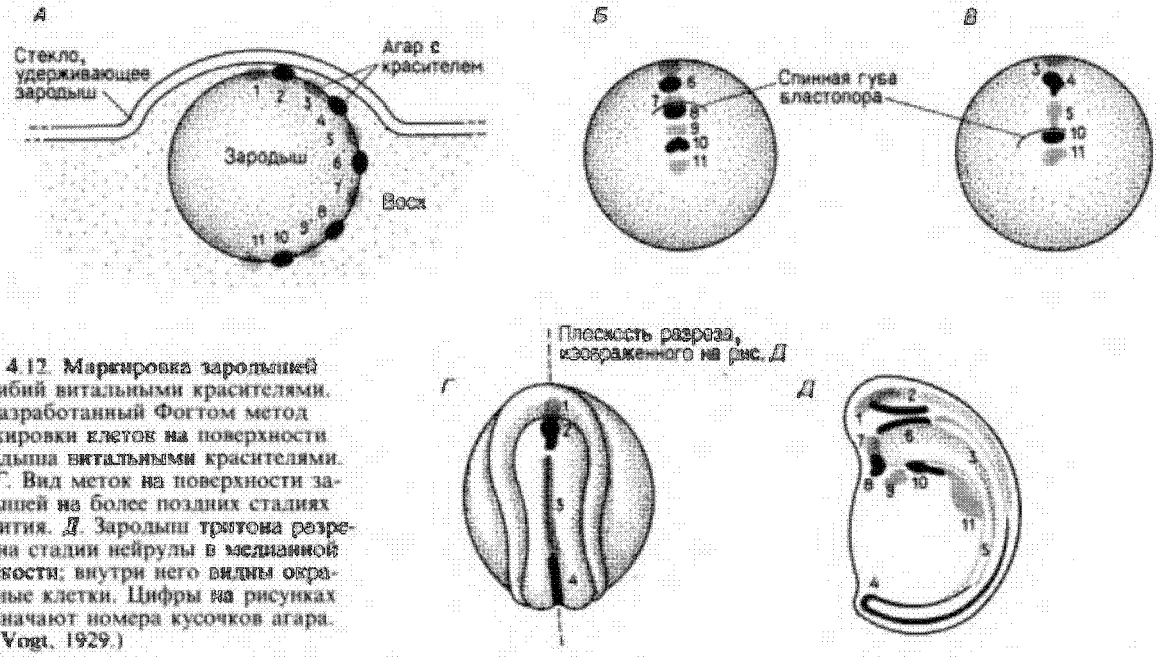


Рис. 4.12. Маркировка зародышей амфибий витальными красителями. *А*. Разработанный Фогтом метод маркировки клеток на поверхности зародыша витальными красителями. *Б—Г*. Вид меток на поверхности зародышей на более поздних стадиях развития. *Д*. Зародыш тритона разрезан на стадии нейрулы в медианной плоскости; внутри него видны окрашенные клетки. Цифры на рисунках обозначают номера кусочков агара. (По Vogt, 1929.)

вом эпиболии, смещаясь к бластопору. Достигнув губы бластопора, мигрирующие клетки краевой зоны вворачиваются внутрь и перемещаются по внутренней поверхности клеток наружного пласта. Таким образом клетки, образующие губу бластопора, постепенно меняются. Первыми клетками в составе спинной губы бластопора являются энтодермальные (материал прехордальной пластинки), которые, инвагинируя, образуют ведущий край архентерона. Эти клетки позже становятся клетками глоточного отдела передней (головной) кишки. После того как эти первые клетки переходят внутрь зародыша, спинная губа бластопора оказывается образованной инволюирующими клетками, впоследствии дающими начало мезодерме головы. Следующие клетки, вворачивающиеся через спинную губу бластопора, называются клетками хордомезодермы. Эти клетки будут формировать хорду — временный мезодермальный «позвоночник», который имеет существенное значение для инициации дифференцировки нервной системы (см. гл. 5 и 8).

По мере перехода новых клеток внутрь зародыша бластоцель оттесняется на сторону, противоположную спинной губе бластопора. Тем временем бластопор смещается в вегетативную область и расширяется по мере того, как все больше клеток анимального полушария сходится к губе бластопора. Расширяющийся бластопор образует боковые губы и, наконец, брюшную губу, через которые проходят внутрь дополнительные мезодермальные и энтодермальные клетки-предшественники. С формированием брюшной губы бластопор приобретает форму кольца, окружающего крупные энтодермальные клетки, которые еще остаются на поверхности (рис. 4.16). Этот остающийся на поверхности участок энтодермы называется желточной пробкой, но и он постепенно оказывается внутри (см. рис. 4.14). К этому моменту все предшественники энтодермы оказываются внутри зародыша, эктодерма окружает ее поверхность, а мезодерма располагается между ними.

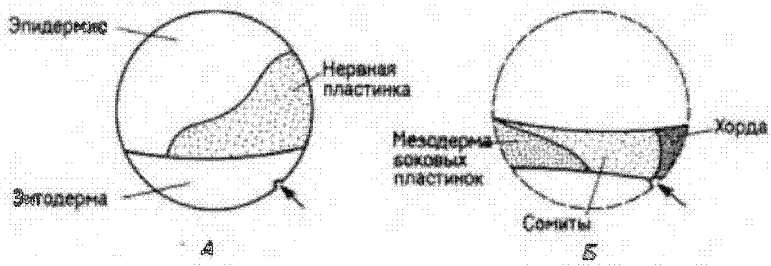


Рис. 4.13. Карта презумптивных зачатков зародыша *Xenopus laevis* на стадии бластулы для поверхностных (*А*) и внутренних (*Б*) клеток, показывающая, что большинство мезодермальных производных формируется из внутренних клеток. Место, где будет образовываться спинная губа бластопора, указано стрелкой. (Из Keller, 1975, 1976.)

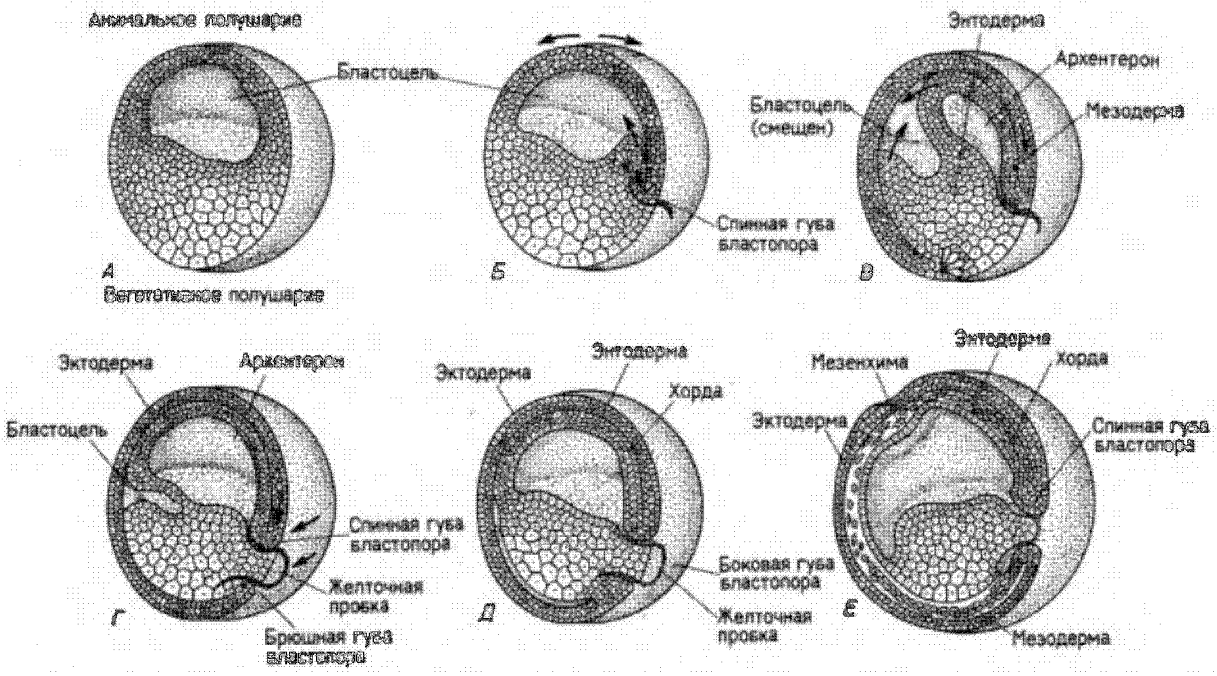


Рис. 4.14. Движения клеток в период гаструляции у лягушки. Разрезы проведены через центр зародыша и повернуты так, что его спинная сторона обращена к читателю. Главные направления движения клеток показаны стрелками. *А*. Бластула. *Б*. Начало гаструляции. Клетки, двигаясь внутрь зародыша, образуют спинную губу бластопора. *В*. Образование гастроцеля. Инволюция клеток через спинную губу бластопора и их дальнейшее движение под крышей бластоцеля приводит к образованию архентерона и смещает бластоцель. *Г*, *Д*. Клетки-предшественники мезодермы инволюируют через брюшную и боковые губы бластопора. Клетки-предшественники эктодермы мигрируют по поверхности вегетативного полушария. Желточная пробка представляет собой единственный участок энтодермы, видимый с поверхности. *Е*. Гаструляция продолжается до тех пор, пока весь зародыш не будет окружен эктодермой и энтодерма не окажется полностью внутри, а мезодермальные клетки не попадут между ними. (По Rugh, 1951; Keller, 1986.)

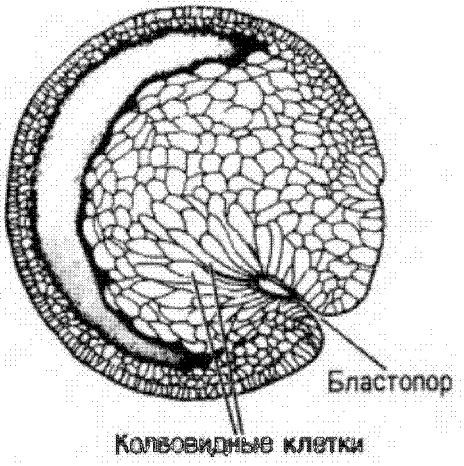


Рис. 4.15. Схематический рисунок, на котором в разрезе изображен гаструлирующий зародыш амфибий; показано распространение колбовидных клеток от бластопора внутрь зародыша. (По Holtfreter, 1943.)

Детерминация положения бластопора

Описав в основных чертах гаструляцию у амфибий, мы можем теперь рассмотреть ее более подробно. Гаструляция в жизни животного не существует как независимый процесс. Подготовка к ней может быть прослежена буквально до момента слияния спермия с яйцом. Неоплодотворенное яйцо обладает анимально-вегетативной полярностью (рис. 2.36, 2.38). На анимальном полюсе пигментированная кортикальная цитоплазма располагается над светлой областью цитоплазмы, содержащей материал, который ранее находился в ядре ооцита. (На стадии метафазы первого деления мейоза этот материал высвобождается вблизи того места, где образуются полярные тельца.) Постепенно этот материал сливается с областью, содержащей большие количества рибосом и митохондрий; ниже находится область цитоплазмы с гранулами гликогена и мелкими желточными пластинками. Вегетативная часть неоплодотворенного яйца содержит более крупные желточные пластинки и окружена светлой кортикальной цитоплазмой.

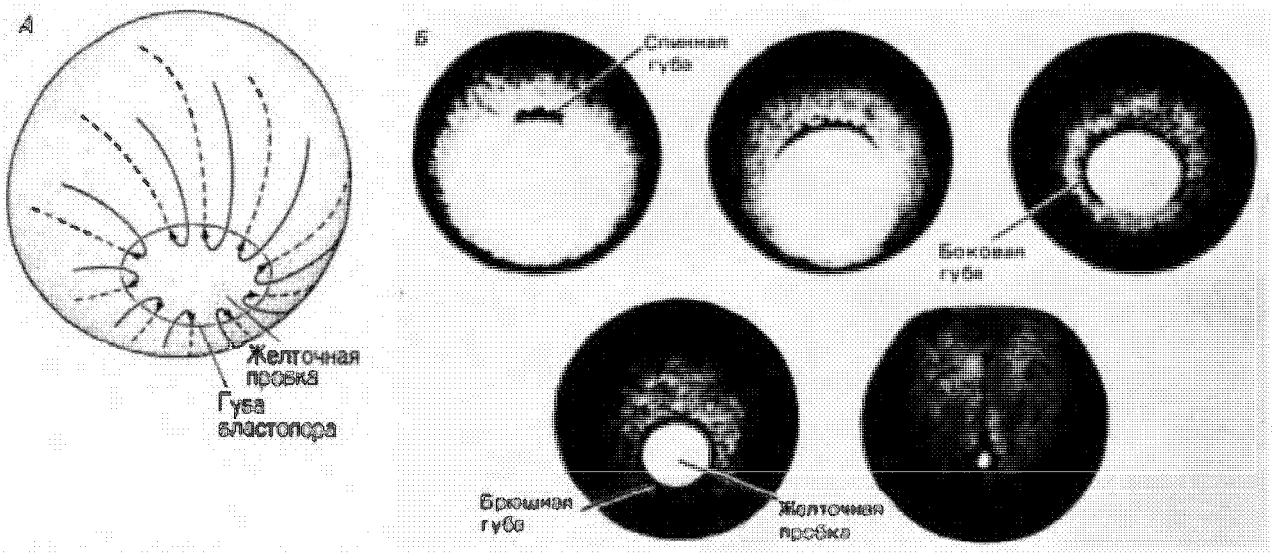


Рис. 4.16. Эпиболия эктодермы. *А*. Морфогенетические движения клеток, мигрирующих через бластопор, а затем движущихся под поверхностью зародыша. *Б*. Изменения, происходящие вблизи бластопора по мере того, как последовательно образуются губы бластопора: спинная, боковые и брюшная. Появление брюшной губы замыкает бластопор в кольцо; эктодерма постепенно оказывается внутри зародыша. (Из Balinsky, 1975; фотография с любезного разрешения автора.)

Судьба этих областей может быть предсказана еще до оплодотворения. Поверхность анимального полушария станет клетками эктодермы (эктодермальный эпителий и нервная система), поверхность вегетативного полушария даст клетки энтодермы (кишечный эпителий и связанные с ним органы), а мезодермальные клетки будут формироваться из внутренней цитоплазмы, лежащей вокруг экватора. Следовательно, зародышевые листки могут быть в общих чертах картированы в неоплодотворенном яйце; но это еще ничего не говорит нам о том, из какой части яйца образуется брюшная часть, а из какой — спинная. Переднезадняя (голова — хвост) и дорсовентральная (спина — живот) оси еще не детерминированы.

Дорсовентральную и переднезаднюю оси детерминирует смещение цитоплазмы зиготы при оплодотворении. В гл. 2 мы обсуждали поворот кортикального слоя цитоплазмы относительно внутренней цитоплазмы яйца у лягушки. Внутренняя цитоплазма остается в прежнем положении из-за большого количества желтка в ней, тогда как кортикальный слой цитоплазмы активно смещается на 30° по отношению к своему первоначальному положению. Этот поворот приводит к тому, что анимально-вегетативная полярность наружного слоя яйца смещается на 30° по отношению к анимально-вегетативной полярности внутренней цитоплазмы. Таким образом возникает новое состояние симметрии. Вместо радиальной симметрии устанавливается двусторонняя, или билатеральная (рис. 4.17).

Та область внутренней цитоплазмы вегетативного полушария, которая теперь лежит под кортикальным слоем цитоплазмы анимального полушария, по-видимому, активизируется и приобретает способность инициировать гаструляцию. Обычно это происходит на стороне, где образуется «серый серп», отстоящий на 180° от места проникновения спермия (рис. 4.17). Сторона, на которой спермий проникает в яйцо, станет брюшной поверхностью зародыша; противоположная сторона, где начинается гаструляция, будет спинной поверхностью зародыша (Gerhart et al., 1981; Vincent et al., 1986; Gerhart et al., 1986).

Для индукции этих движений цитоплазмы яйца спермий не является необходимым. Если искусственно стимулировать дробление энуклеированного яйца, то смещения кортикального слоя в положенное время все же происходит, однако направление его непредсказуемо. (В яйцах, оплодотворенных двумя спермиями, кортекс поворачивается только в одном направлении.) Спермий, по-видимому, дает сигнал для ориентации автономного смещения цитоплазмы в пространстве. Однако смещение цитоплазмы очень существенно: если оно блокировано, то дорсальные осевые структуры не формируются. Направление движения цитоплазмы определяет, какая сторона яйца должна стать спинной, а какая — брюшной (Gerhart et al., 1986; Vincent, Gerhart, 1987).

Направление смещения, определяемое местом проникновения спермия, может быть подавлено путем механического изменения пространственных со-

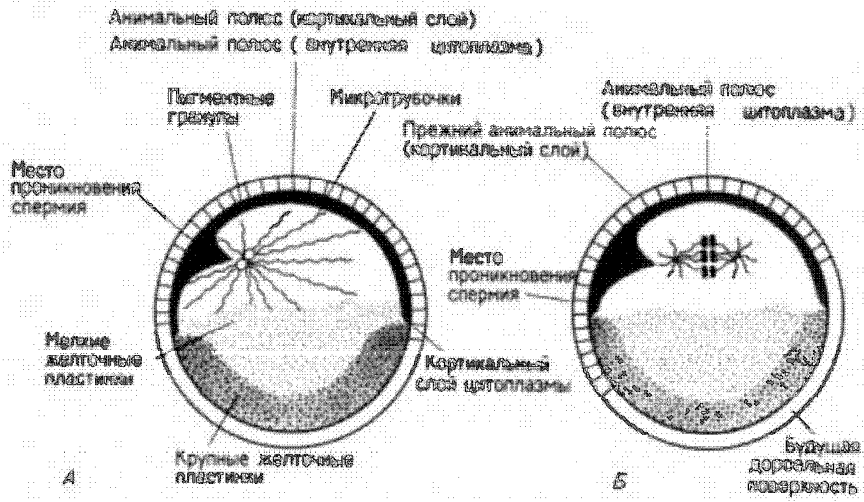


Рис. 4.17. Поворот цитоплазмы зиготы во время цикла первого деления дробления. Зигота в начале (*А*) и незадолго до конца цикла первого деления дробления (*Б*). Кортикальный слой цитоплазмы (заштрихован) смещается по отношению к внутренней цитоплазме. Место, в котором смещение оказывается наибольшим, точно соответствует положению будущей срединнойной линии зародыша. (По Gerhart et al., 1986.)

отношений между кортикальной и субкортикальной цитоплазмой. Это может быть достигнуто таким поворотом яйца, в результате которого внутренние компоненты попадают в разные области яйца (Pflüger, 1883; Penners, Schleip, 1928; Pasteels, 1948; Gerhart et al., 1981). В норме оплодотворенное яйцо ориентировано таким образом, что тяжелые желточные пластинки в вегетативном полушарии в соответствии с действием силы тяжести располагаются в нижней части яйца. Если воспрепятствовать повороту яйца, погрузив его в раствор полисахарида (чтобы обезвоодить перивителлиновое пространство между яйцом и оболочкой оплодотворения), то затем яйцо можно повернуть набок на 90°, так чтобы анимально-вегетативная ось приняла вместо вертикального горизонтальное положение, а место проникновения спермия было обращено кверху (Gerhart et al., 1981; Kirschner, Gerhart, 1981; Cooke, 1986). Если оплодотворенное яйцо остается в таком положении в течение 30 мин, начиная с середины первого цикла деления дробления, то почти у всех зародышей гаструляция начинается на *той же* стороне, на которой спермий проник в яйцо (рис. 4.18).

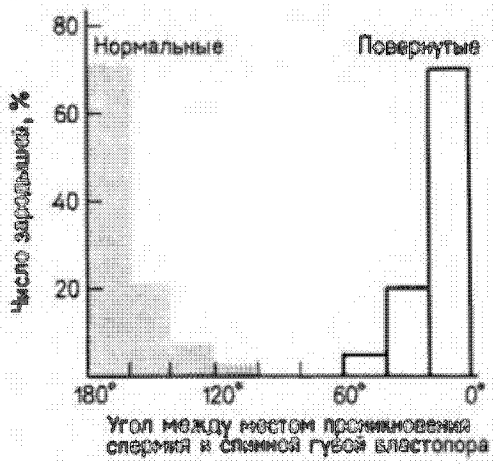


Рис. 4.18. Соотношение между местом проникновения спермия в яйцо и местом закладки спинной губы бластопора у нормальных (серые столбцы) и повернутых (белые столбцы) яиц шпорцевой лягушки. Яйца были оплодотворены, освобождены от студенистой оболочки и помещены в фиколл для обезвоживания перивителлинового пространства. Место проникновения спермия в яйцо помечено красителем. Яйца повернуты на 90°, так что это место обращено кверху. В таком положении яйца находились в течение периода от 50 до 80 мин после оплодотворения. (По Gerhart et al., 1981.)

Роль нормального смещения цитоплазмы можно продемонстрировать в опытах с подавлением этого смещения и последующим наблюдением за зародышами, развивавшимися из таких яиц. Воздействия, вызывающие деполимеризацию микротрубочек (холодовой шок, высокое гидростатическое давление или погружение яиц в нокодазол), блокируют поворот цитоплазмы (Manes et al., 1978). Обработанные таким образом яйца дробятся, но никогда не гаструлируют нормально и не приобретают дорсовентральной полярности. Гаструляция у них протекает симметрично, и они превращаются в трехслойный цилиндр, лишенный спинных компонентов, таких, как сомиты и центральная нервная система. Эти зародыши погибают после того, как будут исчерпаны их запасы желтка (Gerhart et al., 1986). Однако если эти яйца были повернуты на 90° за 40 мин до первого деления дробления (тем самым имитировался нормальный поворот цитоплазмы), то у зародышей формировались нормальные осевые структуры, а гаструляция начиналась на той стороне, которая должна была стать спинной (Sharf, Gerhart, 1983). Перераспределение цитоплазмы в течение первого цикла делений дробления является необходимым условием для нормальной гаструляции.

Как и следовало ожидать из предыдущего обсу-

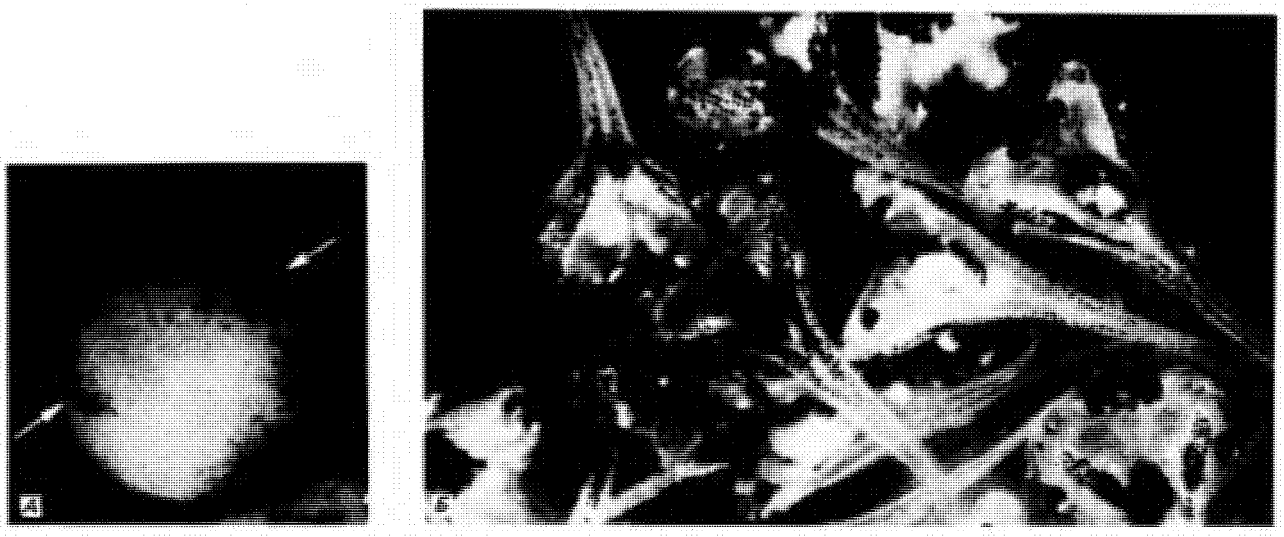


Рис. 4.19. Близнецовые бластопоры, образовавшиеся у одного зародыша в результате поворота яиц шпорцевой лягушки, лишенных студенистой оболочки, брюшной стороной вверх. *А*. Два бластопора, получившие разную информацию для своего образования: одну исходную (напротив места проникновения спермия в яйцо) и одну новую, возникшую в результате смещения цитоплазмы под влиянием центрифугирования. *Б*. В этих яйцах возникли две полные системы осевых структур, из которых образовались близнецы-головастики, соединенные в брюшном отделе. (Фотографии с любезного разрешения J. Gerhart.)

ждения, влияние силы тяжести оказалось возможным дублировать центрифугированием яиц в течение короткого времени (Black, Gerhart, 1985). Оплодотворенные яйца помещали в желатин для их иммобилизации и поворачивали так, чтобы место проникновения спермия в яйцо было либо удалено от ротора центрифуги, либо обращено к нему. Затем эти яйца подвергали слабому вращению (10—50 *g*) в течение 4 мин. Если воздействие оказывали в первые две трети (70%) периода первого цикла делений дробления, то смещение цитоплазмы, вызванное центрифугированием, преобладало над смещением цитоплазматических компонентов, индуцированным проникновением спермия. По прошествии этого времени (т.е. 70%) цитоплазма становится более ригидной и ее смещения под влиянием центрифугирования не наблюдается. Кроме того, если яйца подвергали четырехминутному центрифугированию при 30 *g* в период, равный 40—50% времени прохождения первого клеточного цикла, то возникало два места начала гаструляции, что приводило к развитию частично сросшихся близнецов (рис. 4.19). Блэк и Герхарт (Black, Gerhart, 1986) высказали гипотезу, что образование близнецов вызвано формированием двух областей взаимодействия: одна ось формируется там, где смещенная центрифугированием цитоплазма взаимодействует с лежащими над ней компонентами; другая формируется после того, как цитоплазма, смещающаяся под влиянием силы тяжести, возвращается в свое первоначальное положение, где она реагирует повторно. Близнецы могут также образоваться в нормальных гравитационных условиях, если яйцо поместить местом проникновения спермия кверху, освободив его при этом от оболочки оплодотворения (Gerhart et al., 1981). Возможность влиянием силы тяжести и центрифугированием вызвать образование двух осевых структур в яйцах, вполне нормальных в других отношениях, и, напротив, вызвать образование осевых структур в яйцах, у которых подавлено нормальное смещение цитоплазмы, убедительно свидетельствует о том, что вызванные этими воздействиями внутренние смещения замещают процесс, в норме участвующий в определении места, на котором начнется гаструляция.

Способность зародыша к образованию двух функциональных губ бластопора позволяет утверждать, что область серого серпа (где обычно начинается гаструляция) не является чем-то уникальным. Факторы, индуцирующие гаструляцию, по-видимому, возникают в результате взаимодействия между анимальной и вегетативной цитоплазмой; это взаимодействие, вероятно, активирует некий компонент в субкортикальной вегетативной цитоплазме.

Гимлих и Герхарт (Gimlich, Gerhart, 1984) провели серию опытов с трансплантацией, подтвердивших гипотезу о том, что фактор или факторы, инициирующие гаструляцию, первоначально содержатся в глубокой цитоплазме, а не в кортексе серого серпа. Эти авторы показали, что у зародыша шпорцевой лягушки на стадии 64 бластомеров три наиболее дорсально расположенных вегетативных бластоме-

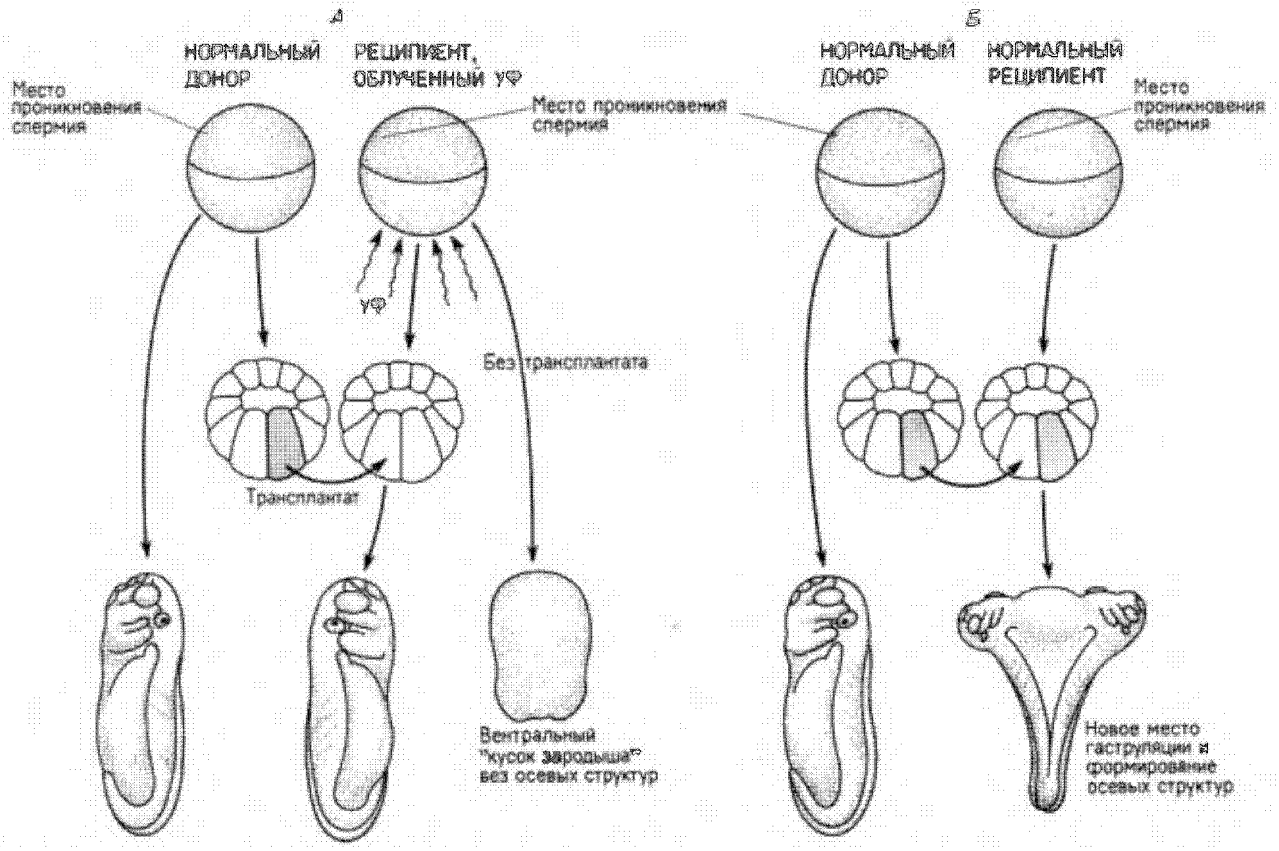


Рис. 4.20. Опыты с трансплантацией, показывающие, что за инициацию гаструляции ответственны вегетативные бластомеры, лежащие под областью проспективной спинной губы бластопора. *А*. Избавление от гибели облученного 64-клеточного зародыша путем пересадки ему вегетативных бластомеров, взятых из наиболее дорсального сегмента (выделен серым цветом) нормального зародыша той же стадии, в углубление, образовавшееся после удаления у него соответствующего числа вегетативных бластомеров. Без такой пересадки у облученного зародыша не происходит нормальной гаструляции. *Б*. Формирование спинной губы бластопора и осевых структур в новом месте после пересадки дорсально лежащих вегетативных бластомеров, взятых от одного зародыша на стадии 64 бластомеров, другому такому же зародышу в вентральную область вегетативного полушария. (По Gimlich, Gerhart, 1984.)

ра способны индуцировать образование спинной губы бластопора и полного комплекса осевых структур у облученных ультрафиолетовым светом реципиентов (которые иначе не могли бы гаструлировать) (рис. 4.20, *А*). Кроме того, эти три бластомера, лежащие под областью проспективной спинной губы бластопора, могут также индуцировать вторичную инвагинацию и образование осевых структур, будучи трансплантированы на брюшную сторону нормального необлученного 64-клеточного зародыша (рис. 4.20, *Б*). Следовательно, эта маленькая группа вегетативных бластомеров ответственна за появление в прилегающих к ним краевых клетках способности инвагинировать и формировать дорсальные мезодермальные структуры зародыша.

Представляется вероятным, что внутреннее перемещение цитоплазмы, ориентация которого в норме определяется проникновением спермия, является причиной асимметричного распределения субклеточных факторов. Эта асимметрия создает в яйце дорсовентральные различия, которые в конечном счете определяют положение бластопора. Кроме того, происходит прогрессивное накопление какого-то фактора (или факторов), необходимого для формирования спинной губы бластопора. Малацински и др. (Malacinski et al., 1980) не обнаружили в дорсальной области оплодотворенного яйца и на ранних стадиях дробления у амфибий активности, необходимой для формирования спинной губы бластопора. Однако такая активность в этой области выявлялась на стадиях средней и поздней бластулы. Ее можно было обнаружить и в вегетативных бластомерах, лежащих в наиболее дорсальном участке 64-клеточного зародыша лягушки. Следовательно, факторы, ответственные за формирование бластопора, по-видимому, локализуются в области, где будет за-

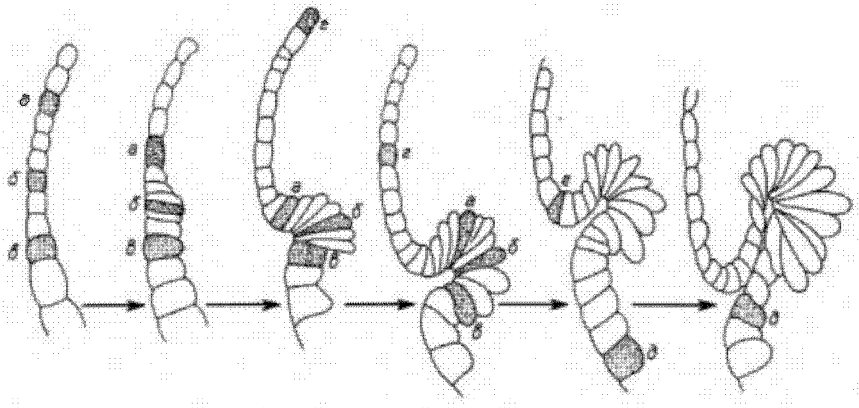


Рис. 4.21. Перемещения клеток при образовании спинной губы бластопора у шпорцевой лягушки. Цейтраферная съемка дает возможность проследить за изменением положения одной и той же клетки с самого начала гаструляции. (По Keller, 1978.)

кладываться бластопор, лишь незадолго до начала гаструляции. Эти вегетативные клетки затем взаимодействуют с клетками, лежащими непосредственно над ними (в области серого серпа), побуждая их гаструлировать и формировать дорсальные осевые структуры.

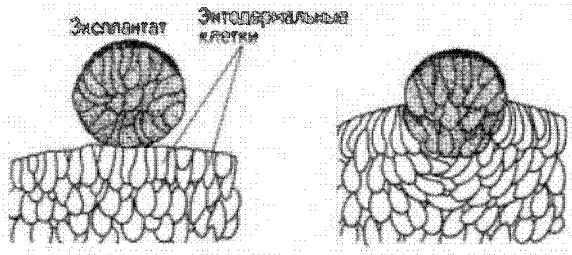
Клеточные движения и образование архентерона

Гаструляция начинается с погружения группы краевых эктодермальных клеток, лежащих на спинной поверхности, внутрь зародыша. Это движение клеток внутрь осуществляется в результате изменения их адгезивных свойств, сходных с изменениями, которые были описаны ранее для клеток вегетативной пластинки у морских ежей. Рис. 4.21 иллюстрирует образование колбовидных клеток в ранней гаструле амфибий.

Поскольку колбовидные клетки остаются в самой глубокой части бластопора и представляются тянущими за собой небольшой бластопор внутрь зародыша, долгое время считали, что именно они играют главную роль в формировании и увеличении размеров архентерона. Румблер (Rhumbler, 1902) предположил, что колбовидные клетки активно мигрируют в центр гаструлы в результате низкого поверхностного натяжения. Они могут также втягивать за собой новые соседние клетки, инициируя таким образом движение клеток внутрь зародыша.

В 1943—1944 гг. выдающийся эмбриолог Иоганн Гольтфретер (Holtfreter, 1943, 1944) получил данные, свидетельствующие о том, что так и происходит на самом деле. Он изолировал клетки ранней губы бластопора и культивировал их на стекле. Округлившиеся концы клеток, прикрепленные к стеклу, вели за собой движение остальной части тела этих клеток. Еще более убедительными были рекомбинационные опыты Гольтфретера, в которых клетки краевой зоны (дающие начало спинной губе бластопора) комбинировали с клетками внутренней энтодермы. Когда клетки дорсальной краевой зоны изолировали и помещали на слой клеток внутренней энтодермы, из будущих клеток спинной губы бластопора формировались колбовидные клетки, которые погружались в энтодерму, опускаясь ниже ее поверхности (рис. 4.22). Кроме того, по мере погружения они создавали углубление, напоминающее бластопор в начале его образования. Таким образом, Гольтфретер доказал, что способность инвагинировать во внутреннюю энтодерму является прирожденным свойством клеток дорсальной краевой зоны.

Сравнительно недавно Р. Келлер показал, что хотя клетки из области серого серпа действительно имеют внутренне присущую им способность инвагинировать в энтодерму, на самом деле колбовидные клетки играют менее активную роль, чем думали раньше. Келлер (Keller, 1981) обнаружил, что после того, как сформировались колбовидные клетки, они не имеют особого отношения к увеличению размеров архентерона; частичное или полное удаление этих клеток не предотвращает инволюции прилежащих



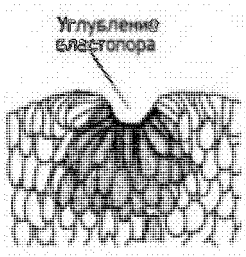


Рис. 4.22. Трансплантат, взятый из области спинной губы бластопора, погружается в слой эктодермальных клеток и формирует в нем углубление бластопора. (По Holtfreter, 1944.)

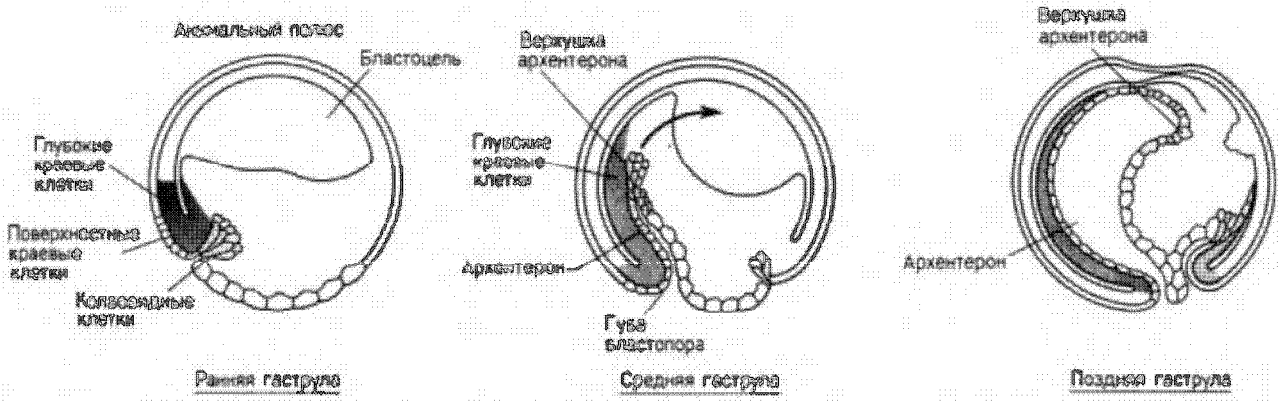


Рис. 4.23. Перемещение глубоких клеток краевой зоны относительно колбовидных клеток в период гаструляции у шпорцевой лягушки. Колбовидные клетки (выделены точками), происходящие из поверхностных эктодермальных клеток краевой зоны, становятся верхушкой архентерона. Инволюирующие клетки, которые образуют мезодерму (обозначены серым цветом), происходят из внутренних (глубоких) клеток краевой зоны. (По Keller, 1981.)

к ним клеток в бластопор. Гаструляция может происходить без колбовидных клеток. Главным фактором движения клеток внутрь зародыша является, вероятно, инволюция лежащих *под его поверхностью* краевых клеток, а не клеток, находящихся на поверхности. Эти лежащие под поверхностью **глубокие инволюирующие краевые клетки** поворачиваются внутрь и мигрируют к анимальному полюсу по внутренним поверхностям еще неинволюировавших глубоких клеток (рис. 4.23), а поверхностный слой формирует выстилку архентерона просто потому, что он прикреплен к активно мигрирующим глубоким клеткам.

Даже если колбовидные клетки в какой-то степени участвуют в формировании первоначального углубления бластопора, движение этих клеток зависит от их прикрепления к лежащим под ними глубоким клеткам. В то время как удаление *колбовидных клеток* не влияет на инволюцию глубоких или поверхностных клеток краевой зоны внутрь зародыша, удаление *глубоких клеток* краевой зоны и их замещение клетками анимальной области (которые в норме не претерпевают инволюции) останавливает формирование архентерона.

На рис. 4.24 делается попытка объединить результаты некоторых сравнительно недавних исследований (Keller, 1978, 1980, 1981; Keller, Schoenwolf, 1977) в виде модели, иллюстрирующей формирование архентерона. Согласно этой модели, во время начальных стадий гаструляции (рис. 4.24, *А*) краевая зона распространяется по направлению к вегетативному полюсу посредством интердигитации (вставления клеток из одного слоя в другой) нескольких слоев глубоких клеток, образующих в результате один тонкий слой. В то же самое время поверхностные клетки распространяются путем деления и уплощения. Морфология глубоких клеток, достигших бластопора, снова меняется, они формируют поток мезодермальных клеток, мигрирующих к анимальному полюсу по внутренней поверхности неинволюирующих глубоких клеток краевой зоны. В течение более поздних стадий гаструляции (рис. 4.24, *Б*) цилиндрические глубокие клетки уплощаются и растягиваются по мере того, как краевая зона продолжает смещаться в вентральном направлении (образуя широкий кольцевидный бластопор вокруг желточной пробки). Поток мезодермальных клеток продолжает мигрировать внутрь, и лежащий над ним слой поверхностных клеток (включая колбовидные) пассивно перемещается за ним в сторону анимального полюса, формируя энтодермальную крышу архентерона. Следовательно, хотя колбовидные клетки, возможно, и ответственны за образование начального углубления бластопора, однако движущая сила инволюции, по-видимому, заключена в глубоком слое краевых клеток. Кроме того, этот глубокий слой, вероятно, определяет продолжающуюся миграцию клеток внутрь зародыша.

Миграция инволюирующей мезодермы

Миграция клеток-предшественников мезодермы внутрь зародыша является частью удивительно хорошо координированной серии глобальных клеточных миграций. Подробная схема этих движений приведена на рис. 4.25. Один из наиболее важных аспектов гаструляции у амфибий — это схождение к центру (*конвергенция*) и удлинение (*растяжение*) **инволюирующей краевой зоны (ИКЗ)**, которая представляет собой область, расположенную непосредственно над губой бластопора. В поверхностном слое этой зоны ($ИКЗ_{пов}$) находится материал энтодермальной крыши архентерона, а ее глубокий слой ($ИКЗ_{гл}$) содержит проспективные мезодермальные клетки (в том числе клетки хорды).

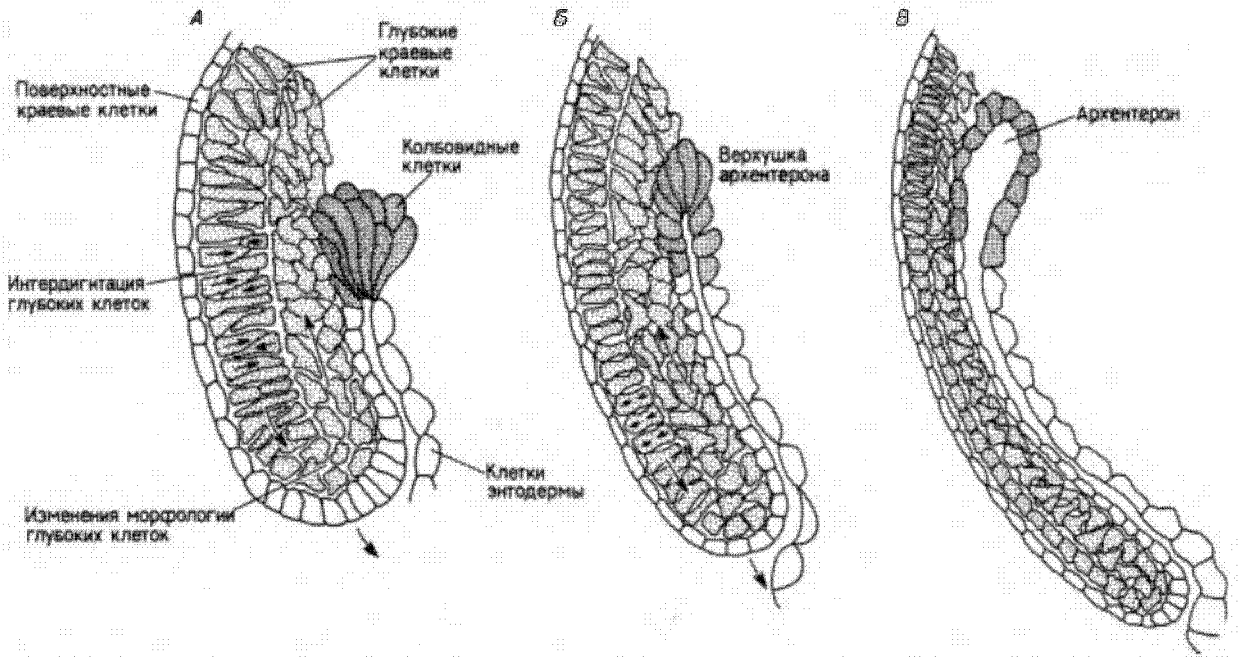


Рис. 4.24. Интегрированная модель клеточных движений в период гаструляции. *А*. Ранняя гаструла характеризуется интердигитацией слоев глубоких клеток краевой зоны и их инволюцией. *Б, В*. Зародыши на более поздних стадиях гаструляции. Глубокие краевые клетки уплощаются, а бывшие поверхностные клетки краевой зоны образуют стенку архентерона (гастроцеля). Колбовидные клетки выделены частыми точками. (По Keller, 1981.)

Во время гаструляции клетки **анимальной** части и **неинволюирующей краевой зоны** распространяются путем **эпиболии**, покрывая весь зародыш. Дорсальная часть **неинволюированных** краевых клеток расширяется быстрее, чем вентральная, заставляя губы бластопора двигаться в вентральном направлении. Клетки из этих двух зон будут формировать эктодерму зародыша. Глубокая **инволюирующая** краевая зона представляет собой кольцо клеток, из которых образуются хорда, головная мезодерма, мезодерма сомитов и боковых пластинок. Во время гаструляции это кольцо инволюирует через губы бластопора, формируя мезодермальную мантию. Клетки-предшественники головной мезодермы, боковой и брюшной мезодермы распространяются во всю ширину зародыша, тогда как материал хорды и сомитов конвергирует в дорсальном направлении, образуя дорсальные осевые структуры. Клетки поверхностной инволюирующей краевой зоны также претерпевают **конвергентное растяжение**, формируя энтодермальные ткани крыши архентерона. Суббластопоральная энтодерма покрывается обрастающими ее клетками неинволюирующей краевой зоны и образует дно архентерона (Keller, 1986).

В процессе конвергентного растяжения ИКЗ$_{п}$ ее клетки сами перестраиваются, вставляясь между прилежащими к ним клетками и создавая тем самым тонкое удлиненное образование вместо первоначально широкой маленькой полоски клеток (рис. 4.26). Мы уже обсуждали сходный феномен при описании гаструляции у морского ежа, включающий в себя растяжение архентерона. Из многочисленных рядов клеток путем интеркаляции образуется меньшее число более длинных рядов клеток. Конвергентное растяжение мезодермы является, по-видимому, автономным, потому что движения клеток наблюдаются даже в том случае, когда они изолированы из остальной части зародыша (Keller, 1986).

Как инволюирующие клетки узнают, куда им надо двигаться сразу же после попадания внутрь зародыша? Имеются ли на внутренней поверхности крыши бластоцеля некие молекулы, облегчающие миграцию клеток? По-видимому, инволюирующие клетки-предшественники мезодермы мигрируют к анимальному полюсу по фибронектиновой сети, секретируемой клетками крыши бластоцеля. У амфибий незадолго до начала гаструляции презумптивная эктодерма крыши бластоцеля секретирует внеклеточный матрикс, который содержит волокна фибронектина (Boucaut et al., 1984; Nakatsuji et al., 1985) (рис. 4.27). Подобно инвагинирующей мезенхиме морского ежа, инволюирующая мезодерма перемещается по этим фибронектиновым волокнам. Это предположение было подтверждено фактом, что химически синтезированный «поддельный» фибронектин может конкурировать с фибронектином внекле-

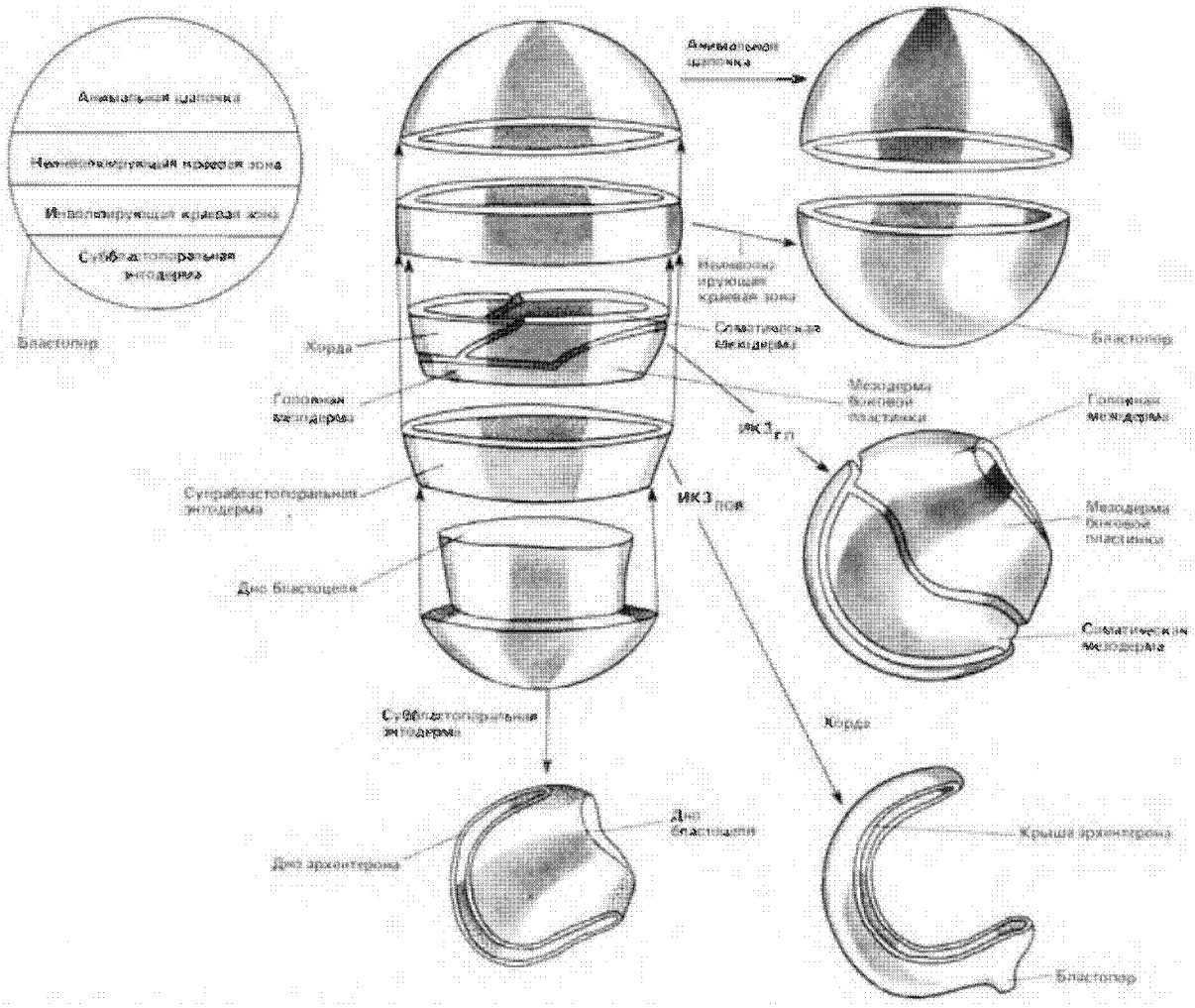


Рис. 4.25. Карты претуммативных зачатков у зародыша шпорцевой лягушки на стадии ранней гаструлы и движения клеточных пластов в период гаструляции каждой из четырех областей, показанных схематически на рисунке слева и представленных по отдельности на рисунках в центре, на которых ранняя гаструла дана как бы в разобранном виде; на рисунках справа эти зачатки спроецированы на конец гаструляции. В течение гаструляции апикальная анимальная шапочка распространяется равномерно по всем направлениям в сторону вегетативного полюса, тогда как клетки неинволюирующей краевой зоны сначала мигрируют вдоль будущей спинной стороны зародыша. Все вместе они будут окружать зародыш, превратившись в эктодерму. Глубокие клетки инволюирующей краевой зоны (ИКЗ$_{гл}$) исходно представляют собой кольцо внутренних, расположенных по экватору клеток, содержащее клетки-предшественники хорды, головной и сомитной мезодермы и мезодермы боковых пластинок (на рисунке ИКЗ$_{гл}$ изображена над ИКЗ$_{пов}$). В ходе инволюции это кольцо вворачивается внутрь, образуя мезодермальную мантию, в которой клетки-предшественники хорды расположены наиболее дорсально. Поверхностные клетки инволюирующей краевой зоны (ИКЗ$_{пов}$ изображена в виде отдельного кольца под ИКЗ$_{гл}$) представляют собой будущие супрабластопоральные (лежащие над бластопором) энтодермальные клетки (материал прехордальной пластинки); краевая зона удлиняется в дорсальном направлении, образуя крышу архентерона (гастроцеля). Суббластопоральную (лежащую под бластопором) энтодерму в конечном счете окружают клетки неинволюирующей краевой зоны. Эти богатые желтком клетки образуют дно гастроцеля. Обратите внимание, что бластопор, закладывающийся первоначально на спинной стороне, сдвигается на брюшную сторону зародыша. (По Keller, 1986.)

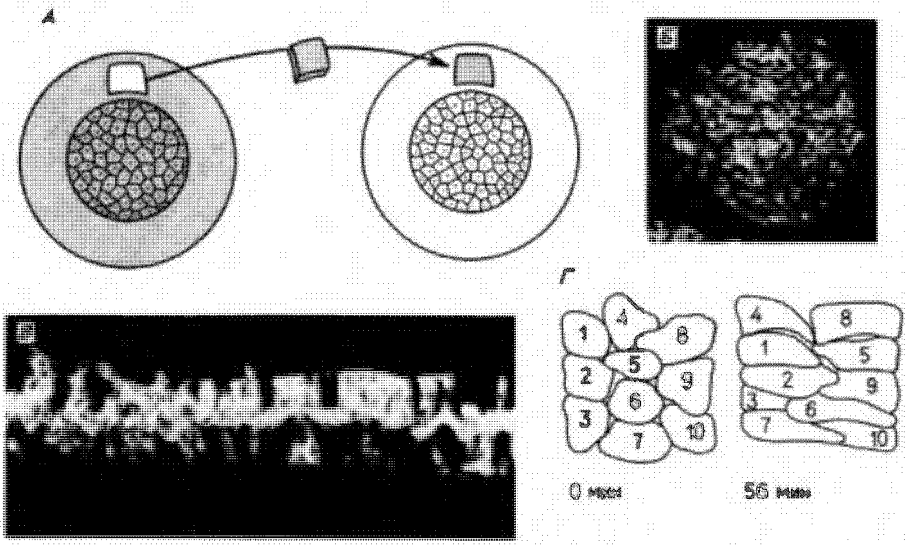


Рис. 4.26. Перераспределение клеток в процессе конвергентного растяжения мезодермы у зародыша шпорцевой лягушки. *А*. Дорсальная область ИКЗ$_{II}$ (которая образует хорду) взята от зародыша, меченного частицами флуоресцирующего декстрана, и пересажена немеченому зародышу. *Б*. После приживления меченые клетки (светлые) остаются на месте не рассеиваясь. *В*. Когда эти клетки участвуют в образовании хорды, они перемешиваются с клетками хозяина. *Г*. Перемещение отдельных меченых клеток при формировании хорды, прослеженное с помощью видеомагнитофонной записи in vitro. (По Keller et al., 1985; Keller, 1986; фотографии с любезного разрешения R. E. Keller.)

точного матрикса. Клетки связываются с определенным участком белка фибронектина, который содержит специфическую последовательность из 10 аминокислот:

Арг—Гли—Асп—Сер—Про—Ала—Сер—Сер—Лиз—Про.

Буко и др. (Boucaut et al., 1984) инъецировали большие количества этого декапептида в бластоцель зародыша тритона вскоре после начала гаструляции. Если фибронектин имеет существенное значение для миграции клеток, то клетки, связанные этим растворенным фрагментом пептида, а не фибронектиновым матриксом, должны будут остановиться. Не-

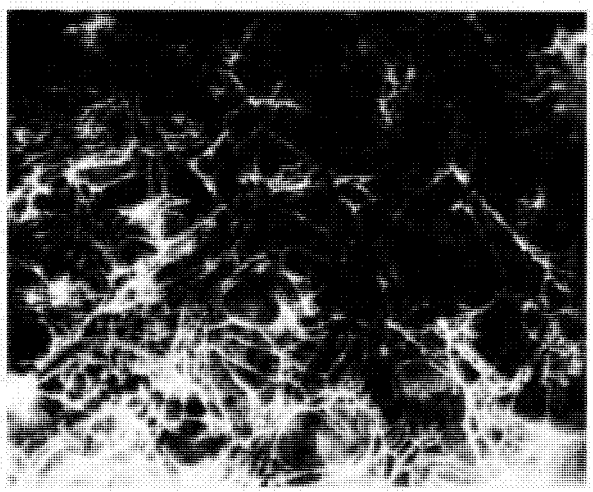
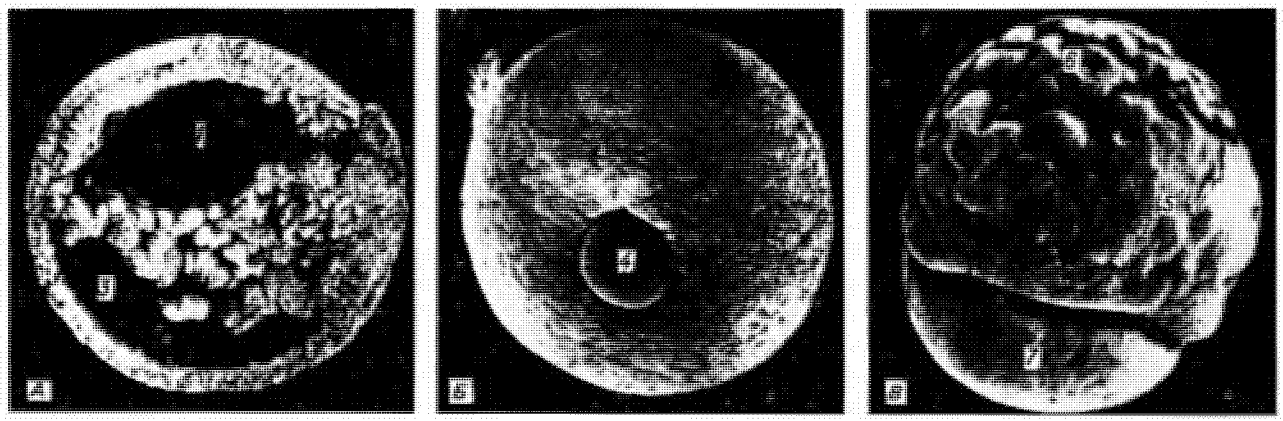


Рис. 4.27. Фибронектиновые фибриллы у зародыша тритона на стадии гаструлы, визуализированные с помощью флуоресцирующих антител к фибронектину. Иммунофлуоресценция выявляет фибриллярную сеть на базальной поверхности эктодермальных клеток, выстилающих крышу бластоцеля. (Из Boucaut et al., 1985; фотография с любезного разрешения J.-C. Boucaut.)

способные найти свой путь мезодермальные клетки должны прекратить инволюцию. Именно это и произошло в опыте Буко (рис. 4.28). На внутренней стороне эктодермы не было видно мигрирующих клеток. Вместо этого клетки-предшественники мезодермы оставались на поверхности зародыша, образуя клеточную массу, свернутую в виде спирали. Другие синтетические декапептиды (в том числе другие фрагменты молекулы фибронектина) не препятствовали миграции. Сходные фибронектинсодержащие волокна были обнаружены в гаструле других хвостатых амфибий, а Деларю и его коллеги (Delarue et al., 1985) показали, что некоторые нежизнеспособные гибриды между двумя видами жаб (бесхвостых амфибий) погибают во время гаструляции, потому что они не секретируют фибрилл фибронектина. Следовательно, можно полагать, что путь миграции мезодермальных клеток у зародышей амфибий выстлан фибронектином.

Эпиболия эктодермы

В то время как в области губ бластопора осуществляется инволюция, клетки-предшественники эктодермы распространяются по поверхности всего зародыша. Келлер (Keller, 1980) и Келлер и Шенвольф (Keller, Schoenwolf, 1977) наблюдали изменения поверхностных и глубоких клеток в анимальной и краевой областях зародыша с помощью сканирующего электронного микроскопа. Основной механизм эпиболии у *Xenopus laevis* заключается, по-видимому, в увеличении числа клеток (посредством делений) и в одновременной интеграции нескольких слоев глубоких клеток в один (рис. 4.29). В результате трех циклов клеточных делений на стадии ранней гаструлы число глубоких клеток в анимальном полу-



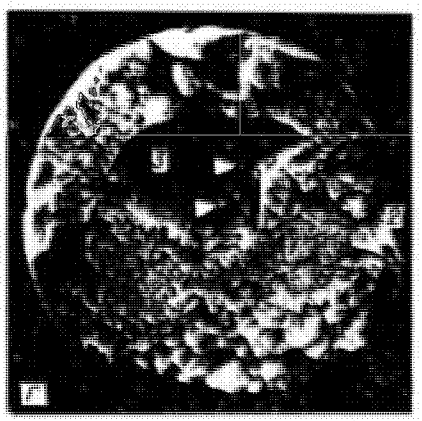


Рис. 4.28. Зародыши тритона, гаструлирующие нормально (*А*, *Б*), и аномально гаструлирующие зародыши, которым в бластоцель были инъецированы растворы фибронектиновых фрагментов, связывающихся с инволюирующими клетками (*В*, *Г*). Нормальным зародышам был инъецирован контрольный раствор без фибронектина. (Фотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа.) *А*. Разрез зародыша на стадии средней гаструлы. *Б*. Общий вид зародыша на стадии желточной пробки (близко к концу гаструляции). *В*. Общий вид зародыша на конечной стадии «арестованной» (остановленной) гаструлы. *Г*. Разрез через такую аномальную гаструлу; у этих зародышей клетки-предшественники мезодермы, будучи связаны с синтетическим фибронектином, не могут найти нормальный выстланный фибронектином путь, по которому они должны мигрировать. Архентерон отсутствует, потому что неинволюировавшие клетки презумптивной мезодермы остались на поверхности. *1* — архентерон; *2* — бластопор; *3* — бластоцель; *4* — желточная пробка; *5* — мезодерма; *6* — эктодерма; *7* — энтодерма. (Из Boucaut et al., 1984; фотография с любезного разрешения J.-P. Thiery.)

шарии увеличивается на 45%. Одновременно происходит полное объединение этого огромного числа глубоких клеток в один слой. Самый поверхностный слой клеток распространяется посредством их деления и уплощения. Распространение клеток в дорсальной и вертикальной частях краевой зоны осуществляется, по-видимому, под действием того же механизма, хотя изменения формы клеток в этих участках зоны играют, вероятно, большую роль, чем в анимальной области. Результатом этих движений является эпиболия поверхностных и глубоких клеток анимального полушария и краевой зоны по поверхности яйца. Большинство клеток краевой зоны, как уже упоминалось, инволюирует, присоединяясь к потоку мезодермальных клеток внутри зародыша.

Итак, гаструляция у амфибий представляет со-

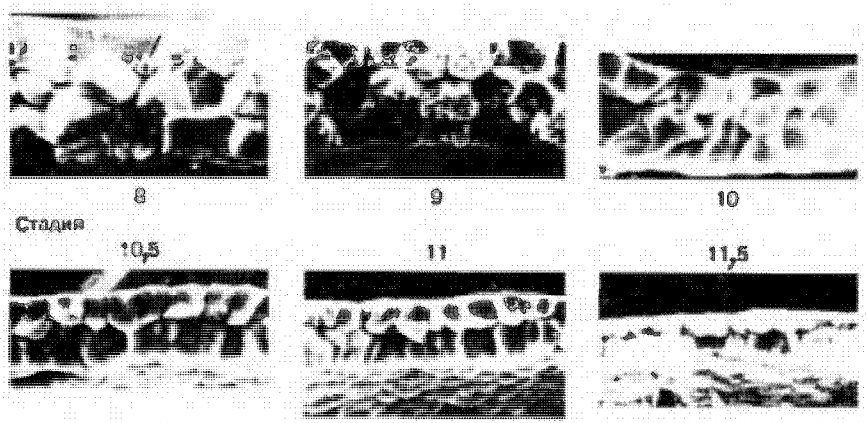


Рис. 4.29. Изменения в форме и расположении клеток в крыше бластоцеля у зародышей шпорцевой лягушки на стадиях 8 (средняя бластула), 9 (поздняя бластула) и на последовательных стадиях гаструляции от стадии 10 (начало гаструляции) до стадии 11.5 (большая желточная пробка). Фотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Из Keller, 1980; фотографии с любезного разрешения R. E. Keller.)

бой гармоническое сочетание нескольких отчетливо различающихся событий. Первым указанием на гаструляцию является локальная инвагинация энтодермальных колбовидных клеток в краевой зоне в строго определенное время и в строго определенном месте. Затем инволюция глубоких клеток через губу бластопора приводит к образованию архентерона и к перемещению осевой мезодермы в дорсальную область зародыша. В то же самое время клетки-предшественники эктодермы распространяются в вегетативном направлении посредством клеточных делений и интеграции ранее независимых клеточных слоев. Результатом этих клеточных движений является соответствующее размещение в зародыше трех зародышевых листков, подготавливающее их к дифференцировке в органы тела. До сих пор еще неизвестно, каким образом эти клетки узнают, когда им начинать и завершать их движения. И хотя получены интересные новые данные, Келлер (Keller, 1986) предостерегает: «Ни один морфогенетический процесс — особенно гаструляция у амфибий — еще не понят нами должным образом ни на клеточном уровне, ни на уровне клеточной популяции».

Гаструляция у птиц

Основные черты гаструляции у птиц

У зародышей птиц дробление приводит к образованию бластодиска, лежащего над желтком, объем которого колоссален. Эта инертная масса желтка под бластодиском накладывает некоторые ограничения на движения клеток. Поэтому гаструляция у птиц на первый взгляд кажется сильно отличающейся от гаструляции у морского ежа или лягушки. Однако мы скоро увидим огромное сходство между ними в этом отношении. Более того, мы увидим, что даже у зародышей млекопитающих, яйца которых совсем не имеют желтка, сохраняется такой же тип гаструляционных движений, как и у богатых желтком зародышей птиц и пресмыкающихся.

Центральные клетки бластодиска отделены от желтка подзародышевой полостью и кажутся светлыми, поэтому центр бластодиска называется area pellucida (светлое поле). Напротив, клетки, лежащие на периферии бластодиска, кажутся темными из-за их контакта с желтком. Они образуют area opaca, или темное поле (рис. 4.30). Большая часть клеток бластодермы остается на поверхности, формируя эпибласт, но некоторые клетки мигрируют по отдельности в подзародышевую полость и формируют там слой, называемый **первичным гипобластом** (рис. 4.31). Вскоре после этого пласт клеток из заднего края бластодермы (серп Коллера) мигрирует кпереди и присоединяется к первичному гипобласту, образуя вместе с ним **вторичный гипобласт**. Эти два слоя бластодермы (эпибласт и гипобласт) соединяются лишь у края area opaca, а пространство между ними представляет собой бластоцель. Таким образом, строение бластодиска у птиц не отличается от строения бластулы у амфибий или морских ежей.

Карта презумптивных зачатков у зародыша птиц ограничивается эпибластом. Клетки гипобласта не принимают участия в построении тела развивающегося зародыша. Они образуют часть внезародышевых оболочек органов, которые питают зародыш и защищают его. Все три зародышевых листка собственно зародыша (плюс значительная часть внезародышевых оболочек) формируются из клеток эпибласта. Карта презумптивных зачатков эпибласта куриного зародыша до начала гаструляции представлена на рис. 4.32. Презумптивные клетки хорды расположены в центре между презумптивной эктодермой и презумптивной энтодермой.

Основной структурой, характерной для процесса гаструляции у птиц, рептилий и млекопитающих, является **первичная полоска**. Впервые она обнаруживается как центрально расположенное утолщение клеточного пласта на заднем крае светлого поля (см. рис. 4.30). Это утолщение образуется в результате миграции клеток из латеральной области заднего отдела эпибласта к центру. Оно постепенно сужается, продвигаясь вперед и превращаясь в узкую дефинитивную первичную полоску. Эта полоска простирается кпереди от заднего края светлого поля на 60—75% всей его длины и маркирует передне-заднюю ось зародыша. По мере того как клетки конвергируют, образуя первичную полоску, в ней возникает углубление, называемое **первичной бороздкой**, через которую мигрирующие клетки попадают в бластоцель. Следовательно, первичная полоска птиц аналогична бластопору амфибий. На переднем конце первичной полоски имеется утолщение, называемое **первичной ямкой** или **гензеновским узелком**. В центре его находится воронкообразное углубление, через которое клетки могут проходить в бластоцель. Гензеновский узелок является функциональным эквивалентом спинной губы бластопора амфибий.

Как только сформировалась первичная полоска, клетки бластодермы начинают мигрировать через губы первичной полоски и далее в бластоцель (рис. 4.33). Подобно бластопору амфибий, первичная полоска представляет собой непрерывно меняющуюся популяцию клеток. Те клетки, которые мигрируют через гензеновский узелок, проходят в бластоцель и движутся в нем кпереди, формируя головную мезодерму и хорду; клетки, проходящие внутрь через боковые участки первичной полоски, дают начало большей части энтодермальных и мезодермальных органов. В отличие от клеток амфибий, которые мигрируют в бластоцель целыми пластами, клетки за-

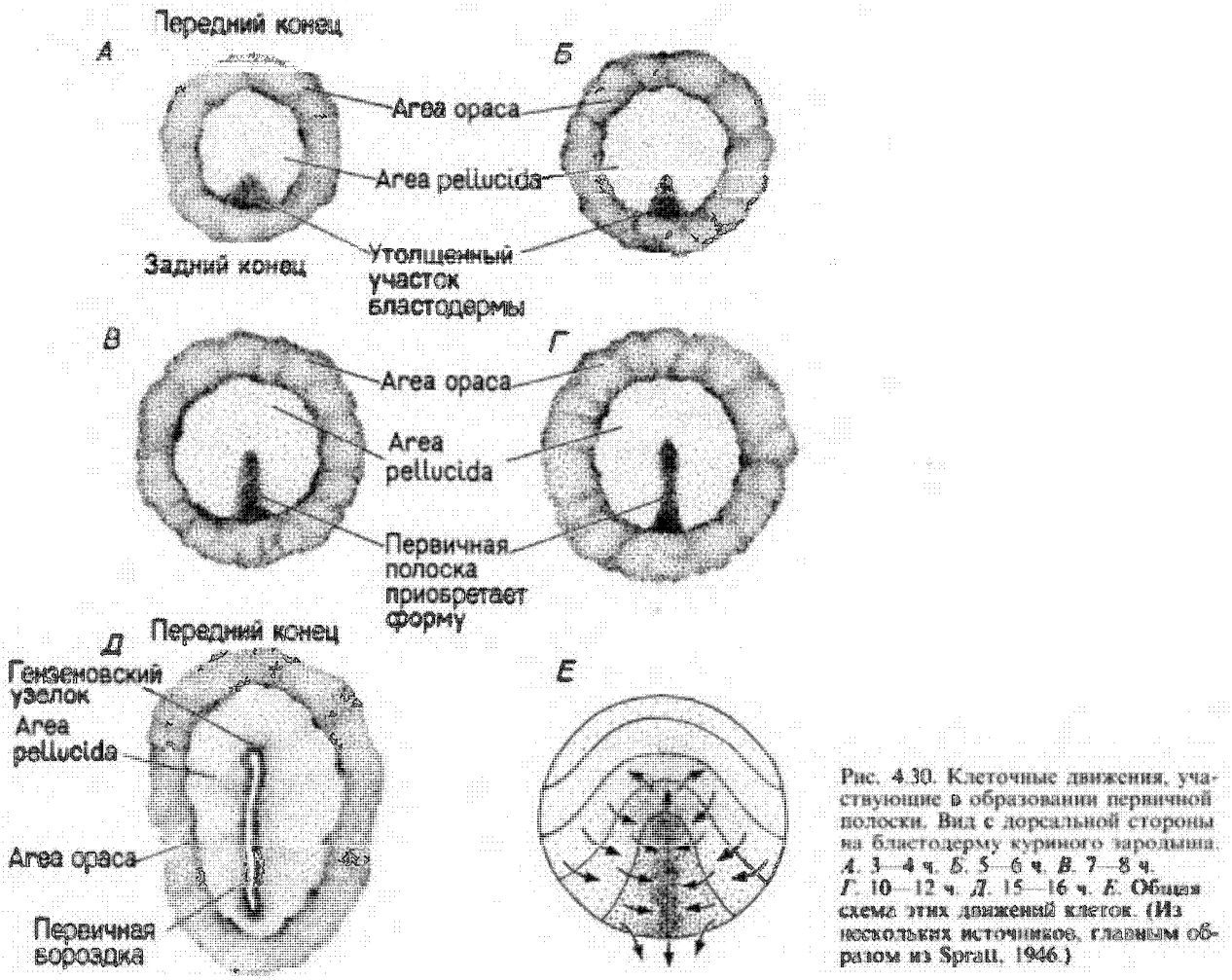


Рис. 4.30. Клеточные движения, участвующие в образовании первичной полоски. Вид с дорсальной стороны на бластодерму куриного зародыша. *А*. 3—4 ч. *Б*. 5—6 ч. *В*. 7—8 ч. *Г*. 10—12 ч. *Д*. 15—16 ч. *Е*. Общая схема этих движений клеток. (Из нескольких источников, главным образом из Spratt, 1946.)

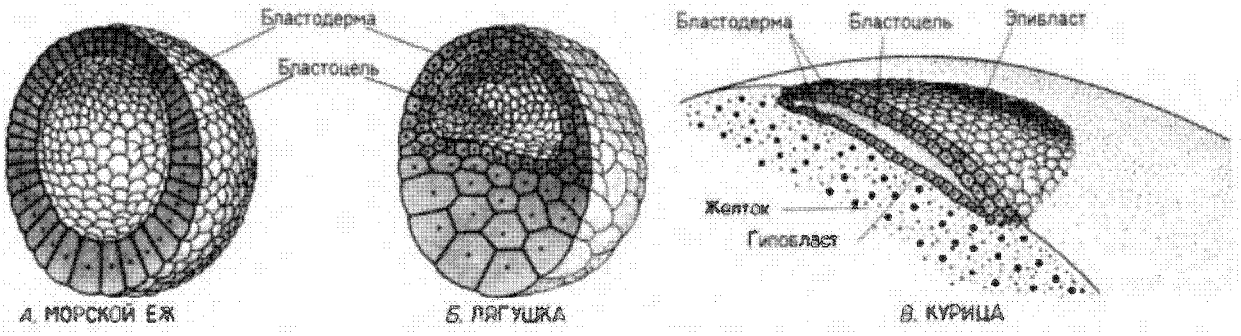


Рис. 4.31. Схематические изображения разрезов через бластулы иглокожих и ланцетника (*А*), амфибий (*Б*) и птиц (*В*). (По Carlson, 1981.)

родыша птиц вступают в первичную полоску индивидуально. Вместо того чтобы соединиться в пласт тесно связанных между собой клеток, мигрирующие клетки образуют в бластоцеле рыхлое скопление мезенхимы. Кроме того, в гаструле птиц не возникает настоящего архентерона.

По мере поступления клеток в первичную полоску она удлиняется в направлении будущего головного конца зародыша. В то же самое время клетки вторичного гипобласта продолжают мигрировать вперед от заднего края бластодермы. Удлинение первичной полоски, по-видимому, коррелировано с этим движением клеток вторичного гипобласта. Первыми через первичную полоску мигрируют клетки, предназначенные стать передней кишкой. Эта ситуация вновь оказывается сходной с той, что наблюдалась у амфибий. Попав в бластоцель, эти клетки движутся вперед и в конце концов замещают собой клетки гипобласта в переднем отделе зародыша. Следующие клетки, вступающие в бластоцель через гензеновский узелок, также движутся вперед, но не распространяются в вентральном направлении в такой степени, как презумптивные энтодермальные клетки. Они остаются между энтодермой и эпибластом, становясь впоследствии клетками головной мезодермы и хордомезодермы (хорды). Эти рано выселяющиеся в бластоцель клетки движутся вперед, приподнимая над собой передний участок эпибласта по срединноспинной линии и образуя головной отросток. Между тем продолжается миграция клеток через первичную полоску. Попав в бластоцель, они подразделяются на два потока. Один из них движется вглубь и соединяется с гипобластом вдоль его средней линии, оттесняя клетки гипобласта в стороны. Из этих движущихся в глубине клеток происходят все энтодермальные органы, а также большая часть внезародышевых оболочек (остальные формируются гипобластом). Второй мигрирующий поток распространяется по бластоцелю в виде рыхлого пласта примерно посередине между гипобластом и эпибластом. Этот пласт дает начало мезодермальным участкам зародыша и внезародышевых оболочек. К 22 ч инкубации основная часть презумптивных энтодермальных клеток оказывается внутри зародыша, тогда как презумптивные мезодермальные клетки еще продолжают мигрировать внутрь в течение длительного времени.

Теперь начинается вторая фаза гаструляции. В то время как продолжается выселение клеток мезодермы, первичная полоска подвергается регрессии, в результате которой гензеновский узелок из своего положения вблизи центра area pellucida смещается к ее заднему краю (рис. 4.34). На этом пути он оставляет за собой дорсальную ось зародыша — головной отросток. По мере перемещения гензеновского узелка все далее кзади формируется остальной (задний)

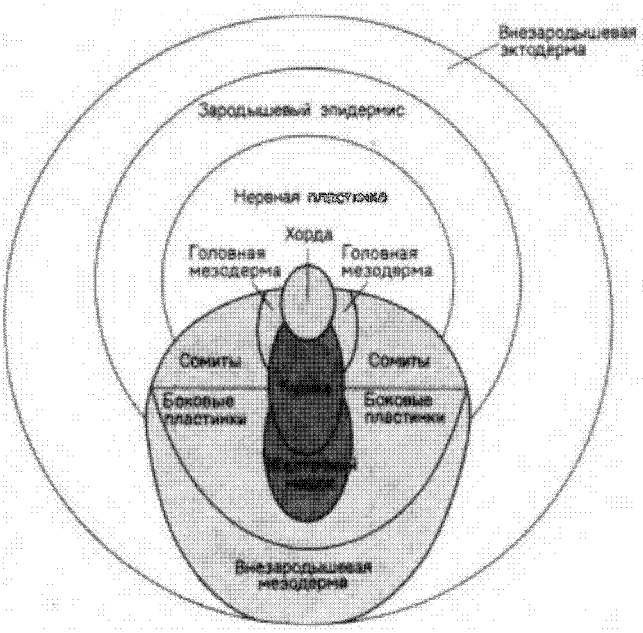


Рис. 4.32. Карта презумптивных зачатков зародыша птиц непосредственно перед началом гаструляции. Первичная полоска еще не образовалась, но впоследствии она будет простираться до области хорды. Презумптивная эктодерма обозначена белым, презумптивная мезодерма — светлосерым и презумптивная энтодерма — темносерым цветом. (По Balinsky, 1975.)

участок хорды. Наконец, узелок достигает своего окончательного положения на краю светлого поля, где и формирует анальную область зародыша на манер, свойственный истинно вторичноротым животным. К этому времени эпибласт состоит исключительно из презумптивных эктодермальных клеток.

В результате этого двухступенчатого процесса гаструляции зародыши птиц (и млекопитающих) обнаруживают отчетливый переднезадний градиент в зрелости их развития. В то время как клетки задних участков зародыша еще претерпевают гаструляцию, клетки на его переднем конце уже начинают формировать органы. В течение нескольких следующих дней становится очевидным, что передний конец зародыша более продвинут в своем развитии, чем его задний конец.

По мере того как презумптивные мезодермальные и энтодермальные клетки движутся внутрь, клетки-предшественники эктодермы окружают желток посредством эпиболии. Обрастание желтка эктодермой (снова напоминающее нам об эпиболии эктодермы у амфибий) — задача для Геркулеса, осуществление которой занимает большую часть первых четырех дней инкубации и включает в себя непрерывное образование нового клеточного материала за счет запасов желтка, а также миграцию презумптивных эктодермальных клеток по нижней по-

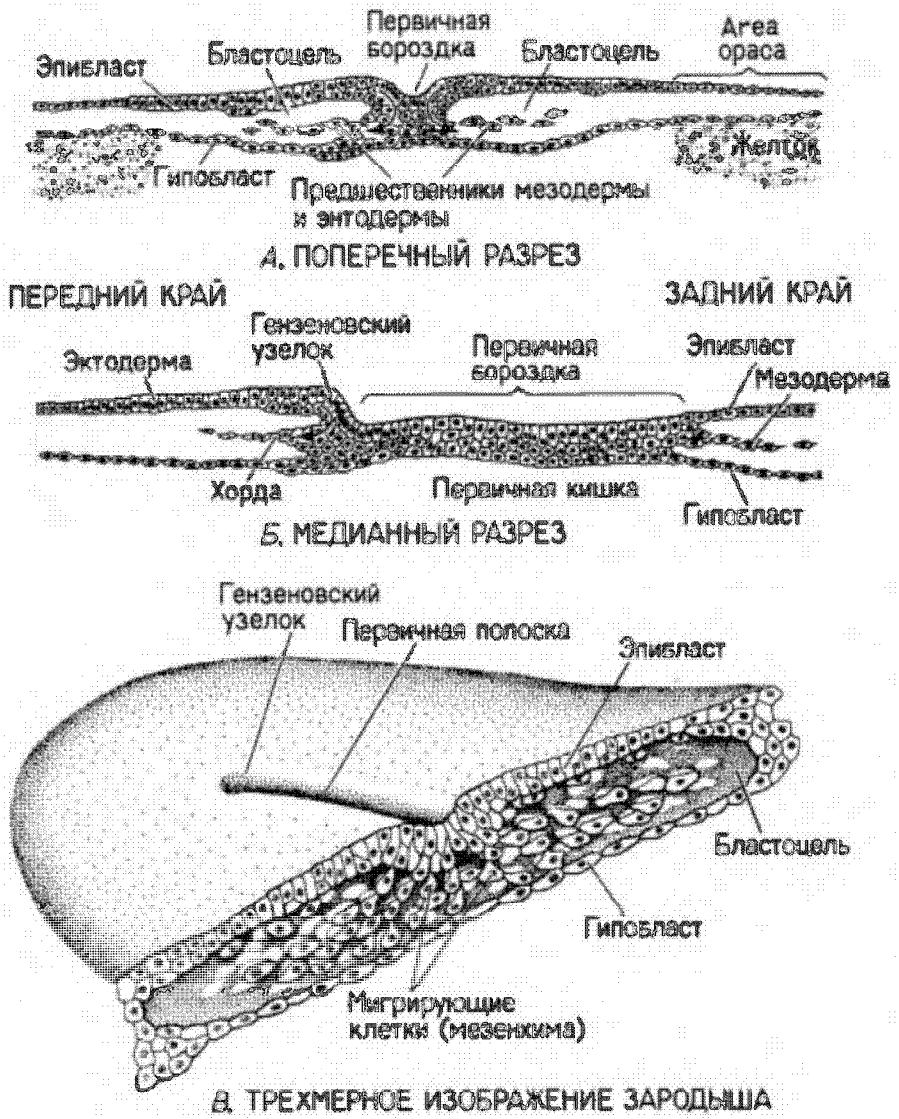


Рис. 4.33. Миграция энтодермальных и мезодермальных клеток через первичную полоску. *А*. Схематическое изображение поперечного среза зародыша в возрасте 17 ч. Показаны выселение мезодермальных и энтодермальных клеток в бластоцель и их миграция в стороны от первичной полоски. *Б*. Схематическое изображение медианного продольного среза через зародыш такого же возраста. Можно видеть, что мигрирующие через гензеновский узелок клетки объединяются, образуя хорду (головной отросток). *В*. Трехмерное изображение гаструлирующего куриного зародыша; показана связь между первичной полоской, мигрирующими клетками и двумя первичными слоями бластодермы. (*А* и *Б* — по Carlson, 1981; *В* — по Balinsky, 1975; Dubland, Thiery, 1982.)

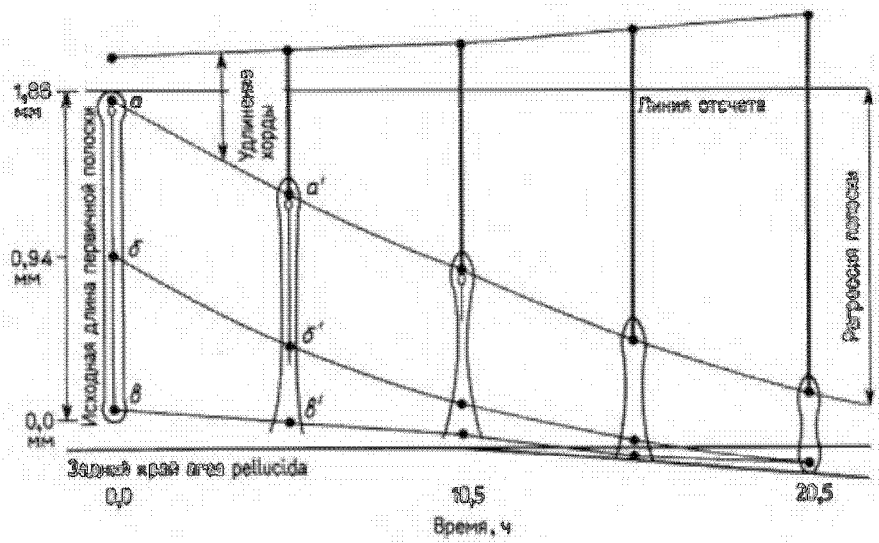


Рис. 4.34. Регрессия первичной полоски, оставляющей после себя материал хорды. Изучали изменение положения разных меток, поставленных на первичной полоске, после достижения ею максимальной длины. Этот момент принят за нуль при отсчете времени в часах. (По Spratt, 1947.)

верхности желточной оболочки. Итак, когда гаструляция у птиц близится к завершению, эктодерма окружает желток, энтодерма замещает гипобласт, а мезодерма располагается между этими двумя областями.

Механизмы гаструляции у птиц

РОЛЬ ГИПОБЛАСТА. Из гипобласта не образуется никаких клеток взрослого животного (Rosenquist, 1972), но он имеет существенное значение для правильного развития зародыша. В 1932 г. Уоддингтон (Waddington) показал, что этот нижний слой влияет на ориентацию осевых структур у куриного зародыша. Он разделял два клеточных слоя бластодиска вскоре после формирования первичной полоски. Соединяя их снова таким образом, чтобы длинные оси эпибласта и гипобласта стали почти перпендикулярными одна другой, он обнаружил, что первичная полоска отклоняется в соответствии с длинной осью гипобласта (рис. 4.35). Азар и Эйяль-Гилади (Azar, Eyal-Giladi, 1979, 1981) расширили эти наблюдения и показали, что гипобласт *индуцирует* формирование первичной полоски. Во-первых, удаление гипобласта останавливало все последующее развитие до тех пор, пока оставшийся эпибласт не регенерировал новый нижний слой. Во-вторых, когда удаляли популяцию клеток, происходящих из заднего края бластодермы, первичной полоски не образовывалось. Светлое поле превращалось в массу неорганизованной мезодермоподобной ткани. Следовательно, вторичный гипобласт, по-видимому, определяет формирование и ориентацию первичной полоски.

КЛЕТОЧНЫЕ ДВИЖЕНИЯ ВНУТРИ БЛАСТОЦЕЛЯ. У птиц, как и у амфибий, в процессе гаструляции апикальные концы клеток, проходящих через губу бластопора, сужаются и клетки становятся колбовидными (рис. 4.36). Сразу же после того, как эти клетки высвобождаются из первичной полоски и попадают в бластоцель, они уплощаются и включаются в поток независимо мигрирующих клеток, каждая из которых продвигается вперед, вытягивая и сокращая филоподии. В этой миграции важную роль могут играть внеклеточные сложные полисахариды. Одним из таких сложных полисахаридов является **гиалуроновая кислота**, линейный полимер глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Это вещество продуцируется эктодермальными клетками и накапливается в бластоцеле, где оно сплошным слоем покрывает поверхность вступающих в бластоцель клеток. Фишер и Солурш (Fisher, Solursh, 1977) показали, что если этот материал подвергнуть перевариванию (инъецировав в бластоцель гиалуронидазу), мезенхимные клетки слипаются в кучки и не могут мигрировать. В ряде исследований было выявлено важное значение гиалуроновой кислоты, заключающееся в том, что она поддерживает мигрирующие клетки в диспергированном состоянии. Кроме того, гиалуроновая кислота впервые начинает накапливаться в бластоцеле точно к тому времени, когда в него попадают первые клетки. Сохранение клеток

Рис. 4.35. Изменение положения осевых структур у куриного зародыша в возрасте 24 ч, вызванное изменением положения гипобласта по отношению к развивающейся первичной полоске. На этом рисунке видно, что первичная полоска уже в значительной степени регрессировала. (Из Azar, Eyal-Giladi, 1979; фотография с любезного разрешения H. Eyal-Giladi.)

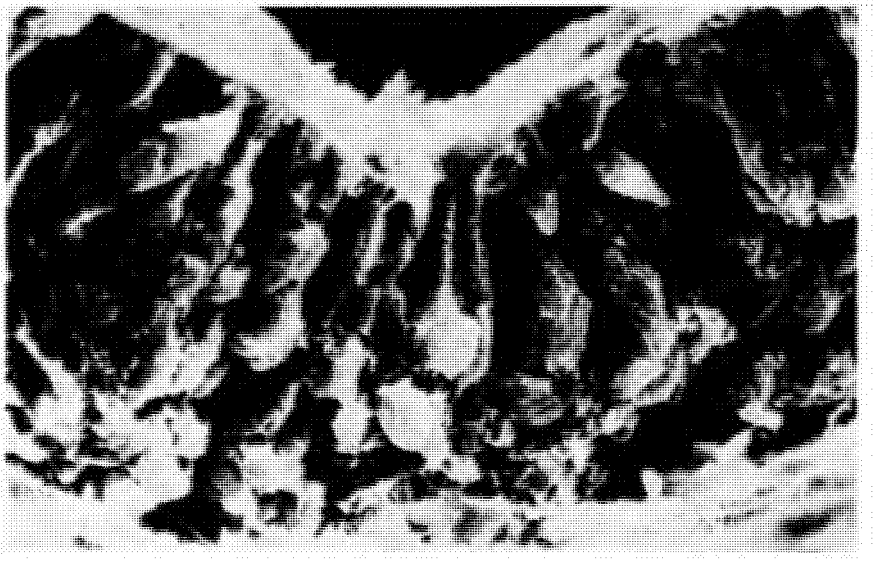


Рис. 4.36. Область первичной полоски у куриного зародыша в период гаструляции. (Фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа.) Видны переходящие в бластоцель клетки эпибласта; апикальные концы этих клеток вытягиваются, и они становятся колбовидными. (Из Solursh, Revel, 1978; фотография с любезного разрешения M. Solursh.)

отделенными одна от другой обусловлено способностью гиалуроновой кислоты значительно увеличивать свой объем в воде. При попадании этого полимера в водную среду его объем возрастает более чем в 1000 раз. Следовательно, гиалуроновая кислота, по-видимому, является важным фактором, который сохраняет мезенхимные клетки диспергированными во время миграции и тем самым обеспечивает продолжение этого процесса.

Гиалуроновая кислота и другие полисахариды облегчают миграцию индивидуальных клеток, но они, по-видимому, не определяют направление движения этих клеток (Fisher, Solursh, 1979). Скорее всего, движения этих клеток коррелированы опять-таки с присутствием фибронектиновой сети во внеклеточной базальной мембране клеток эпибласта. Этот богатый фибронектином слой появляется на нижней поверхности верхнего пласта клеток немедленно до формирования первичной полоски и исчезает в области полоски. Внутри полоски клетки разделяются, и их можно видеть мигрирующими латерально по богатой фибронектином базальной мембране эпибласта (Duband, Thiery, 1982; рис. 4.37). Однако мы не располагаем четкими данными о том, что фибронектин имеет существенное значение для направления латерального движения клеток первичной полоски. Более подробно изменения поверхности клеток в период гаструляции будут обсуждаться в гл. 15.

ЭПИБОЛИЯ ЭКТОДЕРМЫ. Во время гаструляции клетки-предшественники эктодермы распространяются снаружи, окружая желток. Эти клетки соединены между собой плотными контактами и движутся как единое целое, а не по отдельности. У птиц верхняя поверхность темного поля плотно слипается с нижней поверхностью желточной оболочки и распространяется по ней. Такое же поведение обнаруживается и в условиях культивирования. Нью (New, 1959) показал, что изолированная бластодерма нормально распространяется по изолированной желточной оболочке, а Спратт (Spratt, 1963) обнаружил, что такого распространения не происходит по другим субстратам. Эти наблюдения подтверждают важную роль желточной оболочки в распространении клеточного пласта. Интересно, что только краевые клетки (т. е. клетки area opaca) прочно прикрепляются к поверхности желтка. Большая часть клеток бластодермы прикреплена рыхло или совсем не прикреплена к ней. Эти краевые клетки отличаются от остальных клеток изначально присущей им способностью простирать по желточной оболочке огромные (500 мкм) цитоплазматические отростки. Считается, что эти удлиненные филоподии являются локомоторным аппаратом краевых клеток.

Имеется несколько групп данных, свидетельствующих о том, что краевые клетки темного поля являются действующей силой в эпиболии эктодермы. Во-первых, бластодерма распространяется по желтку только тогда, когда распространяются ее края. Во-вторых, если краевые клетки отрезаны от остальной части бластодермы, то они продолжают распространяться по желтку одни. Отсюда, по-видимому, следует, что клетки-предшественники эктодермы приводятся в движение активно мигрирующими клетками area opaca (Schlesinger, 1958). Существуют также специфические взаимоотношения между мембранами краевых клеток и нижней поверхностью желточной оболочки. Нью (New, 1959) показал, что, когда бластодерму помещают на желточную оболочку верхней стороной вниз (в контакт с желточной мембраной приходят глубокие клетки), края бластодермы заворачиваются кверху так, что краевые клетки верхнего слоя снова приходят в контакт с поверхностью желтка (рис. 4.38). Таким образом, существует, по-видимому, специфическое узнавание краевыми клетками area opaca внутренней поверхности желточной оболочки; это узнавание существенно для миграции эктодермы, окружающей желток в процессе эпиболии.

Гаструляция у млекопитающих

И птицы, и млекопитающие являются потомками рептилий. Поэтому нет ничего удивительного

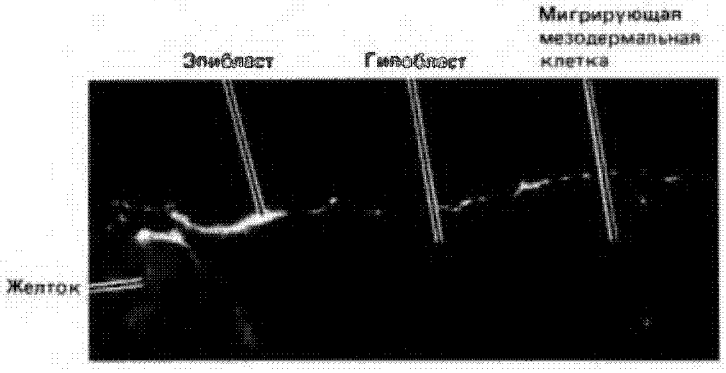


Рис. 4.37. Миграция клеток куриного зародыша по содержащей фибронектин базальной мембране эпибласта. Флуоресцирующие антитела метят матрикс, отделяющий клетки эпибласта от клеток среднего слоя, мигрирующих между эпибластом и гипобластом. (Из Duband, Thiery, 1982; фотография с любезного разрешения J. L. Duband.)

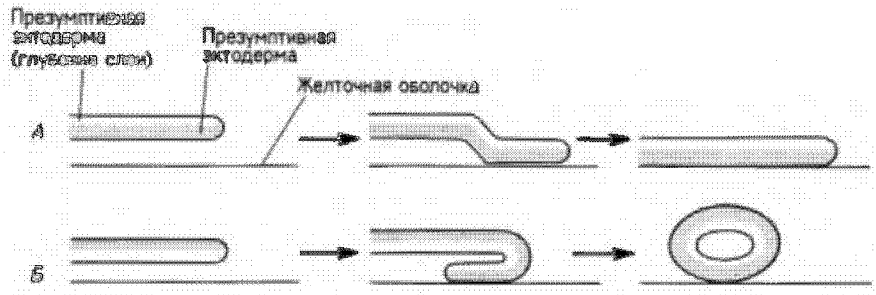


Рис. 4.38. Изучение способности клеток-предшественников эктодермы к миграции. *А*. Если бластодерму куриного зародыша поместить на желточную оболочку так, что с поверхностью оболочки контактируют клетки-предшественники эктодермы, то краевые клетки мигрируют по этой поверхности и покрывают ее. *Б*. Если же бластодерму поместить на желточную оболочку так, что с поверхностью желточной оболочки контактируют ее глубокие слои, то она сворачивается таким образом, что клетки поверхностного слоя могут прилипнуть к оболочке и мигрировать по ней. В результате образуется замкнутый пузырек. (По New, 1959.)

в том, что развитие млекопитающих имеет много общего с развитием рептилий и птиц. Удивительно то, что особенности движений гаструляции, возникшие у рептилий и птиц в эволюции как адаптация к развитию зародышей из яиц, богатых желтком, сохранились при развитии млекопитающих даже в отсутствие больших запасов желтка в яйце. Внутренняя клеточная масса, которую можно представить себе сидящей на верхушке воображаемого шара желтка, следует инструкциям, которые кажутся более подходящими для предков млекопитающих.

Вместо того чтобы развиваться самостоятельно, большинство млекопитающих разработали замечательную стратегию развития внутри своей матери. Зародыш млекопитающих получает питательные вещества непосредственно от матери, а не пользуется накопленным желтком. Эта эволюция повлекла за собой резкие перемены в материнской анатомии (такие, как расширение нижнего отдела яйцевода, образующее матку), а также развитие у плода органа, способного к усвоению материнской пищи. Этот орган плода — **плацента** — происходит первично из эмбриональных клеток трофобласта, дополненного мезодермальными клетками, происходящими из внутренней клеточной массы.

Происхождение различных тканей раннего зародыша млекопитающих суммировано на рис. 4.39. Первое разделение клеток в пределах внутренней клеточной массы заключается в формировании слоя **гипобласта**, называемого иногда первичной эктодермой (рис. 4.40). Эти клетки, отделяясь от внутренней клеточной массы, вселяются в полость бластоцисты, где из них образуется **эктодерма желточного мешка**. Как и у зародышей птиц, у млекопитающих эти клетки не участвуют в построении какой-либо части организма новорожденного. Оставшуюся на поверхно-

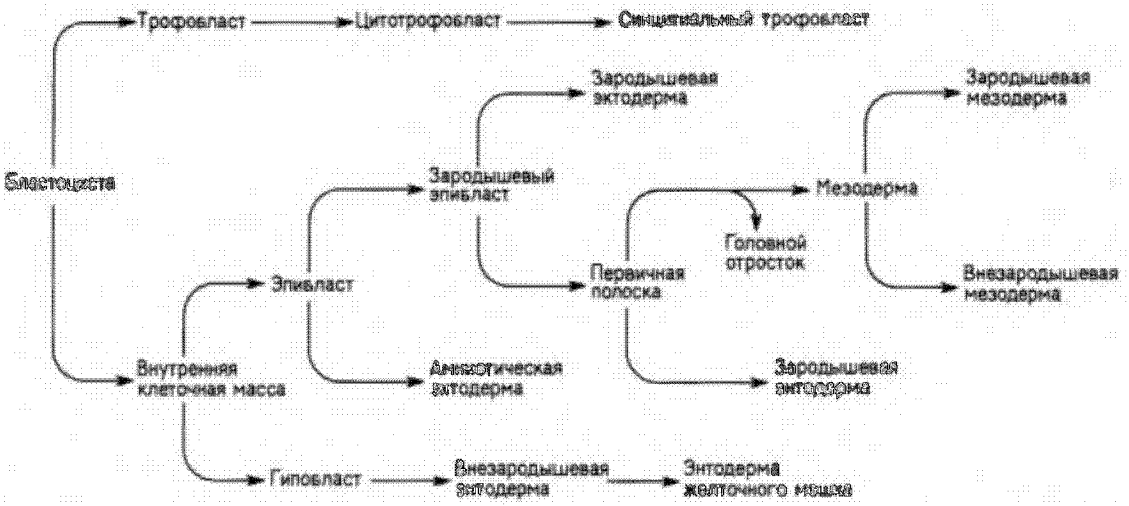


Рис. 4.39. Схема, иллюстрирующая происхождение различных тканей у зародышей человека и макака-резуса. (По Luckett, 1978.)

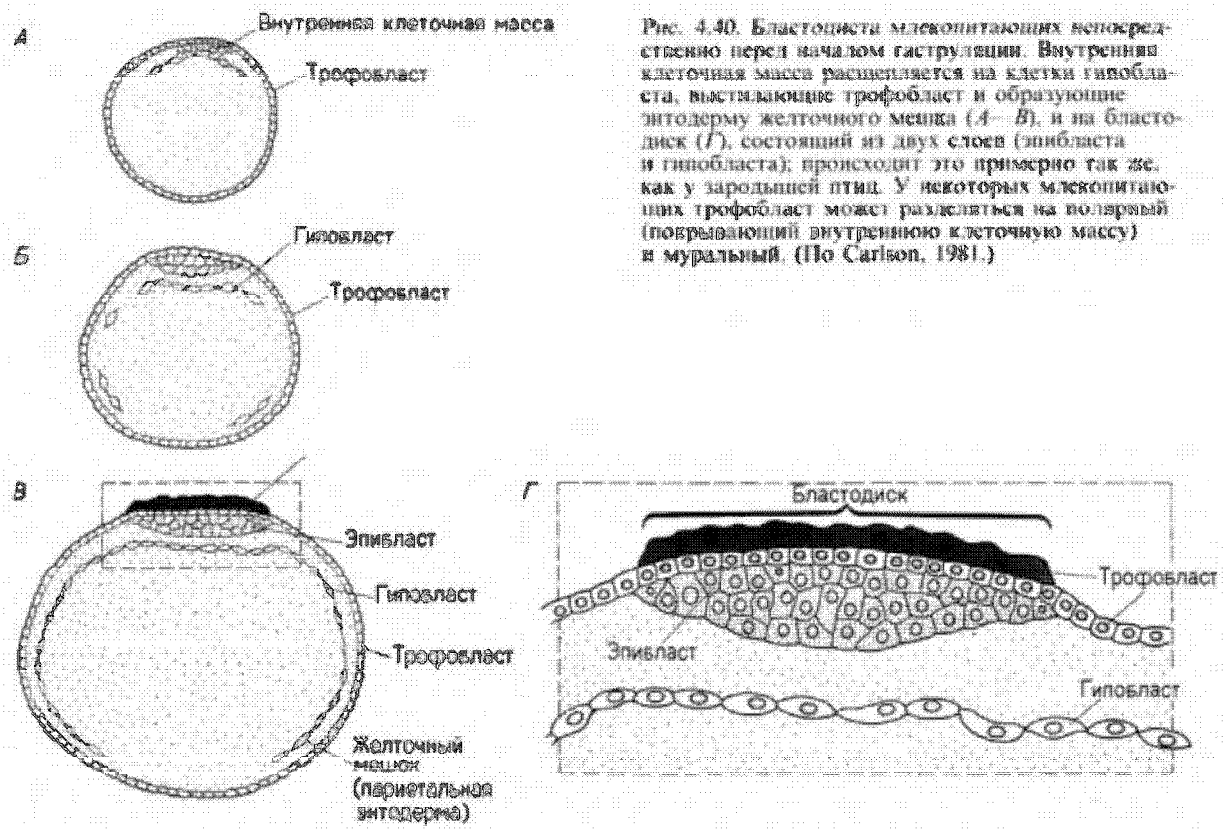


Рис. 4.40. Бластоцисты млекопитающих непосредственно перед началом гаструляции. Внутренняя клеточная масса расщепляется на клетки гипобласта, выстилающие трофобласт и образующие энтодерму желточного мешка (*А — В*), и на бластодиск (*Г*), состоящий из двух слоев (эпибласта и гипобласта); происходит это примерно так же, как у зародышей птиц. У некоторых млекопитающих трофобласт может разделяться на полярный (покрывающий внутреннюю клеточную массу) и муральный. (По Carlson, 1981.)

сти часть внутренней клеточной массы, лежащую над гипобластом, теперь следует считать эпибластом. Эпибласт затем расщепляется посредством мелких трещин, которые в конце концов сливаются, отделяя **зародышевый эпибласт** от других клеток эпибласта, образующих выстилку амниона (рис. 4.41). После образования выстилки амнион наполняется секретом, называемым амниотической жидкостью, которая служит «поглотителем шоков», или амортизатором, и в то же время предотвращает высыхание развивающегося зародыша.

Считается, что эмбриональный эпибласт содержит все клетки, необходимые для образования самого зародыша. В этом отношении он сходен с эпибла-

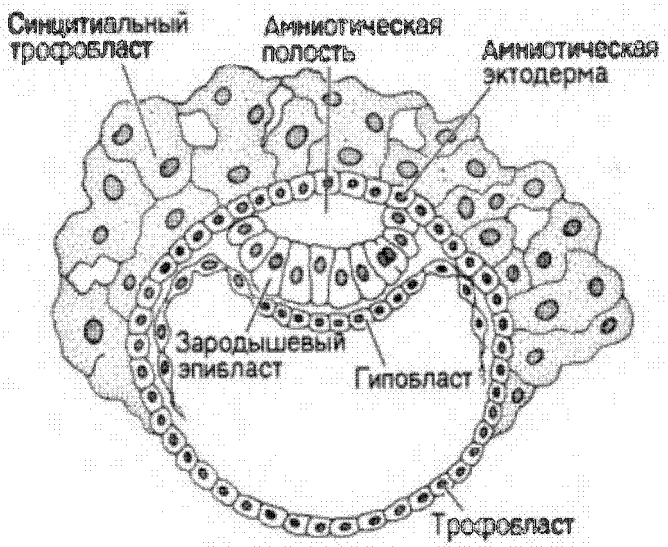


Рис. 4.41. Формирование амниона у зародыша человека. Гипобласт находится вблизи внутренней клеточной массы, и его клетки делятся, формируя синцитиальный трофобласт, который внедряется в матку. Тем временем эпибласт расщепляется на амниотическую эктодерму и зародышевый эпибласт. Все последующее развитие зародыша будет осуществляться исключительно за счет зародышевого эпибласта. (По Carlson, 1981.)

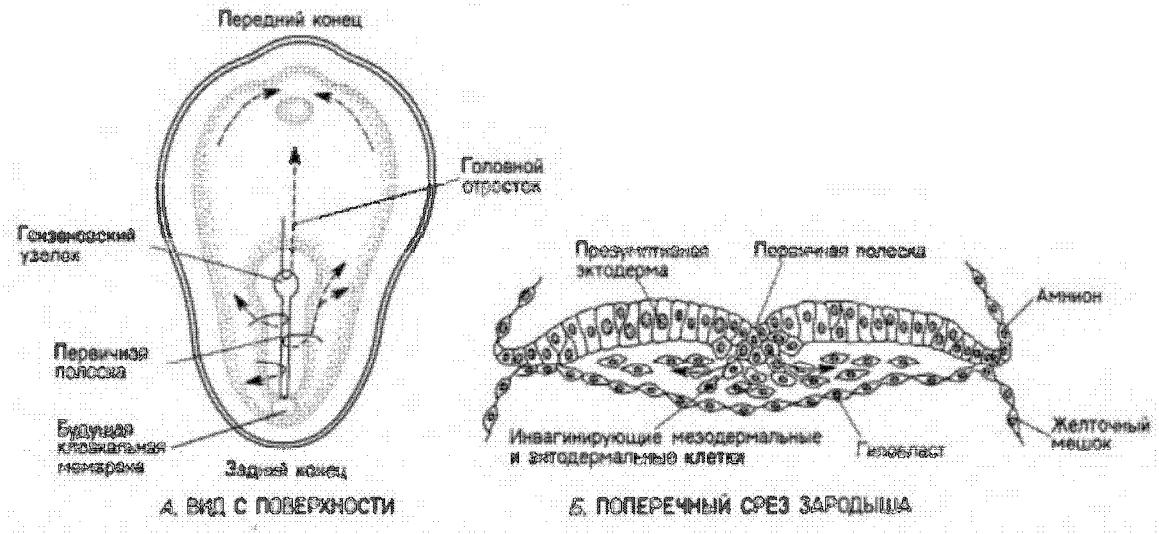


Рис. 4.42. Клеточные движения в период гаструляции у млекопитающих. *А*. Схематическое изображение дорсальной поверхности зародышевого эпибласта (эктодерма амниона удалена). Как и у куриных зародышей, клетки, мигрирующие через гензеновский узелок, движутся к переднему (головному) концу, образуя материал хорды, тогда как клетки, мигрирующие через первичную полоску, движутся в латеральном направлении, становясь предшественниками мезодермы и энтодермы. Штриховыми стрелками показаны движения инвагинировавших клеток. *Б*. Поперечный разрез зародыша. (По Langman, 1981.)

стом птиц. На заднем крае эмбрионального эпибласта образуется локальное утолщение, в итоге дающее начало первичной полоске, через которую мигрируют клетки-предшественники энтодермы и мезодермы (рис. 4.42). Как и у зародыша птиц, клетки, мигрирующие между слоями гипобласта и эпибласта, покрыты гиалуроновой кислотой, синтез которой начинается с момента формирования первичной полоски (Solursh, Morriss, 1977).

В то время как в зародышевом эпибласте наблю-

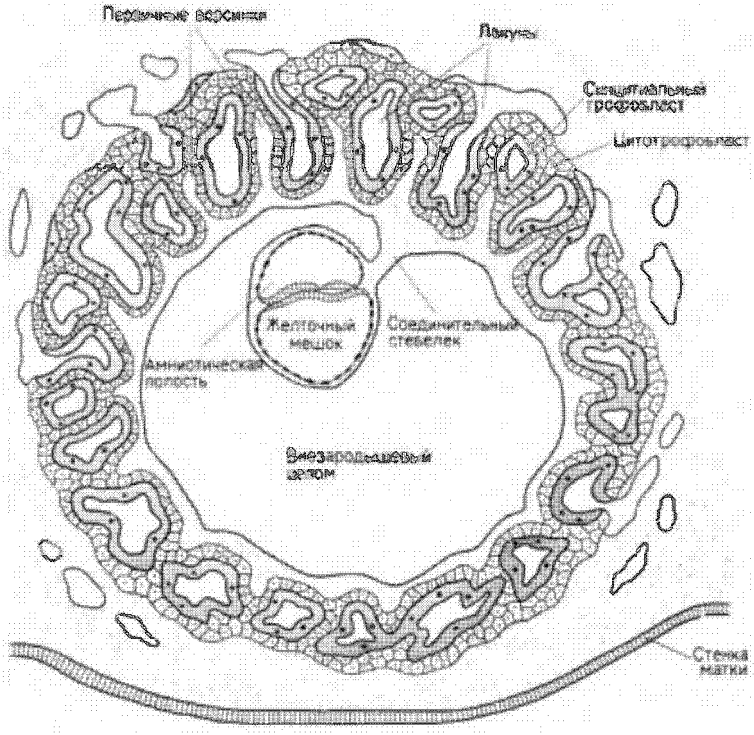


Рис. 4.43. Схематическое изображение гаструлирующего зародыша человека к концу третьей недели беременности. Сформировались амниотическая полость (между амниотической эктодермой и зародышевым эпибластом) и желточный мешок (образованный гипобластом). В будущей передней области хорда приподнимает эпибласт, а клетки трофобласта, формирующие плаценту, приходят в контакт с кровеносными сосудами матки. Зародыш связан с трофобластом стебельком внезародышевой мезодермы (ножкой тела), в котором вскоре будут проходить кровеносные сосуды плода и плаценту. (По Langman, 1981.)

даются движения клеток, напоминающие движения клеток при гаструляции у рептилий и птиц, из клеток внезародышевых тканей образуются органы, характерные только для млекопитающих и обеспечивающие выживание плода в матке. Хотя исходные клетки трофобласта кажутся вполне нормальными, часть их образует популяцию, в которой деления ядер не сопровождаются цитокинезом. Первый тип — нормально делящиеся клетки — составляет слой, называемый **цитотрофобластом**, тогда как второй тип клеток формирует **синцитиальный трофобласт**. Эта последняя ткань внедряется в слизистую матки, замуровывая в ней зародыша. Матка в свою очередь посылает в эту область кровеносные сосуды, где они затем контактируют с синцитиальным трофобластом. Вскоре после этого мезодермальная ткань простирается кнаружи от гаструлирующего зародыша (рис. 4.43). Лакетт (Luckett, 1978) показал, что эта ткань мигрирует через первичную полоску, но становится внезародышевой, а не зародышевой мезодермой и входит в ворсинки трофобласта. Из внезародышевой мезодермы формируются кровеносные сосуды, несущие питательные вещества от матери к зародышу. Узкий **соединительный стебелек** из внезародышевой мезодермы соединяет зародыш с трофобластом, а затем формирует сосуды **пупочного канатика**. Полностью развитый орган, состоящий из ткани трофобласта и содержащий внезародышевые кровеносные сосуды, называется **хорионом**; сливаясь со стенкой матки, хорион образует плаценту. Хорион может очень плотно прилегать к материнским тканям, но при этом очень легко отделяться от них (как это наблюдается в **контактной плаценте** у свиньи) или может быть настолько глубоко интегрирован в матку, что их нельзя разделить без повреждения и матери, и развивающегося плода (так устроена **отпадающая, или децидуальная**, плацента большинства млекопитающих, включая человека).

Дополнительные сведения и гипотезы

Функция хориона

Выше уже упоминалось о двух функциях внезародышевых тканей, производных трофобласта. Первая функция — это функция самого трофобласта, которую он осуществляет в процессе имплантации бластоцисты в стенку матки. Вторая начинает выполняться после формирования кровеносных сосудов — это транспорт растворимых веществ между плодом и матерью. На рис. 4.44 показана связь между зародышевыми и внезародышевыми структурами у шестинедельного плода человека. Видно, что плод заключен в амнион и, кроме того, защищен еще хорионом. Можно легко различить кровеносные сосуды, входящие в хорион и выходящие из него, а также ворсинки, простирающиеся от наружной поверхности хориона. Эти ворсинки содержат кровеносные сосуды и увеличивают площадь хориона, доступную для материнской крови. Таким образом, хотя кровеносные сосуды плода и матери нигде не сливаются, растворенные в крови вещества могут диффундировать через ворсинки (рис. 4.45). Этим способом мать снабжает плод питательными веществами и кислородом, а плод отправляет в кровеносную систему матери конечные продукты обмена (главным образом диоксид углерода и мочевину).

Но это еще не все, что плод посылает матери. Третья функция хориона — регуляторная. Он продуцирует **хорионический гонадотропин** — пептидный гормон, способный побуждать другие клетки плаценты (и материнского яичника) к синтезу **прогестерона**. Прогестерон — это стероидный гормон, который поддерживает стенку матки утолщенной и полностью

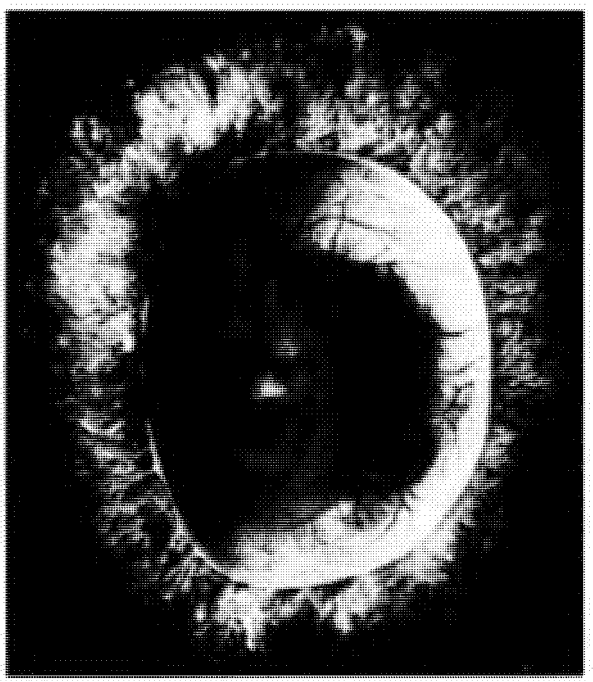


Рис. 4.44. Человеческий зародыш и плацента через 40 дней беременности. Зародыш лежит в амнионе, и можно видеть его кровеносные сосуды, простирающиеся в ворсинки хориона. Сферическое образование справа от зародыша — желточный мешок. (Фотография из коллекции Института Карнеги в Вашингтоне; с любезного разрешения C. F. Reather.)

ной кровеносных сосудов. После первой трети беременности яичник у приматов можно удалить, при этом развитие плода будет продолжаться, потому что хорион сам способен продуцировать этот стероид, необходимый для сохранения беременности (Zander, Münstermann, 1956). Прогестерон плаценты используется также надпочечниками плода как субстрат для выработки биологически важных кортикостероидных гормонов. Третий гормон, продуцируемый хорионом, — **хорионический соматомаммотропин** (часто называемый плацентарным лактогеном). Этот гормон стимулирует развитие молочных желез матери, а позже способствует выработке молока у нее.

Недавние исследования показали, что хорион может выполнять и другую функцию, а именно защиту плода от иммунного ответа матери. Каждая особь с нормальной иммунной системой может узнать чужие клетки в своем теле и отторгнуть их. Это выражается в отторжении пересаженных кожи и других органов у генетически различающихся индивидуумов. Гликопротеины, ответственные за это отторжение, называются **антигенами главного комплекса тканевой совместимости** и различаются у разных индивидуумов. Антигены тканевой совместимости ребенок наследует и от отца, и от матери, и мать способна отторгать пересаженные ей кожу или какой-либо орган собственного ребенка, потому что он содержит отцовские антигены. Как же в таком случае плод может в течение 9 мес сохраняться в теле матери? Почему мать не отторгает плод, как она делает это с органом, пересаженным ей от своего собственного ребенка?

Известно, что экспрессия отцовских антигенов начинается в развитии рано и что эти антигены обнаруживаются в клетках синцитиального трофобласта. Следовательно, локализация отцовских антигенов, по-видимому, такова, что они должны стимулировать иммунный ответ матери. Одна из гипотез для объяснения того, почему материнская иммунная система не отторгает плод, состоит в том, что хорион продуцирует вещества, блокирующие иммунную реакцию матери. Рассмотрим одно исследование, поддерживающее эту гипотезу. Данные, полученные в этом исследовании, показали (McIntire, Faulk, 1979), что клеточные мембраны синцитиального трофобласта у человека содержат вещество, которое подавляет деление некоторых клеток иммунной системы. Клеточный иммунный ответ, который приводит к отторжению, обусловлен клетками особого типа, так называемыми **Т-лимфоцитами** или просто **Т-клетками**. Т-клетки могут быстро делиться, когда встречаются с другой клеткой, содержащей иные антигены главного комплекса тканевой совместимости. Затем они помогают другим Т-клеткам разрушить чужие клетки или ткань. Реактивность Т-клеток оценивали в культуре смешанных лимфоцитов, определяя клеточную пролиферацию в смеси

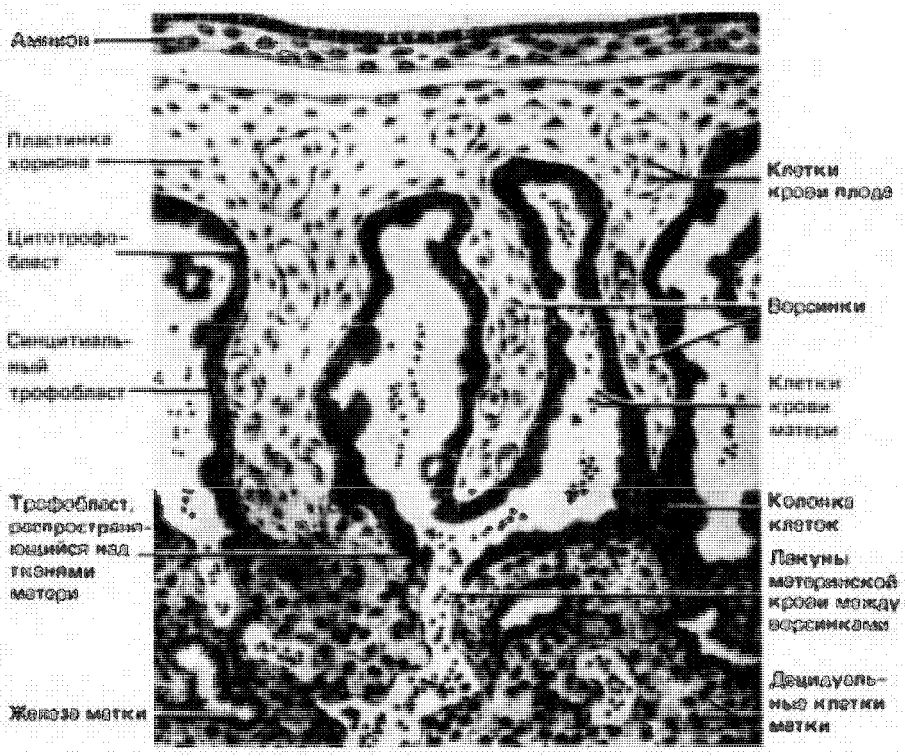


Рис. 4.45. Связь между ворсинками хориона и материнской кровью в матке. (По Hill, 1932.)

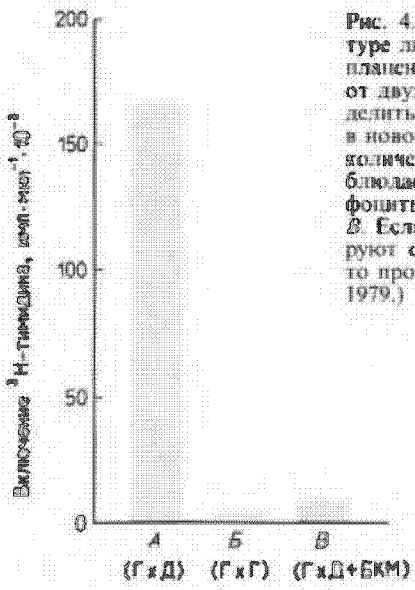


Рис. 4.46. Подавление пролиферации в смешанной культуре лимфоцитов материалом, экстрагированным из плаценты. *А*. Если смешать вместе лимфоциты, взятые от двух индивидуумов Г. и Д., то они начинают активно делиться, так как узнают чужие антигены. Поэтому в новообразованную ДНК будут включаться большие количества радиоактивного тимидина. *Б*. Этого не наблюдается в том случае, когда смешивают вместе лимфоциты, полученные от одного и того же индивидуума. *В*. Если смесь лимфоцитов (указанную на *А*) инкубируют с белками клеточных мембран трофобласта (БКМ), то пролиферация подавляется. (По McIntire, Faulk, 1979.)

двух популяций лимфоцитов. Если лимфоциты, взятые от индивидуума Г., смешивали с его же лимфоцитами, но предварительно облученными, чтобы предотвратить пролиферацию, то необлученные лимфоциты не делились (рис. 4.46). Однако, когда такие же лимфоциты смешивали с облученными лимфоцитами Д., необлученные лимфоциты Г. быстро делились и включали в ДНК радиоактивные предшественники. Реакцию можно было подавить добавлением к смеси экстракта белков клеточных мембран (БКМ) синцитиального трофобласта. Экстракты из других органов, приготовленные тем же способом, не подавляли деления клеток. Следовательно, клеточный иммунный ответ, по-видимому, может быть подавлен веществом, обнаруженным в клеточных мембранах синцитиального трофобласта. Вероятно, это только один из возможных путей, которыми хорион защищает плод от иммунной системы матери. Поэтому хорион следует считать сложным органом с несколькими функциями, каждая из которых способствует развитию лишенных желтка зародышей млекопитающих в теле матери.

Итак, при изучении гаструляции мы встречаемся с серией поразительно хорошо координированных клеточных движений, с помощью которых бластомеры, образовавшиеся в период дробления, перераспределяются и начинают взаимодействовать со своими новыми соседями. Кроме того, хотя между гаструляционными движениями у морских ежей, амфибий, птиц и млекопитающих имеются различия, некоторые механизмы этих движений являются общими для всех них. Каждая группа решает проблему — как привести клетки-предшественники мезодермы и энтодермы внутрь тела зародыша, одновременно окружив их клетками-предшественниками эктодермы. Отличающаяся от других по количеству и распределению желтка в яйце, а также живущая в разных условиях окружающей среды, каждая группа организмов нашла в процессе эволюции свой способ достижения этой цели. Итак, условия для формирования первых органов зародыша подготовлены.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

Anstrom J. A., Chin J. E., Leaf D. S., Parks A. L., Raff R. A. (1987). Localization and expression of msp 130, a primary mesenchyme lineage-specific cell surface protein of the sea urchin embryo. Development **101**, 255-265.

Azar Y., Eyal-Giladi H. (1979). Marginal zone cells — the primitive streak inducing component of the primary hypoblast in the chick. J. Embryol. Exp. Morphol. **52**, 79-88.

Azar Y., Eyal-Giladi H. (1981). Interaction of epiblast and hypoblast in the formation of the primitive streak and the embryonic axis in chick, as revealed by hypoblast rotation experiments. J. Embryol. Exp. Morphol. **61**, 133-141.

Balinsky B. I. (1975). Introduction to Embryology, 4th Ed. Saunders, Philadelphia.

Black S. D., Gerhart J. (1985). Experimental control of the site of embryonic axis formation in *Xenopus laevis* eggs centrifuged before first cleavage. Dev. Biol. **108**, 310-324.

Black S. D., Gerhart J. (1986). High frequency twinning of *Xenopus laevis* embryos from eggs centrifuged before first cleavage. Dev. Biol. **116**, 228-240.

Boucaut J.-C., D'Arribere T., Poole T. J., Aoyama H., Yamada K. M., Thiery J. P. (1984). Biologically active synthetic peptides as probes of embryonic development: A competitive peptide inhibition of fibronectin function inhibits gastrulation in amphibian embryos and neural crest cell migration in avian embryos. J. Cell Biol. **99**, 1822-1830.

Boucaut J.-C., D'Arribere T., Li S. D., Boulekbache H., Yamada K. M., Thiery J. P. (1985). Evidence for the role of fibronectin in amphibian gastrulation. J. Embryol. Exper. Morphol. **89** [Supp.], 211-227.

Carlson B. M. (1981). Patten's Foundations of Embryology, 4th Ed. McGraw-Hill, New York.

Cooke J. (1986). Permanent distortion of positional system of *Xenopus* embryo by brief early perturbation in gravity. Nature **319**, 60-63.

Delarue M., D'Arribere T., Almar C., Boucaut J.-C. (1985). Bufonid nucleocytoplasmic hybrids arrested at the early gastrula stage lack a fibronectin-containing fibrillar extra-

cellular matrix. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. **194**, 275-280.

Duband J. L., Thiery J. P. (1982). Appearance and distribution of fibronectin during chick embryo gastrulation and neurulation. Dev. Biol. **94**, 337-350.

Ettensohn C. A. (1985). Gastrulation in the sea urchin embryo is accompanied by the rearrangement of invaginating epithelial cells. Dev. Biol. 112, 383-390.

Fink R. D., McClay D. R. (1985). Three cell recognition changes accompany the ingression of sea urchin primary mesenchyme cells. Dev. Biol. **107**, 66-74.

Fisher M., Solursh M. (1977). Glycosaminoglycan localization and role in maintenance of tissue spaces in the early chick embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. **42**, 195-207.

Galileo D. S., Morrill J. B. (1985). Patterns of cells and extracellular material of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata; Echinoidea) embryo, from hatched blastula to late gastrula. J. Morphol. **185**, 387-402.

Gerhart J., Ubbels G., Black S., Hara K., Kirschner M. (1981). A reinvestigation of the role of the grey crescent in axis formation in *Xenopus laevis*. Nature **292**, 511-516.

Gerhart J. and seven others (1986). Amphibian early development. Bio-Science **36**, 541-549.

Gibbins J. R., Tilney L. G., Porter K. R. (1969). Microtubules in the formation and development of the primary mesenchyme of *Arbacia punctulata*. Dev. Biol. **18**, 523-539.

Gimlich R. L., Gerhart J. C. (1984). Early cellular interaction promote embryonic axis formation in *Xenopus laevis*. Dev. Biol. **104**, 117-130.

Gustafson T., Wolpert L. (1961). Studies on the cellular basis of morphogenesis in sea urchin embryos: Directed movements of primary mesenchyme cells in normal and vegetalized larvae. Exp. Cell Res. **24**, 64-79.

Gustafson T., Wolpert L. (1967). Cellular movement and contact in sea urchin morphogenesis. Biol. Rev. **42**, 442-498.

Hardin J. D., Cheng L. Y. (1986). The mechanisms and mechanics of archenteron elongation during sea urchin gastrulation. Dev. Biol. **115**, 490-501.

Harkey M. A., Whiteley A. M. (1980). Isolation, culture and differentiation of echinoid primary mesenchyme cells. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. **189**, 111-122.

Heifetz A., Lennarz W. J. (1979). Biosynthesis of N-glycosidically linked glycoproteins during gastrulation of sea urchin embryos. J. Biol. Chem. **254**, 6119-6127.

Hill J. P. (1932). The developmental history of primates. Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Biol] **221**, 45-178.

Holtfreter J. (1943). A study of the mechanics of gastrulation: Part I. J. Exp. Zool. **94**, 261-318.

Holtfreter J. (1944). A study of the mechanics of gastrulation: Part II. J. Exp. **95**, 171-212.

Hörstadius S. (1939). The mechanics of sea urchin development, studied by operative methods. Biol. Rev. **14**, 132-179.

Karp G. C., Solursh M. (1974). Acid mucopolysaccharide metabolism, the cell surface, and primary mesenchyme cell activity in the sea urchin embryo. Dev. Biol. **41**, 110-123.

Karp G. C., Solursh M. (1985). Dynamic activity of the filopodia of sea urchin embryonic cells and their role in directed migration of the primary mesenchyme *in vitro*. Dev. Biol. **112**, 276-283.

Katoh H., Hayashi M. (1985). Role of fibronectin in primary mesenchyme cell migration in the sea urchin. J. Cell Biol. **101**, 1487-1491.

Keller R. E. (1975). Vital dye mapping of the gastrula and neurula of *Xenopus laevis*. I. Prospective areas and morphogenetic movements of the superficial layer. Dev. Biol. **42**, 222-241.

Keller R. E. (1976). Vital dye mapping of the gastrula and neurula of *Xenopus laevis*. II. Prospective areas and morphogenetic movements in the deep layer. Dev. Biol. **51**, 118-137.

Keller R. E. (1978). Time-lapse cinemicrographic analysis of superficial cell behaviour during and prior to gastrulation in *Xenopus laevis*. J. Morphol. **157**, 223-248.

Keller R. E. (1980). The cellular basis of epiboly: An SEM study of deep cell rearrangement during gastrulation of *Xenopus laevis*. J. Embryol. Exp. Morphol. **60**, 201-243.

Keller R. E. (1981). An experimental analysis of the role of bottle cells and the deep marginal zone in the gastrulation of *Xenopus laevis*. J. Exp. Zool. **216**, 81-101.

Keller R. E. (1986). The cellular basis of amphibian gastrulation. In: L. Browder (ed.), Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis, Vol. 2. Plenum Press, New York, pp. 241-327.

Keller R. E., Schoenwolf G. C. (1977). An SEM study of cellular morphology, contact, and arrangement as related to gastrulation in *Xenopus laevis*. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. **182**, 165-186.

Keller R. E., Danilchik M., Gimlich R., Shih J. (1985). Convergent extension by cell intercalation during gastrulation of *Xenopus laevis*. In: G. M. Edelman (ed.), Molecular Determinants of Animal Form. Alan R. Liss, New York, pp. 111-141.

Kirschner M. W., Gerhart J. C. (1981). Spatial and temporal changes in the amphibian egg. Bioscience **31**, 381-388.

Landstrom U., Lovtrup S. (1979). Fate maps and cell differentiation in the amphibian embryo: An experimental study. J. Embryol. Exp. Morphol. **54**, 113-130.

Langman J. (1981). Medical Embryology, 4th Ed. Williams and Wilkins, Baltimore.

Lillie F. R. (1902). Differentiation without cleavage in the egg of the annelid *Chaetopterus pergamentaceous*. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **14**, 477-499.

Lovtrup S. (1975). Fate maps and gastrulation in amphibia: A critique of current views. Can. J. Zool. **53**, 473-479.

Luckett W. P. (1978). Origin and differentiation of the yolk sac and extraembryonic mesoderm in presomite human and rhesus monkey embryos. Am. J. Anat. **152**, 59-98.

Lundmark C. (1986). Roles of bilateral zones of ingressing superficial cells during gastrulation of *Ambystoma mexicanum*. J. Emb. Exp. Morph. **97**, 47-62.

Malacinski G. M., Chung H. M., Asashima M. (1980). The association of primary embryonic organizer activity with the future dorsal side of amphibian eggs and early embryos. Dev. Biol. **77**, 449-462.

McIntire J. A., Faulk W. P. (1979). Trophoblast modulation of maternal allogeneic recognition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4029-4032.

Moore A. R. (1941). On the mechanism of gastrulation in *Dendraster excentricus*. J. Exp. Zool. **87**, 101-111.

Moore A. R., Burt A. S. (1939). On the locus and nature of the forces causing gastrulation in the embryos of *Dendraster excentricus*. J. Exp. Zool. **82**, 159-171.

Morrill J. B. (1986). Scanning electron microscopy of embryos. In: T. Schroeder (ed.), Methods in Cell Biology. Academic Press, New York.

Morrill J. B., Santos L. L. (1985). A scanning electron micrographical overview of cellular and extracellular patterns during blastulation and gastrulation in the sea urchin, *Lytechinus variegatus*. In: R. H. Sawyer and R. M. Showman (eds.), The Cellular and Molecular Biology of Invertebrate Development. U. South Carolina Press, pp. 3-33.

Nakatsuji N., Johnson K. E. (1983). Conditioning of a culture substratum by the ectodermal layer promotes attachment and oriented locomotion by amphibian gastrula mesodermal cells. J. Cell Sci. **59**, 43-60.

Nakatsuji N., Smolira M. A., Wylie C. C. (1985). Fibronectin visualized by scanning electron microscope immunocytochemistry on the substratum for cell migration in *Xenopus laevis* gastrulae. Dev. Biol. **107**, 264-268.

Neff A. W., Wakahara M., Jurand A., Malacinski G. M. (1984). Experimental analysis of cytoplasmic rearrangements which

follow fertilization and accompany symmetrization of inverted *Xenopus* eggs. J. Embryol. Exper. Morphol. **80**, 197-224.

New D. A. T. (1959). Adhesive properties and expansion of the chick blastoderm. J. Embryol. Exp. Morphol. **7**, 146-164.

Newport J. W., Kirschner M. W. (1982). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos. I. Characterization and timing of cellular changes at midblastula stage. Cell **30**, 675-686.

Pasteels J. (1948). Les bases de la morphogenese chez les vertebres anamniotes au function de la structure de l'oeuf. Folia Biotheoret. (Leiden) **3**, 83-108.

Penners A., Schleip W. (1928). Die Entwicklung der Schultzeschen Doppelbildungen aus dem Ei von *Rana fusca*. Teil V. und VI. Z. Wissen Zool. **131**, 1-156.

Pfluger E. (1883). Uber den Einfluss der Schwerkraft auf die Teilung der Zellen. Pfluegers Arch. **32**, 1-79.

Rhumbler L. (1902). Zur Mechanik des Gastrulationvorganges insbesundere der Invagination. Eine Entwicklungsmechanische Studie. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **14**, 401-476.

Rosenquist G. C. (1972). Endoderm movements in the chick embryo between the short streak and head process stages. J. Exp. Zool. **180**, 95-104.

Rugh R. (1951). The Frog: Its Reproduction and Development. Blakiston, Philadelphia.

Schlesinger A. B. (1958). The structural significance of the avian yolk in embryogenesis. J. Exp. Zool. **138**, 223-258.

Schroeder T. (1981). Development of a "primitive" sea urchin (*Eucidaris tribuloides*): Irregularities in the hyaline layer, micromeres, and primary mesenchyme. Biol. Bull. **161**, 141-151.

Sharf S., Gerhart J. (1983). Axis determination in the eggs of *Xenopus laevis*: A critical period before first cleavage, identified by the common effects of cold, pressure, and ultraviolet irradiation. Dev. Biol. **99**, 75-87.

Solursh M., Morriss G. M. (1977). Glycosaminoglycan synthesis in rat embryos during the formation of the primary mesenchyme and neural folds. Dev. Biol. **57**, 75-86.

Solursh M., Revel J. P. (1978). A scanning electron microscope study of cell shape and cell appendages in the primitive streak region of the rat and chick embryo. Differentiation **11**, 185-190.

Spemann H., Mangold H. P. (1924). Induction of embryogenic primordia by the implantation of organizer from different species. In: B. Willier and J. M. Oppenheimer (eds.), Foundations of Experimental Embryology (1974). Hafner, New York, pp. 144-184.

Spratt N. T., Jr. (1946). Formation of the primitive streak in the explanted chick blastoderm marked with carbon particles. J. Exp. Zool. **103**, 259-304.

Spratt N. T., Jr. (1947). Regression and shortening of the primitive streak in the explanted chick blastoderm. J. Exp. Zool. **104**, 69-100.

Spratt N. T., Jr. (1963). Role of the substratum, supracellular continuity, and differential growth in morphogenetic cell movements. Dev. Biol. **7**, 51-63.

Sugiyama K. (1972). Occurrence of mucopolysaccharides in the early development of the sea urchin embryo and its role in gastrulation. Dev. Growth Differ. **14**, 62-73.

Tilney L. C., Gibbins J. R. (1969). Microtubules in the formation and development of the primary mesenchyme in *Arbacia punctulata*. II. An experimental analysis of their role in the development and maintenance of cell shape. J. Cell Biol. **41**, 227-250.

Trinkaus J. P. (1984). Cells into Organs: The Forces that Shape the Embryo, 2nd Ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Vogt W. (1929). Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit ortlicher Vitalfarbung. II. Teil Gastrulation und Mesodermbildung bei Urodelen und Anuren. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **120**, 384-706.

Waddington C. H. (1932). Experiments in the development of chick and duck embryos cultivated *in vitro*. Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. [Biol.] **13**, 221.

Wessel G. M., Marchase R. B., McClay D. R. (1984). Ontogeny of the basal lamina in the sea urchin embryo. Devel. Biol. **103**, 235-245.

Zander J., Munstermann A. M. von (1956). Progesteron in menschlichem Blut und Geweben. III. Klin. Wschr. **34**, 944-953.

Глава 5

Раннее развитие позвоночных. Производные эктодермы, их органо- и гистогенез

Если вы хотите изумиться — именно этот процесс вызовет у вас чувство подлинного изумления. Все начинается с одной клетки, образовавшейся в результате слияния спермия с яйцом; эта клетка делится сначала на две, затем на четыре, на восемь и т. д., и на определенной стадии возникает новая клетка, все потомки которой дают начало головному мозгу. Само существование такой клетки уже представляется одним из удивительнейших феноменов на Земле. Людям следовало бы не думать ни о чем другом, кроме нее, взывая друг к другу в бесконечном удивлении.

ЛЬЮИС ТОМАС (1979)

Жизнь само смеется границы, созданные нами между отдельными науками и отраслями знания.

ГАНС ДЖОНАС (1966)

Основные черты развития позвоночных

В 1828 г. Карл Эрнст фон Бэр, выдающийся эмбриолог того времени [1], писал: «Я зафиксировал в спирте двух маленьких зародышей, забыв пометить их. А теперь не могу определить, к какому роду животных они относятся. Они могут быть ящерицами, мелкими птицами или даже млекопитающими!» Рис. 5.1 помогает нам понять его затруднение. Этот рисунок иллюстрирует сформулированные Бэром четыре общих закона эмбриологии. Детально изучив развитие куриного зародыша и сравнив его с развитием зародышей других позвоночных, он сформулировал четыре общих правила, проиллюстрированных здесь на примере нескольких позвоночных животных.

1. *Признаки, общие для той или иной большой группы животных, появляются в эмбриогенезе раньше, чем специализированные.* Зародыши всех позвоночных (рыб, рептилий, амфибий, птиц и млекопитающих) сразу после гаструляции очень похожи друг на друга. Только позже в развитии возникают признаки, характерные для класса, отряда и, наконец, для вида (рис. 5.1). Все зародыши позвоночных имеют жаберные щели, хорду, нервную трубку и пронефросы.

2. *Менее общие признаки развиваются из более общих, пока, наконец, не почнутся наиболее специализированные.* У некоторых рыб пронефросы функционируют на протяжении всей жизни животного. Этот тип почек можно обнаружить у зародышей всех других позвоночных. Однако у более высокоорганизованных видов животных такие почки никогда не функционируют, хотя и участвуют в последующем развитии более специализированных почек. У всех позвоночных кожа поначалу сходна. Только позднее в коже развиваются структуры, характерные для определенной группы животных: чешуя рыб и рептилий, перья птиц или волосы, когти и ногти млекопитающих. Точно также раннее развитие конечности в сущности одинаково у всех позвоночных. Только позже становятся очевидными различия между плавниками, ногами, крыльями и руками.

3. *Каждый зародыш данного вида не проходит в своем развитии через взрослые стадии других животных, но все более и более отдаляется от них.* Жаберные щели зародышей птиц и млекопитающих не похожи в деталях на жаберные щели взрослых рыб.

[1] К. Э. фон Бэр открыл хорду, впервые описал яйцо у млекопитающих и человека и создал излагаемую ниже концепцию развития.

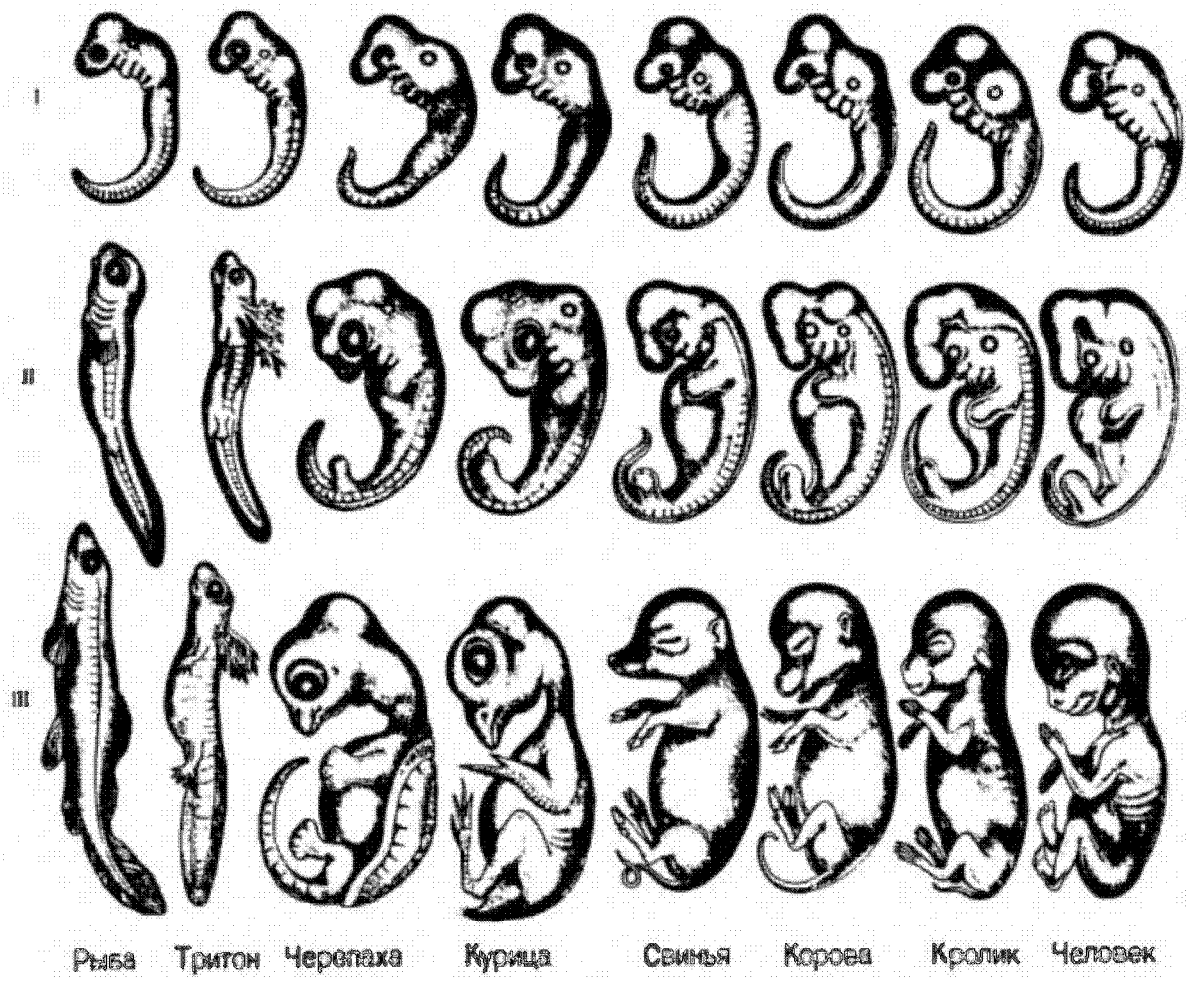


Рис. 5.1. Иллюстрация к закону Бэра. Ранние зародыши позвоночных обнаруживают черты, общие для всего подтипа. По мере развития зародыши становятся узнаваемыми как члены их класса, их отряда, их семейства и, наконец, их вида. (Из Romanes, 1901.)

Они скорее напоминают жаберные щели *зародышей* рыб и *зародышей* других позвоночных. И если у рыб они сохраняются и превращаются в настоящие жаберные щели, то у млекопитающих они преобразуются в такие структуры, как, например, евстахиевы трубы (находящиеся между полостью среднего уха и ротовой полостью).

4. *Следовательно, ранний зародыш более высокоорганизованного животного никогда не подобен взрослой особи низкоорганизованного животного, а подобен только раннему зародышу этого последнего.*

Фон Бэр видел, что различные группы животных на ранних стадиях развития сохраняют некоторые общие черты; эти черты в процессе дальнейшего развития изменяются, становясь все более и более характерными для данного вида. Зародыш человека никогда не проходит стадии, эквивалентной взрослой рыбе или птице. Вначале для всех этих зародышей характерны некие общие признаки. Затем зародыши начинают все сильнее отличаться друг от друга, т. е. происходит процесс дивергенции, и никто из них не повторяет стадии развития других[1].

[1] Эта работа фон Бэра была предана забвению после того, как Эрнст Геккель осуществил синтез германского романтизма и дарвинизма, утверждая, что «Онтогенез (индивидуальное развитие) повторяет филогенез (эволюционную историю вида)». В связи с этим различные стадии развития человеческого зародыша рассматривались как соответствующие взрослым стадиям организмов, стоящих на более низкой ступени эволюционной лестницы. Такая точка зрения была научно дискредитирована даже раньше, чем была предложена, однако Геккель обладал редким умением показать товар лицом, а его теория с легкостью «объясняла» человеческий прогресс. Поэтому она распространилась в биологии и общественных науках со сверхъестественной скоростью прежде, чем было показано, что в ее основе лежат ложные предпосылки (см. Gould, 1977).

Эти заключения были чрезвычайно важны для Чарлза Дарвина, потому что эволюционная классификация зависела от нахождения таких признаков сходства, которые доказывали бы происхождение различных животных от общего предка. «Общность строения зародышей,— писал Дарвин в «Происхождении видов» (1859),— свидетельствует об общности происхождения». Дарвин действительно полагал, что эмбриология предоставляет наиболее веские данные в пользу его эволюционной теории. Фон Бэр, конечно, не был эволюционистом, когда он опубликовал свои четыре закона в 1828 г. Он вообще никогда не был им. Фон Бэр полагал, что обнаружил божественный план, по которому развиваются все организмы в такой группе, как позвоночные. Поскольку все более ранние эволюционные теории рассматривали эволюцию как единую непрерывную серию трансформаций, наблюдения фон Бэра часто использовались как аргумент против теории эволюции. Дарвин, однако, понял, что работа Бэра поддерживает его эволюционную гипотезу, согласно которой несколько разных типов организмов могли произойти от общего предка путем наследования модификаций, приобретаемых в процессе эмбрионального развития. Причина, по которой зародыши человека, рыбы и птицы имеют жаберные щели, заключается в том, что эти животные произошли от общего предка, чьи зародыши имели такие жаберные щели. Более того, в разных группах организмов из жаберных щелей формировались разные органы (жабры у рыб, евстахиевы трубы у млекопитающих), потому что изменялся план строения тела общего предка и эти изменения отбирались разными условиями среды.

Фон Бэр также установил, что в развитии позвоночных имеются общие черты. Три зародышевых листка у всех позвоночных дают начало разным органам, и эти различия в производных разных зародышевых листков одинаковы для любых животных, будь то рыба, лягушка или птица. Из эктодермы образуются кожа и нервы; из энтодермы — дыхательная и пищеварительная трубки, а из мезодермы — соединительная ткань, клетки крови, мочеполовая система и части большинства внутренних органов. В этой главе мы рассмотрим раннее развитие эктодермы, сосредоточив внимание на развитии нервной системы. Следующая глава будет посвящена раннему развитию мезодермальных и энтодермальных органов.

Нейруляция

У позвоночных в результате гаструляции образуется зародыш, состоящий из внутреннего энтодермального, промежуточного мезодермального и наружного эктодермального листков. Непосредственно под дорсальным участком эктодермы располагается материал хордомезодермы. Взаимодействие этого материала с лежащей над ним эктодермой является одним из наиболее важных во всем развитии; оно побуждает эктодерму формировать полую **нервную трубку**, которая даст начало головному и спинному мозгу. Итак, мы приступаем к изучению новой фазы развития — **органогенеза**, т. е. образования специфических тканей и органов. Действие, посредством которого хордомезодерма инициирует развитие нервной трубки из эктодермы, называется **первичной эмбриональной индукцией**, а клеточный ответ на индукцию, приводящий к трансформации плоского слоя эктодермальных клеток в полую нервную трубку, называется **нейруляцией**. Последовательность событий, осуществляющихся в период нейруляции, представлена в виде схемы на рис. 5.2. В эктодерме образуются клетки трех типов: 1) клетки нервной трубки, 2) клетки эпидермиса кожи и 3) клетки нервного гребня, мигрирующие из области, которая соединяет нервную трубку с эпидермисом. Зародыш, претерпевающий эти изменения, называется **нейрулой**. Явление первичной эмбриональной индукции будет подробно рассмотрено в гл. 8. Здесь же мы будем говорить о реакции на нее различных тканей эктодермального происхождения.

Процесс нейруляции у зародышей лягушки представлен на рис. 5.3. Механизмы образования нервной трубки у амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих, по-видимому, сходны (Gallera, 1971), поэтому мы рассмотрим этот процесс у разных

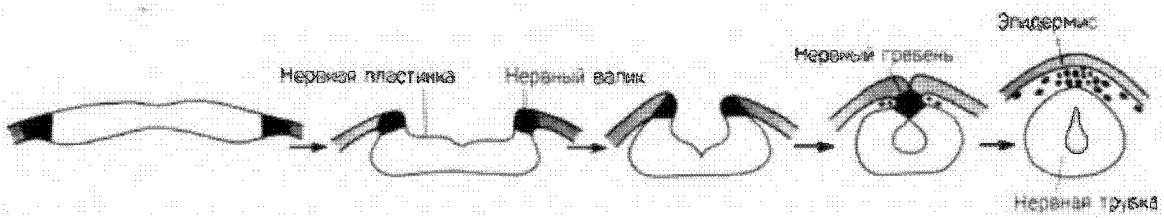


Рис. 5.2. Схема образования нервной трубки у амфибий и амниот. Эктодермальные клетки представлены либо как предшественники нервного гребня (обозначен черным цветом) и нервной трубки (обозначена белым), либо как предшественники эпидермиса (обозначен серым цветом). Сомкнувшись по будущей срединеспинной линии, эктодермальные складки образуют наружный слой — покровный эпителий — и лежащую внутри нервную трубку, которые соединены посредством клеток нервного гребня. (По Balinsky, 1975.)

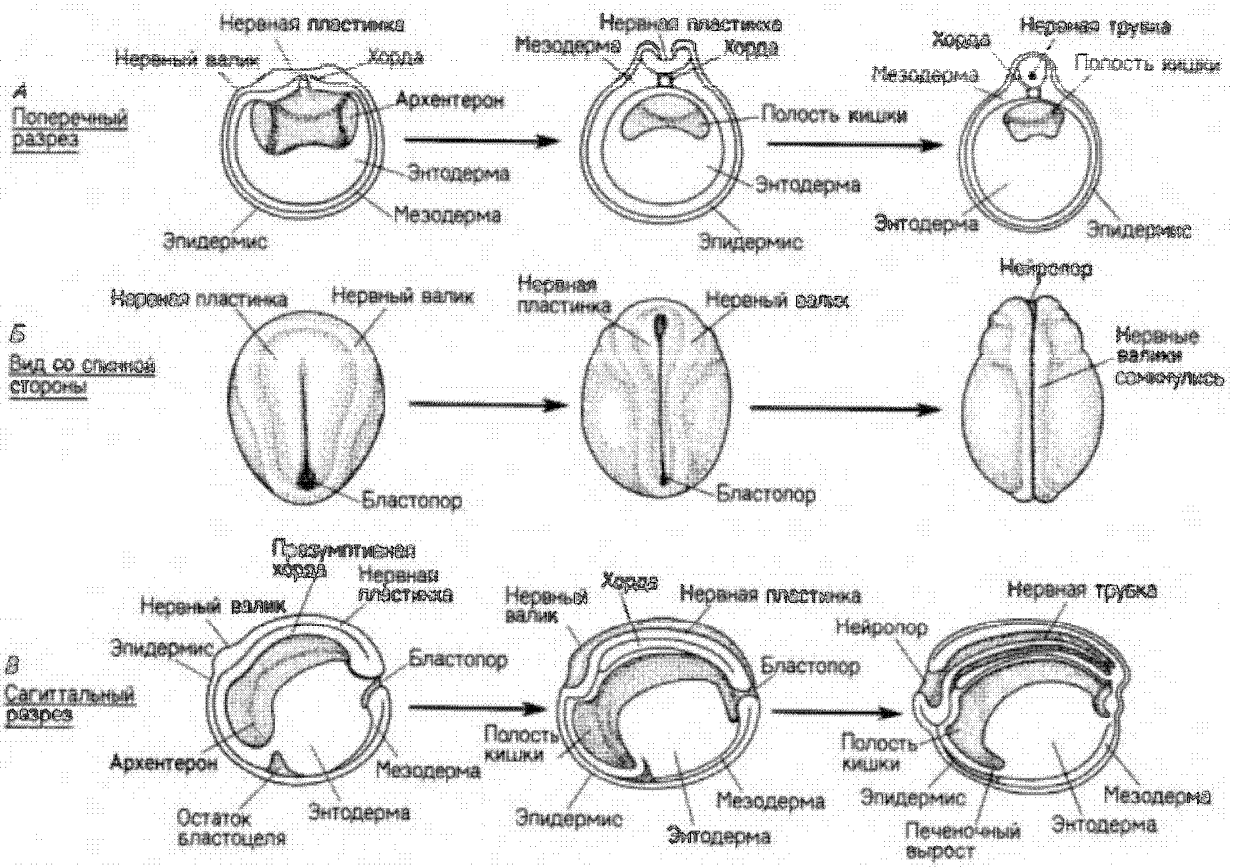


Рис. 5.3. Процесс нейруляции у зародыша лягушки, изображенный в трех проекциях (*А*, *Б*, *В*) на стадиях ранней (*слева*), средней (*в центре*) и поздней (*справа*) нейрулы. *А*. Поперечные разрезы через середину зародыша. *Б*. Вид на целый зародыш со спинной стороны. *В*. Сагиттальные разрезы через медианную плоскость зародыша. (По Balinsky, 1975.)

групп в том же порядке, в котором начали наш обзор развития зародышей этих групп[1]. Первым указанием на то, что данный участок эктодермы предназначен стать нервной тканью, является изменение формы клеток (рис. 5.4). Эктодермальные клетки, расположенные в центре дорсальной области, становятся удлиненными, тогда как клетки, предназначенные для образования эпидермиса, уплощаются. Удлинение дорсальных эктодермальных клеток приводит к тому, что эти проспективные нейральные области приподнимаются над окружающей их эктодермой, образуя **нервную пластинку**. Она занимает не менее 50% площади всей эктодермы. Вскоре после образования нервной пластинки ее края утолщаются и движутся вверх, образуя **нервные валики**, а в центре нервной пластинки возникает U-образный **нервный желобок**, разделяющий зародыша на будущие правую и левую половины (рис. 5.3 и 5.5). Нервные валики, приподнимаясь, движутся навстречу друг другу и в конечном счете сливаются по среднеспинной линии зародыша. В результате нервная пластинка превращается в лежащую под эктодермальным эпителием нервную трубку. Клетки в области, соединяющей этот эпителий с нервной трубкой, являются клетками **нервного гребня**. Позднее эти клетки мигрируют по всему зародышу, давая начало нескольким клеточным популяциям, в том числе пигментным клеткам и клеткам периферической нервной системы.

[1] По способу образования нервной трубки костистые рыбы и костные ганоиды отличаются от других классов позвоночных. У рыб она формируется не путем образования и последующего слияния складок наружной эктодермы, а закладывается в виде плотного клеточного тяжа, погружающегося в зародыш. Этот тяж постепенно становится полым и превращается в нервную трубку. У млекопитающих только самый задний участок нервной трубки формируется путем образования в нем полости (путем кавитации).

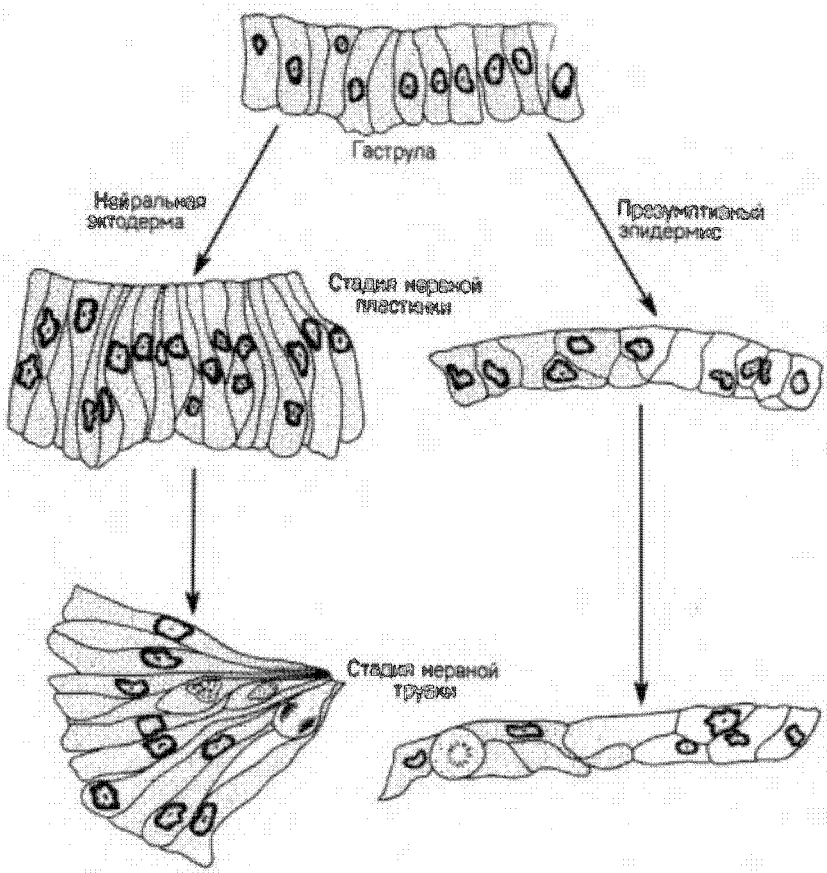


Рис. 5.4. Схема, иллюстрирующая изменения формы клеток эктодермы в период гаструляции у тритона. К концу гаструляции клетки образуют однослойный эпителий. Во время нейруляции нейральные эпителиальные клетки удлиняются, образуя нервную пластинку, а затем при формировании нервной трубки их апикальные концы сужаются. Презумптивные эпидермальные клетки в процессе нейруляции уплощаются. (По Burnside, 1971.)

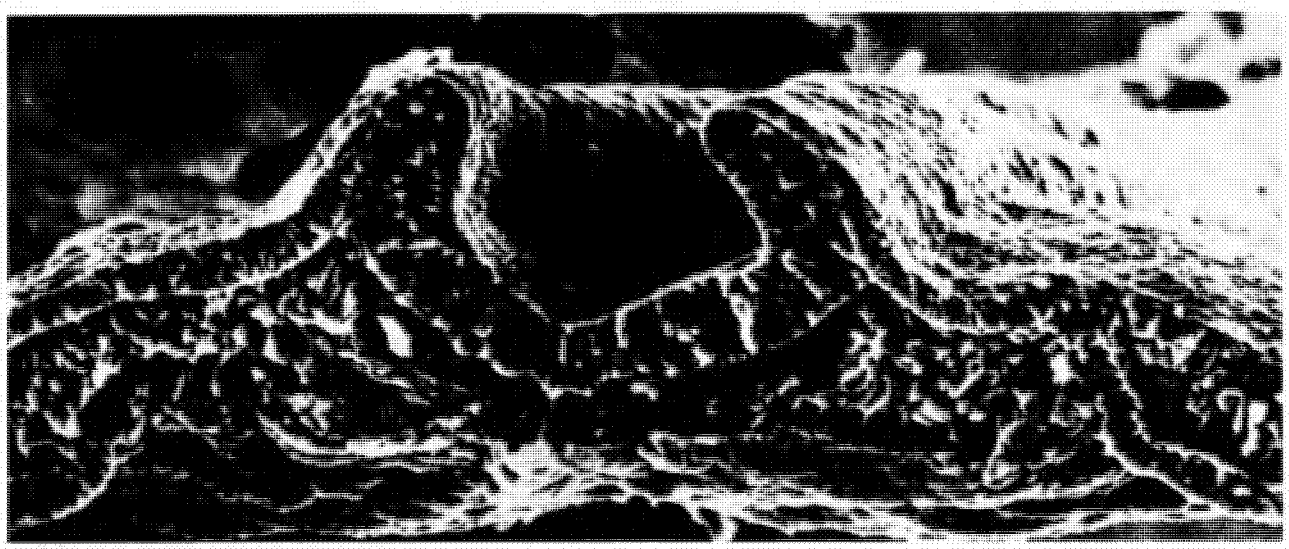


Рис. 5.5. Формирование нервной трубки у куриного зародыша. Удлиненные клетки нейрального эпителия образуют трубку, тогда как уплощенные эпидермальные клетки перемещаются по направлению к срединной линии зародыша. Микрофотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Фотография с любезного разрешения K. W. Tosney.)

Нервная трубка и происхождение центральной нервной системы

Формирование нервной трубки происходит неодновременно во всей эктодерме. Это лучше всего видно на таких позвоночных, как птицы и млекопитающие, у которых зародыш удлиняется по продольной оси до начала нейруляции. На рис. 5.6 этот процесс проиллюстрирован на примере куриного зародыша. Нейруляция в головной области продвинулась уже далеко, тогда как в хвостовом отделе еще продолжается гаструляция. Регионализация нервной трубки является также результатом изменений ее формы. В головном конце (где будет формироваться головной мозг) стенка трубки широкая и толстая. В ней рядом вздутий и сужений обозначены различные отделы (компартменты) головного мозга. Однако каудальнее головного отдела она сохраняет вид простой, сужающейся по направлению к хвосту трубки. Два открытых конца нервной трубки называются соответственно передним и задним нейропором. У млекопитающих амниотическая жидкость в течение некоторого времени протекает через нервную трубку, входя и выходя из этих отверстий (рис. 5.7). Однако если к 27 дню беременности задний нейропор еще остается открытым (или если он вскоре после замыкания снова разрывается), то возникает spina bifida — нарушение развития, тяжесть которого зависит от того, насколько большой участок нервной трубки остается открытым. Несмыкание переднего нейро-

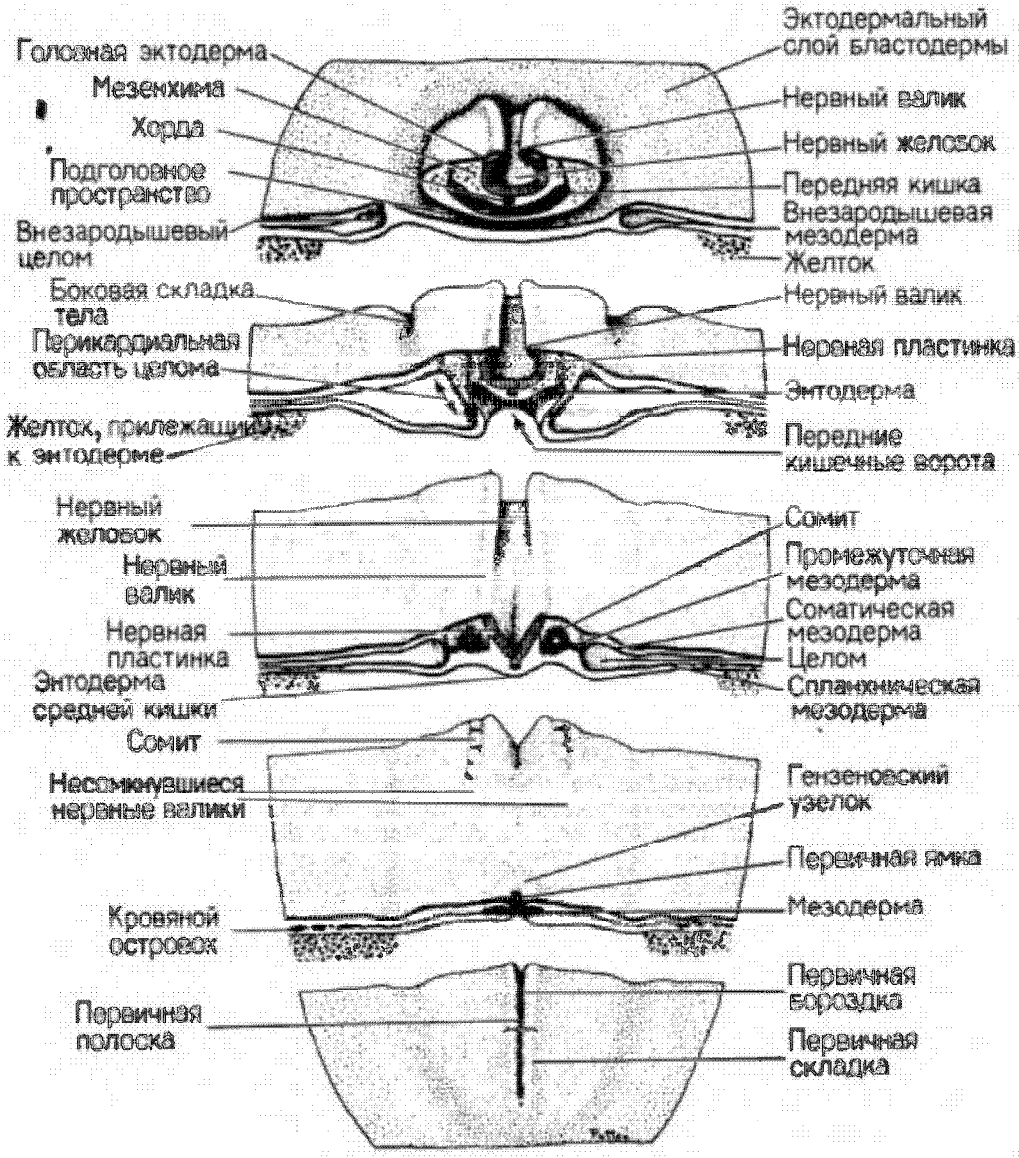


Рис. 5.6. Трехмерное изображение 24-часового куриного зародыша. В головной области заканчивается нейруляция, тогда как в хвостовой области продолжается гаструляция. (Из Patten, 1971; по Huettner, 1949.)

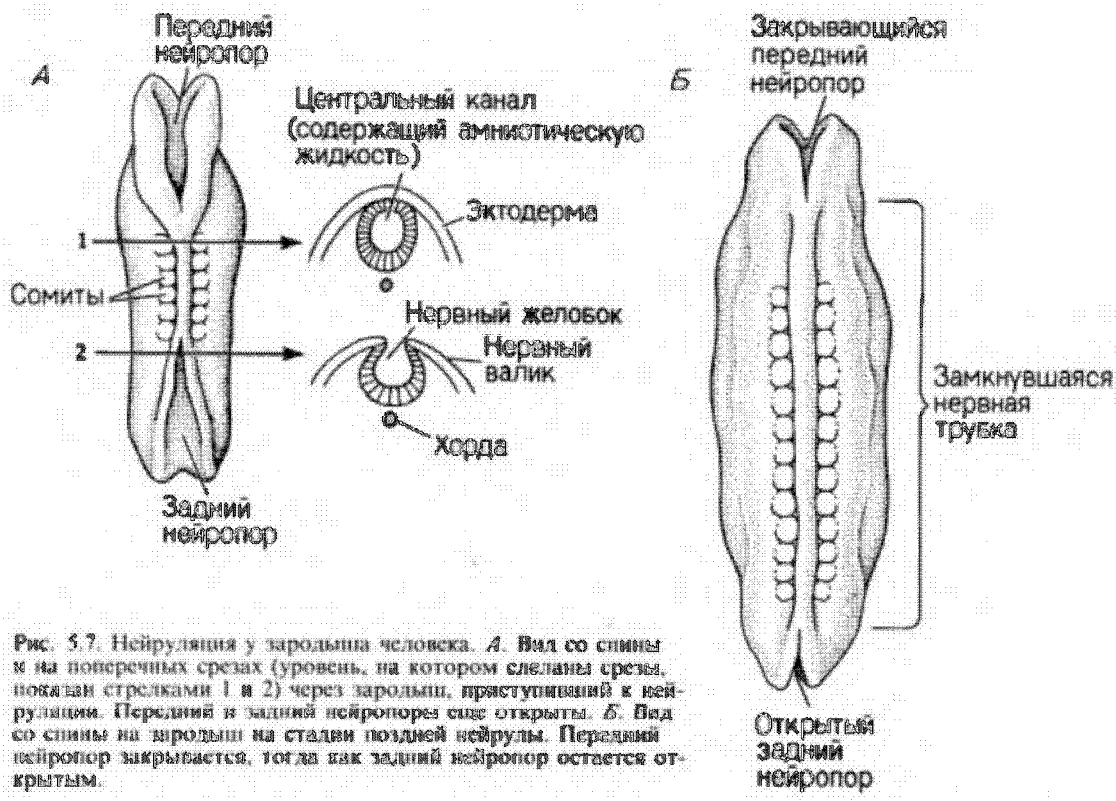


Рис. 5.7. Нейруляция у зародыша человека. *А.* Вид со спины и на поперечных срезах (уровень, на котором сделаны срезы, показан стрелками 1 и 2) через зародыш, приступивший к нейруляции. Передний и задний нейропоры еще открыты. *Б.* Вид со спины на зародыш на стадии поздней нейрулы. Передний нейропор закрывается, тогда как задний нейропор остается открытым.

пора приводит к анэнцефалии, исход которой летален. Сохраняющийся контакт переднего мозга с амниотической жидкостью вызывает его дегенерацию. Развитие переднего мозга плода прекращается, и свод черепа не формируется. У человека такая аномалия развития встречается не очень редко, примерно в 0,1% случаев всех беременностей. Дефекты смыкания нервной трубки теперь могут быть обнаружены во время беременности с помощью различных физических и химических тестов.

Механизм формирования нервной трубки

Формирование нервной трубки тесно связано с изменениями формы клеток, в которых участвуют микротрубочки и микрофиламенты. Эктодермальные клетки удлиняются по мере того, как случайно ориентированные микротрубочки выстраиваются в них параллельно удлиняющейся оси клетки (рис. 5.8). Эту стадию формирования нервной трубки можно блокировать колхицином, ингибитором полимеризации микротрубочек (Burnside, 1973). Второе изменение формы клеток состоит в их апикальном сужении — они принимают вид цилиндра; это изменение связано с образованием кольца актиновых микрофиламентов, окружающих апикальные края клеток. Сокращение этих микрофиламентов вызывает эффект «ремешка, стягивающего кисет (или старинный кошелек)», — они стягивают апикальный конец каждой клетки. Было показано (Burnside, 1971; Karfunkel, 1972), что у зародышей, культивируемых в присутствии цитохалазина В, нейроэпителиальные клетки удлиняются, но не могут сузиться, и поэтому нервные валики не образуются. Актин связан с миозином, из которого он способен получать энергию для сокращения (Nagele, Lee, 1980), а также с апикальной мембраной. Эта связь осуществляется через **спектрин** — интегральный белок плазматической мембраны, который может соединяться с микрофиламентами внутри клетки (Sadler et al., 1986). Локализация спектрина точно соответствует расположению микрофиламентов, что позволяет предположить активное их участие в изменении формы клеток.

Совместными усилиями биологов и математиков удалось показать, что одних лишь этих изменений — удлинения и сжатия — вполне достаточно, чтобы плоский слой клеток превратился в полую трубку внутри зародыша (Odell et al., 1981). При машинном моделировании нейруляции были заданы следующие условия: исходный слой эктодермы состоит из кубовидных клеток, расположенных бок о бок, но тесно соединенных вместе апикальными концами (рис. 5.9). На этих концах имеются пучки микрофи-

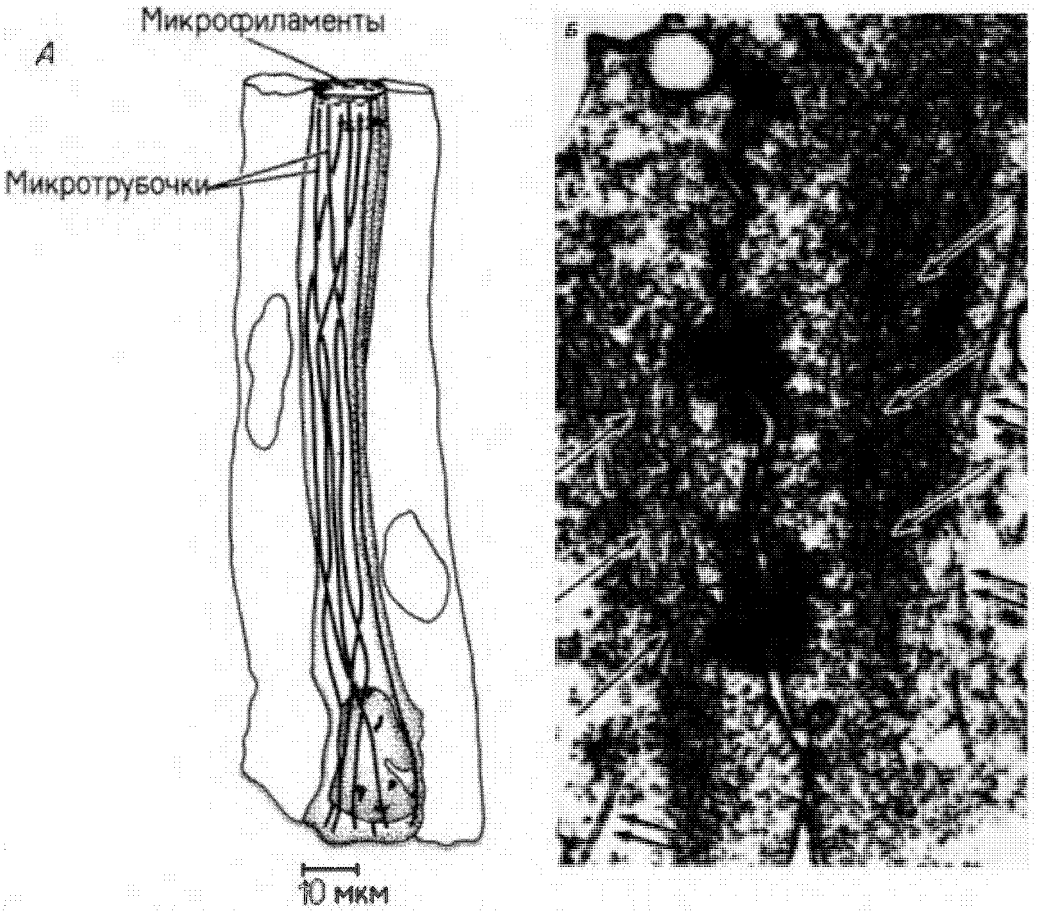


Рис. 5.8. Ориентация микротрубочек и микрофиламентов в клетках нервной пластинки. *А*. Микротрубочки выстроились вдоль длинной оси клетки; микрофиламенты окружают ее верхушку. Микрофиламенты часто бывают прикреплены к десмосомам, специфическим структурам на клеточной мембране в месте контакта между двумя клетками. *Б*. Пучки апикальных микрофиламентов (показаны длинными одиночными стрелками), видимые вблизи десмосом по обеим сторонам межклеточных контактов. Видны также микротрубочки (указаны короткими двойными стрелками). (Из Burnside, 1971; фотография с любезного разрешения B. Burnside.)

Рис. 5.9. Компьютерная модель формирования нервной трубки у амфибий. (По Odell et al., 1981.)

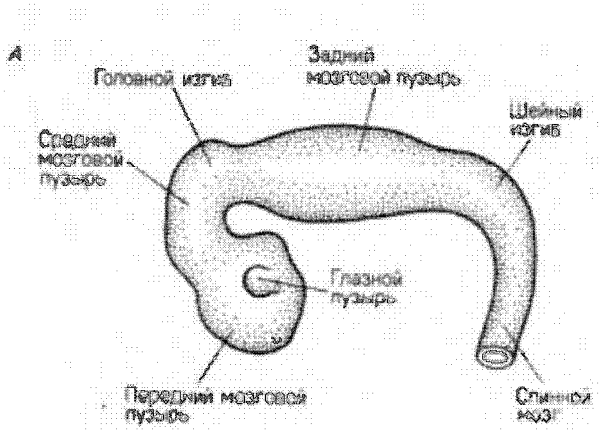
ламентов. Главное условие, которое необходимо было проверить в этой модели, заключалось в том, что способность «ремешка в кошельке» к растяжению ограничена. Предполагалось, что сверх этого порога упругости начинается сокращение ремешка, стягивающее кольцо в окружность меньшего диаметра, чем предыдущая. Оставшуюся часть клетки принимали за упругое тело постоянного объема, а апикальный конец каждой клетки считали тесно связанным с апикальными концами соседних клеток. Следовательно, сокращение микрофиламентов в одной клетке должно растягивать окружность апикального конца любой из прилежащих клеток и индуцировать волну сокращений по мере того, как клетки последовательно растягиваются выше их порога упругости и сокращаются. Таким образом генерируется волна сокращений во всех клетках, которые прочно связаны своими апикальными концами. Когда такое ограничение упругости было запрограммировано в компьютере, результат моделирования показал, что нейруляция должна происходить тем самым способом, который описан при эмбриологических наблюдениях.

Дифференцировка нервной трубки

ФОРМИРОВАНИЕ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА. Разные участки нервной трубки дифференцируются в разные отделы центральной нервной системы одновременно тремя различными путями. На анатомическом уровне в нервной трубке возникают расширения и сужения, а ее полости образуют камеры головного и спинного мозга. На гистологическом (тканевом) уровне клеточные популяции в стенке нервной трубки перераспределяются разными способами, формируя разные функциональные отделы головного и спинного мозга. И наконец, на цитологическом (клеточном) уровне сами клетки нейрального эпителия дифференцируются с образованием многочисленных типов нейронов и опорных (глиальных) клеток. Ранние стадии развития головного мозга у большинства позвоночных очень сходны, но, поскольку головной мозг человека представляется наиболее интересным органом в животном царстве, мы сосредоточим внимание на развитии того, что, как предполагают, делает человека — *Homo* — человеком разумным — *Homo sapiens*.

У раннего зародыша млекопитающих нервная трубка на всем ее протяжении прямая. Однако даже раньше, чем сформируется задний участок трубки, самая передняя ее часть претерпевает чрезвычайно резкие изменения. Она раздувается, подразделяясь на три первичных мозговых пузыря (рис. 5.10): **первичный передний мозг** (prosencephalon), **средний мозг** (mesencephalon) и **первичный задний мозг** (rhombencephalon). К тому времени, когда замкнется задний конец нервной трубки, по бокам развивающегося переднего мозга образуются вторичные расширения — **глазные пузыри**. Кроме того, будущий головной мозг изгибается таким образом, что места изгиба отмечают границы полостей мозга. Два основных изгиба называются головным и затылочным (шейным).

Первичный передний мозг затем подразделяется на передний **конечный мозг** (telencephalon) и расположенный каудальнее его **промежуточный мозг** (diencephalon) (рис. 5.11). Конечный мозг впоследствии формирует **большие полушария** головного мозга, промежуточный — таламическую и гипоталамическую области, а также область, получающую нервные импульсы от глаз; средний мозг на отделы не подразделяется, а его полость в конце концов становится третьим желудочком, или сильвиевым водопроводом. Первичный задний мозг подразделяется на **будущий продолговатый мозг** (myelencephalon) и лежащий впереди него **собственно задний мозг** (metencephalon). Myelencephalon в конечном счете становится **продолговатым мозгом** (medulla oblongata),



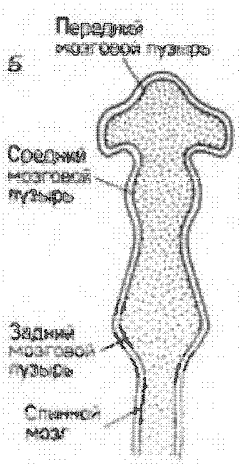


Рис. 5.10. Ранняя стадия развития головного мозга (четырехнедельный зародыш человека). *А* Вид сбоку. *Б* Схематическое изображение головного мозга, распрямленного в медианной плоскости, показывающее образование первичных мозговых пузырей в нервной трубке. (По Langman, 1969.)

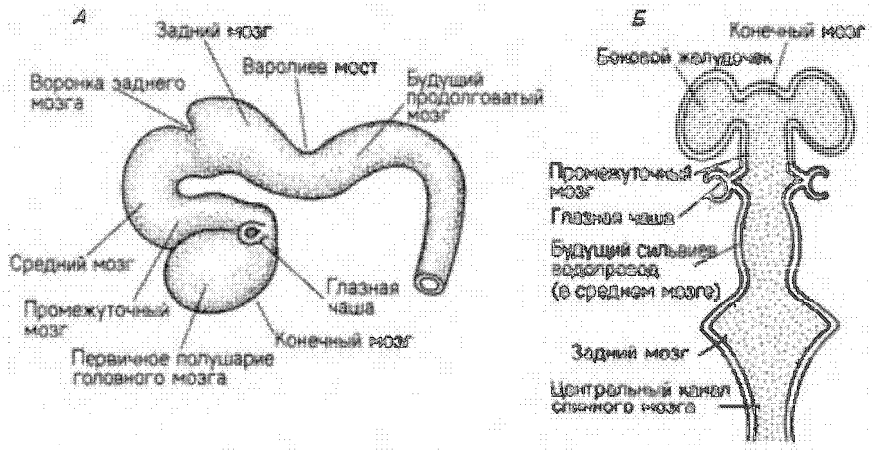


Рис. 5.11. Дальнейшее развитие головного мозга. Мозг шестинедельного зародыша человека. *А*. Вид сбоку. *Б*. Схематическое изображение головного мозга, распрямленного в медианной плоскости; видно образование вторичных мозговых пузырей в нервной трубке. (По Langman, 1969.)

нейроны которого формируют нервы, регулирующие деятельность дыхательной, желудочно-кишечной и сердечно-сосудистой систем. А задний мозг формирует мозжечок (cerebellum) — отдел мозга, ответственный за координацию движений, поддержание позы и чувство равновесия. Развитие специализированных отделов головного мозга суммировано на рис. 5.12.

Процесс образования мозговых пузырей у раннего зародыша характеризуется чрезвычайно высокой скоростью и, кроме того, тем, что эти огромные вздутия образуются в основном за счет увеличения размеров полостей, а не за счет утолщения их стенок. У куриного зародыша объем головного мозга между третьими и пятыми сутками развития увеличивается в 30 раз. Полагают, что такое быстрое увеличение

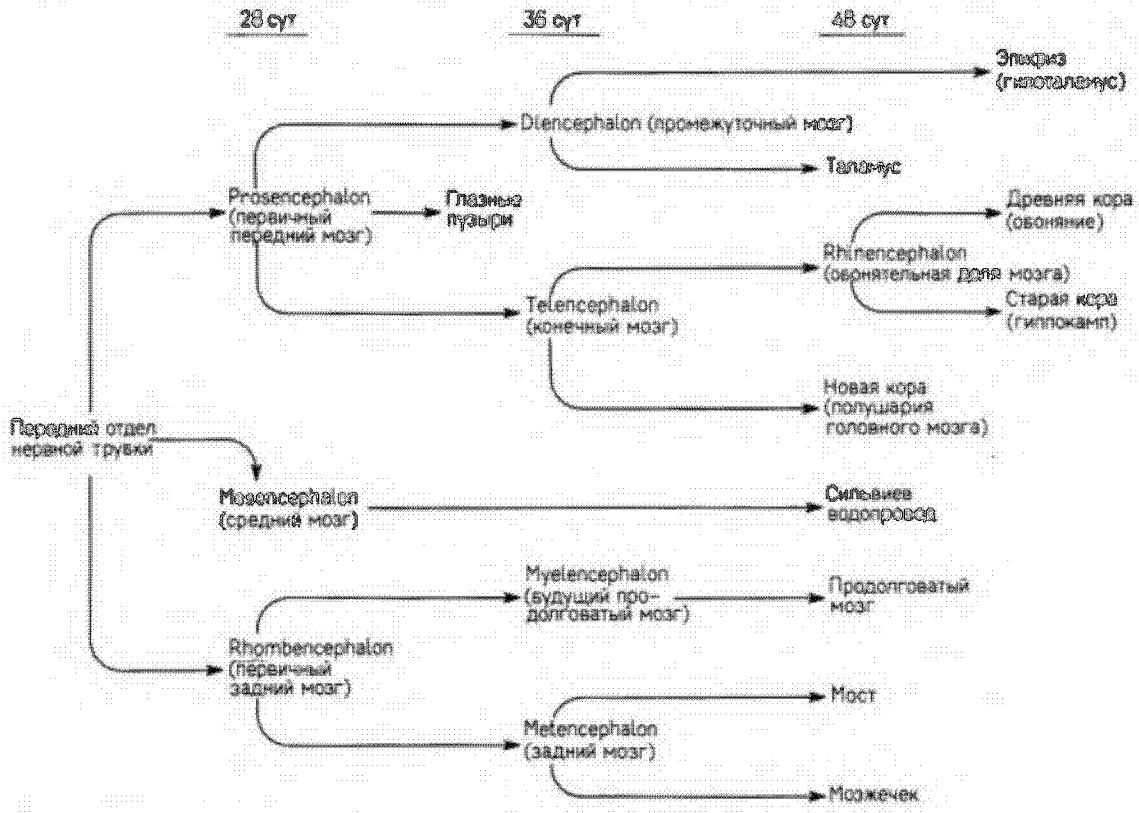


Рис. 5.12. Регвональная специализация в период раннего развития головного мозга человека.

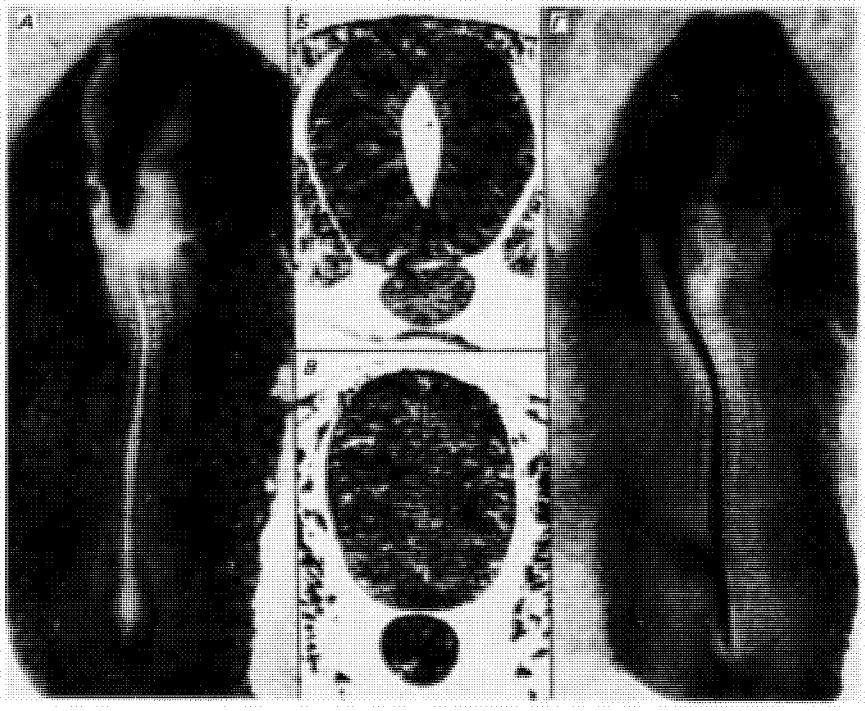


Рис. 5.13. Перегораживание участка нервной трубки, делающее возможным дальнейшее расширение области будущего головного мозга. *А*. Краситель, инъецированный в передний участок нервной трубки трехдневного куриного зародыша, заполняет полость головного мозга, но не поступает в спинной мозг. *Б*, *В*. Разрезы через нервную трубку куриного зародыша на уровне основания головного мозга: *Б* — до образования перегородки; *В* — во время перегораживания нервной трубки. *Г*. Исчезновение перегородки в нервной трубке после первоначального увеличения объема головного мозга позволяет красителю проникнуть в полость спинного мозга. (Фотографии с любезного разрешения M. Desmond.)

размеров вызвано давлением на стенки нервной трубки заключенной в ней жидкостью. Давление этой жидкости по логике вещей должно было бы уменьшаться в результате ее проникновения в полость спинного мозга, однако этого не происходит. Несколькими авторами (Schoenwolf, Desmond, 1984; Desmond, Shoenwolf, 1986) было показано, что в нервной трубке куриного зародыша до замыкания заднего нейропора возникает сужение, отделяющее будущий головной мозг от спинного (рис. 5.13). (Такая же преграда образуется и у зародыша человека: Desmond, 1982.) Если у куриного зародыша снять давление жидкости в передней части такой перегороженной нервной трубки, то скорость увеличения объема головного мозга значительно снижается и он будет содержать гораздо меньше клеток, чем головной мозг интактных контрольных зародышей. В норме после первоначального быстрого увеличения объемов желудочков (полостей) головного мозга перегороженный участок нервной трубки снова открывается.

АРХИТЕКТОНИКА ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ НА ТКАНЕВОМ УРОВНЕ. Исходно нервная трубка образована слоем герминативного нейрального эпителия толщиной в одну клетку. Этот слой представляет собой быстро делящуюся клеточную популяцию. Сауэр (Sauer, 1935) и другие исследователи показали, что клетки этой популяции располагаются в один слой; каждая клетка простирается от края, обращенного к просвету нервной трубки, до ее наружного края. Однако ядра клеток находятся на разных уровнях, и потому создается впечатление, что стенка нервной трубки многослойна. Такое положение ядер зависит от стадии клеточного цикла (рис. 5.14). Синтез ДНК (S-фаза) происходит тогда, когда ядро клетки располагается у ее наружного конца; по мере приближения к фазе митоза оно мигрирует по направлению к просвету трубки. Митоз осуществляется вблизи того конца клетки, который обращен к просвету нервной трубки. В период раннего развития 100% клеток нервной трубки включают радиоактивный тимидин в ДНК (Fujita, 1964). Однако вскоре некоторые клетки перестают включать предшественники ДНК, показывая тем самым, что они более не участвуют в синтезе ДНК и в митозе. Эти клетки представляют собой молодые нейроны или глиальные (опорные) клетки; они мигрируют к периферии нервной трубки, где происходит их дальнейшая дифференцировка (Fujita, 1966; Jacobson, 1968). Она зависит от положения, которые займут эти нейробласты, оказавшись вне области делящихся клеток (Jacobson, 1978; Letourneau, 1977).

В то время как клетки, лежащие у просвета нервной трубки, продолжают делиться, мигрирующие клетки образуют второй слой вокруг исходного слоя клеток нервной трубки. Этот второй слой постепенно утолщается по мере того, как все большее число клеток добавляется к нему из герминативного нейрального эпителия; этот слой называют плащевым (рис. 5.15, *А*), а герминативный эпителий теперь но-

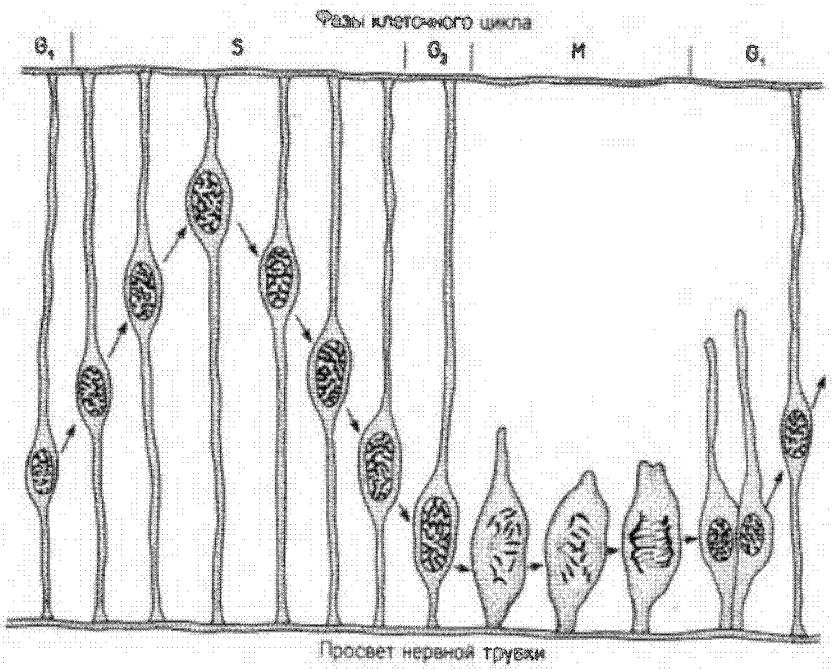


Рис. 5.14. Нейроэпителиальная клетка нервной трубки куриного зародыша. Схематическое изображение фронтального среза, на котором показана связь между положением ядра в нейроэпителиальной клетке и фазой клеточного цикла. Митотические ядра обнаруживаются у внутренней поверхности нервной трубки, обращенной к ее просвету. (По Sauer, 1935.)

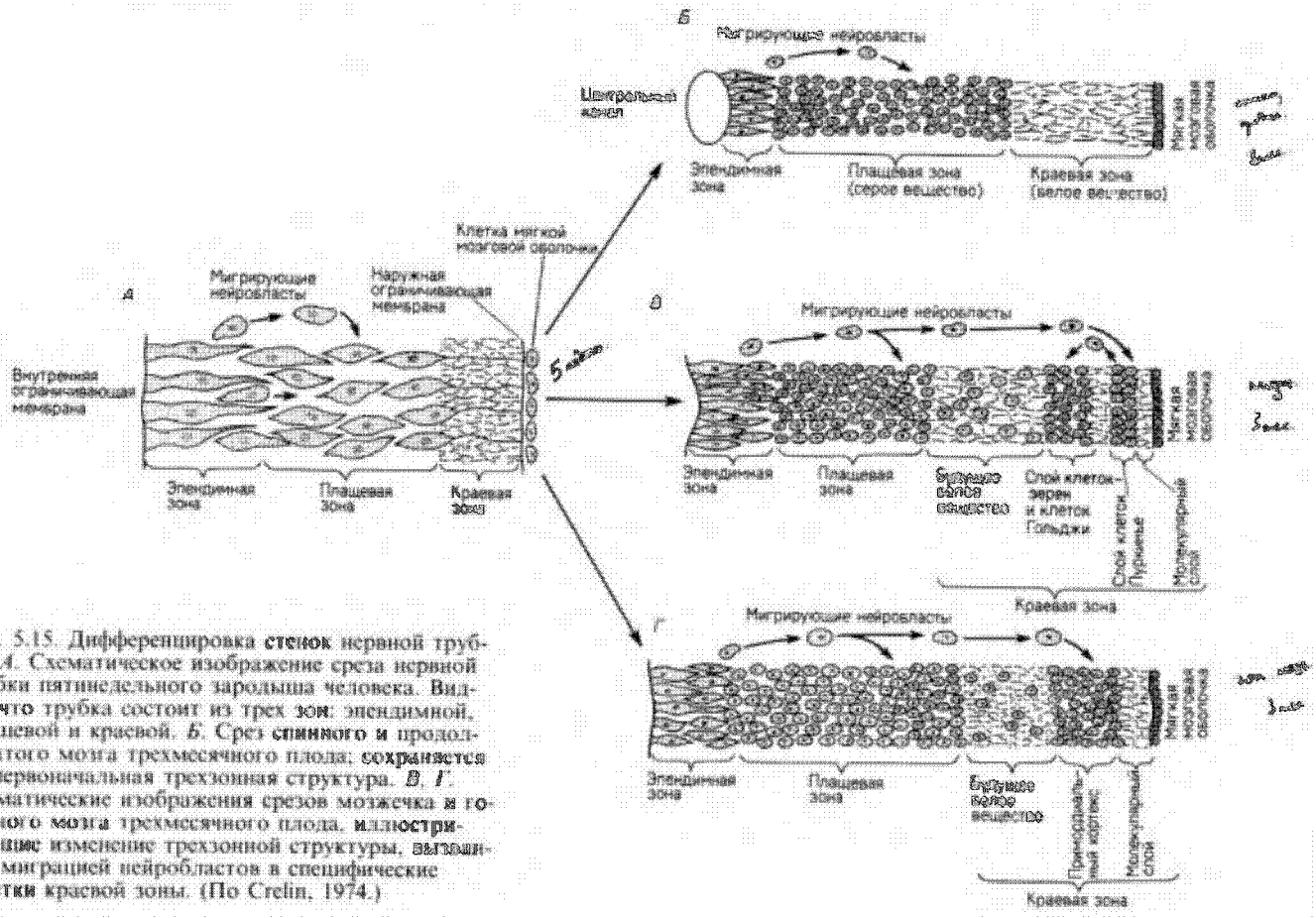


Рис. 5.15. Дифференцировка стенок нервной трубки. *А*. Схематическое изображение среза нервной трубки пятинедельного зародыша человека. Видно, что трубка состоит из трех зон: эпендимной, плащевой и краевой. *Б*. Срез спинного и продолговатого мозга трехмесячного плода; сохраняется их первоначальная трехзонная структура. *В*, *Г*. Схематические изображения срезов мозжечка и головного мозга трехмесячного плода, иллюстрирующие изменение трехзонной структуры, вызванное миграцией нейробластов в специфические участки краевой зоны. (По Crelin, 1974.)

сит название эпендимного слоя. Дифференцировка клеток плащевого слоя приводит к образованию как нейронов, так и глиальных клеток. Нейроны устанавливают между собой связи и посылают в направлении от просвета аксоны, образуя вблизи него бедный клетками краевой слой. В конце концов глиальные клетки заключают аксоны этого слоя в миелиновые футляры, придающие им беловатую окраску. Поэтому плащевой слой, содержащий тела нейронов, часто называют серым веществом, а содержащий их аксоны краевой слой — белым веществом.

В спинном и продолговатом мозге основная трехкомпонентная структура — эпендимный, плащевой и краевой слои — сохраняется в течение всего развития. Серое вещество (плащ, или мантия) постепенно принимает форму бабочки, окруженной белым веществом, и оба они заключены в соединительнотканный чехол. По мере дифференцировки нервной трубки в ней образуется продольная борозда (sulcus limitans), делящая ее на дорсальную и вентральную половины. Дорсальная половина получает информацию от чувствительных (сенсорных) нейронов, вентральная участвует в осуществлении различных двигательных (моторных) функций.

В головном мозге, однако, миграция клеток, дифференциальный рост и селективная гибель клеток вызывают модификацию трехзонной структуры, особенно в мозжечке (рис. 5.15, *Б*—*Г*). В глубоких слоях мозжечка вблизи просвета из нейробластов формируются скопления нейронов, называемые ядрами. Каждое ядро работает как функциональная единица, служащая промежуточной ретрансляционной станцией между наружными частями мозжечка и другими частями мозга. Другие нейробласты серого вещества мигрируют по наружной поверхности развивающегося мозжечка, образуя новый герминативный слой вблизи наружной границы нервной трубки. Нейробласты, происходящие из клеток этого слоя, мигрируют обратно в развивающееся белое вещество мозжечка, в котором формируют зернистый слой. Из исходного эпендимного слоя возникают разнообразные нейроны и глиальные клетки, включая отличающиеся от других нейронов крупные клетки Пуркинье. Каждый нейрон Пуркинье имеет огромный дендритный аппарат, который подобен опахалу над луковицеобразным телом клетки (рис. 5.16, *А*). Типичная клетка Пуркинье может образовывать до 100 000 синапсов с другими нейронами — больше, чем любой другой из изученных нейронов. У каждого нейрона Пуркинье имеется тонкий аксон, соединяющий его с другими клетками в глубоких ядрах мозжечка.

Таким образом, развитие пространственной организации мозжечка является решающим условием его правильного функционирования. В сущности все импульсы регулируют активность клеток Пуркинье, которые представляют собой единственные эфферентные нейроны коры мозжечка. Для осуществления такой регуляции необходимо, чтобы дифференцировка соответствующих клеток происходила в надлежащем месте и была координированной во времени.

Пониманию механизмов, обусловливающих упорядоченность расположения нейронов мозжечка в пространстве, способствовал анализ неврологических мутаций у мышей. Известно свыше 30 мутаций, влияющих на распределение этих нейронов. Мутация *staggerer*, по-видимому, вызвана дефектами клеток Пуркинье, которые у мутантов мельче, чем у нормальных мышей, и имеют короткие слабовствящиеся дендриты (рис. 5.16, *Б*). Клетки зернистого слоя у мутантов образуются своевременно и мигрируют нормально, но затем погибают. По мнению некоторых авторов (Sidman, 1974; Sotelo, Changeaux, 1974), эти клетки погибают потому, что им не удается установить связь с дендритами клеток Пуркинье. Мыши с дефектами клеток Пуркинье меньше по размерам, для них характерна своеобразная шатающаяся походка, и они непрерывно дрожат.

Многие мутации, обусловливающие дефекты клеток мозжечка, были обнаружены по легкораспознаваемому фенотипу таких мутантов. У них всегда бывает нарушено чувство равновесия и затруднены движения. Фенотип мутантов weaver (качание) схо-

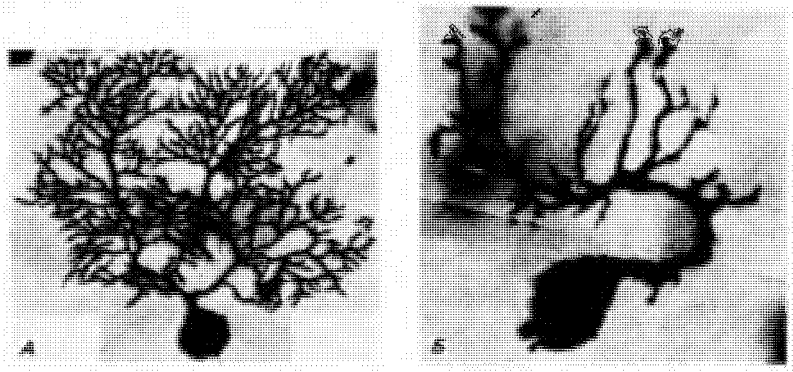


Рис. 5.16. Нейроны Пуркинье. *А*. Нейрон Пуркинье у нормальной мыши. *Б*. Недоразвитый нейрон у мыши, несущей мутацию *staggerer* (шатающаяся походка). У этого мутанта нарушена функция мозжечка, что приводит к характерному изменению походки. (Из Berry et al., 1980; фотографии с любезного разрешения M. Berry.)

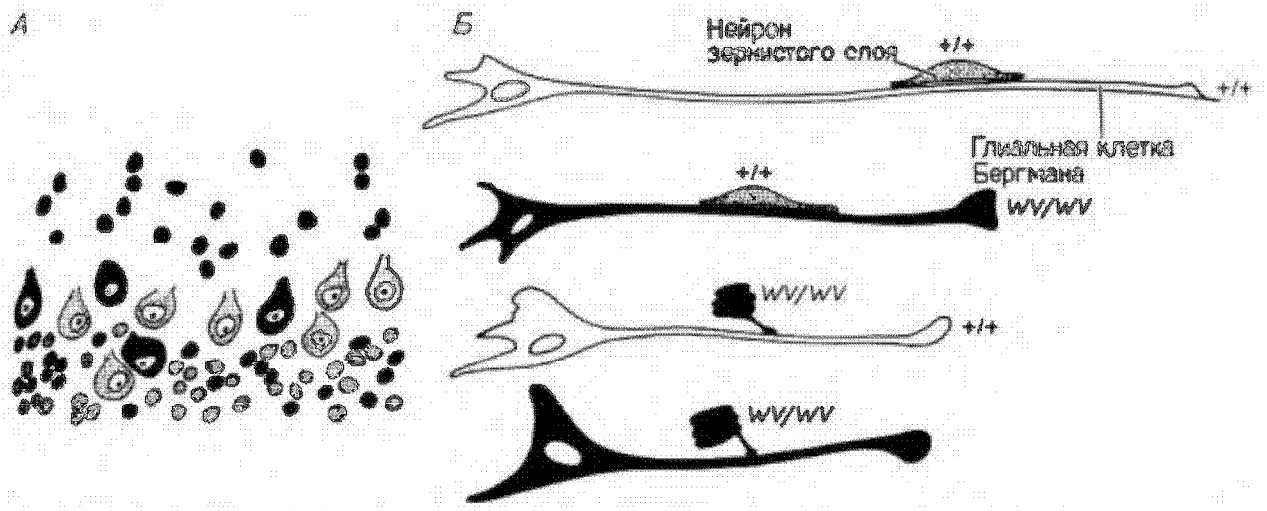


Рис. 5.17. Отсутствие миграции клеток-зерен (нейронов зернистого слоя) в мозжечке у мутанта *weaver* (качающаяся походка). *А*. Схематическое изображение нейронов у химерных мышей, получившихся в результате слияния клеток зародышей мышей дикого типа (+/+) и гетерозиготных по мутации *weaver* (*wv/wv*). Клетки, взятые от зародышей дикого типа, не закрашены; клетки от мутантных зародышей — черные. Почти все клетки зернистого слоя в аномальном положении происходят от клеток мутантных зародышей. *Б*. Комбинирование в разных сочетаниях культивируемых вместе клеток зародышей дикого типа и мутантов. Клетки-зерна дикого типа образуют плотные контакты с глиальными клетками любого типа, тогда как клетки-зерна мутантных зародышей не образуют таких контактов ни с одним из этих двух типов глиальных клеток. (*А* — по Goldowitz, Mullen, 1982; *Б* — по Hatten et al., 1986.)

ден с фенотипическим проявлением мутации *staggerer*, строение клеток Пуркинье у них также аномально. Однако у мышей weaver остановка роста клеток Пуркинье представляет собой вторичное явление — она обусловлена, по-видимому, генетическим дефектом клеток зернистого слоя. Это было доказано в опытах «конструирования» химерных мышей из зародышей дикого типа и мутантов weaver (Goldowitz, Mullen, 1982). У химерных мышей клетки дикого типа можно обнаружить в мозжечке по низкому содержанию в них β-глюкуронидазы (выявляемой гистохимическим методом) и по иной форме ядер. У мутантов меньше клеток Пуркинье, чем у мышей дикого типа, и локализация этих клеток в коре мозжечка аномальна. У химерных зародышей некоторые из нейронов Пуркинье также располагались не там, где они должны были находиться. Эти эктопические нейроны представляли собой клетки как того, так и другого генотипа. Однако все клетки зернистого слоя у мышей дикого типа находились там, где им положено, тогда как у мутантных зародышей эти клетки были случайно распределены по коре мозжечка (рис. 5.17, *А*). Таким образом, дефект у мышей weaver заключается, по-видимому, в отсутствии у клеток зернистого слоя способности мигрировать из наружного герминативного слоя в ту область коры мозжечка, где они должны находиться.

В зернистый слой нейробласты обычно мигрируют, двигаясь по длинным отросткам глиальных клеток Бергмана (Rakić, Sidman, 1973). Хаттеном и его коллегами (Hatten et al., 1986) было показано, что у мутантов weaver нейробласты неспособны узнавать клетки Бергмана как субстрат, по которому они должны мигрировать. В опытах этих исследователей в разных сочетаниях соединяли клетки зернистого слоя и клетки глии нормальных и мутантных зародышей (рис. 5.17, *Б*). Клетки от мышей дикого типа прочно слипались с глией зародышей обоих генотипов (как это обычно и бывает, когда клетки мигрируют). Однако у мутантных зародышей они не приближались ни к глиальным клеткам зародышей дикого типа, ни к глиальным клеткам зародышей weaver. Эти данные убедительно подтверждают предположение, что генетический эффект мутации *weaver* заключается в неспособности будущих клеток зернистого слоя узнавать клетки Бергмана и мигрировать по их поверхности.

Трехслойная структура мозга в полушариях также претерпевает существенные изменения. Некоторые нейробласты из плащевого слоя мигрируют через белое вещество и образуют вторую зону нейронов, называемую новой корой (неопаллиумом, или неокортексом). Эта новая кора мозга затем подразделяется на шесть слоев, содержащих тела нейронов. Дифференцировка этих слоев продолжается после рождения ребенка в течение первой половины детства.

Дополнительные сведения и гипотезы

Эволюция развития головного мозга

Эволюция коры головного мозга — один из наиболее интересных разделов анатомии позвоночных. Доли мозга возникают как парные выросты переднего мозга. У рыб, например, они первоначально функционируют как органы обоняния. У амфибий и рептилий древнюю кору (палеопаллиум) головного мозга покрывают старая кора (архипаллиум) и полосатое тело (corpus striatum) (рис. 5.18). Архипаллиум, по-видимому, связан с «эмоциональными» типами поведения, тогда как палеопаллиум и полосатое тело имеют отношение к автоматическим «инстинктивным» реакциям. У птиц полосатое тело развито очень хорошо. У более высокоорганизованных рептилий появляются первые нейроны, связанные с новой корой (неопаллиумом, или неокортексом). Эволюция мозга млекопитающих, и особенно человека, характеризуется необычайно интенсивным ростом и распространением новой коры, оттесняющей внутрь архипаллиум, который формирует гиппокамп (ответственный за сексуальное и агрессивное поведение). Мозолистое тело функционирует как реле для переключения некоторых непроизвольных реакций. Неокортекс становится центром обучения, памяти и интеллекта. У птиц нет новой коры, и у видов, способных к обучению, его функцию выполняет гиперстриатум (Romer, 1976).

Развитие новой коры у человека занимает чрезвычайно большой период времени. Фактически у ребенка после его рождения мозг продолжает развиваться с такой же скоростью, как у плода (Holt et al., 1975). Портманн (Portmann, 1941, 1945) полагает, что по сравнению с другими приматами у человека очень короткий период беременности. Сравнивая развитие плода у человека и других приматов, он определил, что беременность у женщины должна была бы продолжаться 21 мес. Портманн и Гоулд (Gould, 1977) считали, что именно такова и есть продолжительность беременности у человека, поскольку все мы в течение первого года жизни являемся в сущности внематочными плодами.

Это утверждение основывается на том, что и после рождения мозг ребенка продолжает расти чудовищно быстрым темпом, характерным для плода. Ни одна женщина не могла бы родить 21-месячного младенца, потому что его голова не могла бы пройти через родовые пути. Роды должны состояться в то время, когда голова у младенца еще достаточно мала, чтобы пройти через материнский таз. Поэтому человеческие детеныши рождаются в конце девятого, а не двадцать первого месяца беременности. Кроме того, именно в течение этого времени мы впервые подвергаемся влиянию окружающего мира. Наша развивающаяся нервная система получает существенный выигрыш от воздействия на нее столь сильной стимуляции в течение первого года жизни ребенка.

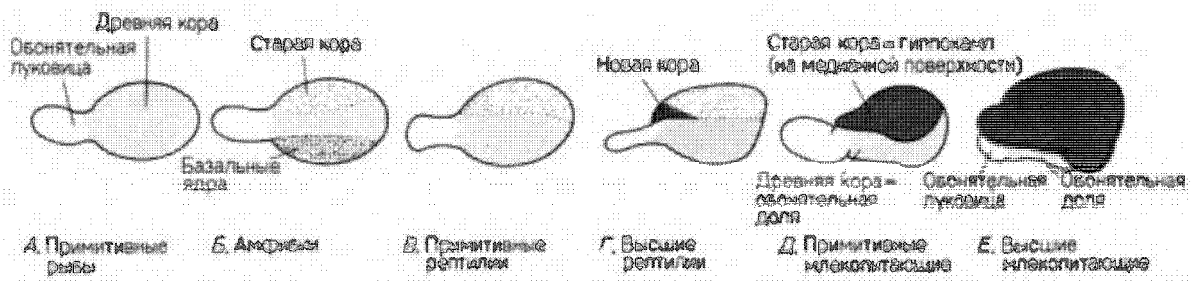


Рис. 5.18. Схематические рисунки головного мозга позвоночных животных, иллюстрирующие прогрессивную дифференцировку коры мозга в процессе эволюции. *А.* У наиболее примитивных форм имеется древняя кора (палеопаллиум), предназначенная только для обоняния (восприятия запахов). У амфибий (*Б*) дорсальная и вентральная части головного мозга дифференцируются соответственно на старую кору — архипаллиум (гиппокамп) — и базальные ядра, или подкорковые ганглии (полосатое тело). У примитивных рептилий (*В*) базальные ядра располагаются глубже в головном мозге, а у вышестоящих рептилий (*Г*) в коре появляется новая группа нейронов — новая кора, или неопаллиум. У млекопитающих (*Д, Е*) распространяющиеся нейроны новой коры больших полушарий головного мозга оттесняют старую кору, постепенно в процессе эволюции становясь преобладающими в коре головного мозга. (По Romer, 1976.)

ТИПЫ НЕЙРОНОВ. В головном мозге человека содержится более 100 миллиардов нервных клеток (нейронов), связанных с более чем триллионом вспомогательных глиальных клеток. Клетки, остающиеся неотъемлемыми компонентами выстилки нервной трубки, становятся **эпендимными клетками**. Из них могут образоваться как предшественники нейронов, так и глиальные клетки (рис. 5.19). Полагают, что дифференцировка этих клеток-предшественников в значительной степени детерминируется окружением, в которое они попадают (Rakic, Goldman, 1982), и что по крайней мере в некоторых случаях данная клетка-предшественник может формировать как нейроны, так и глиальные клетки (Turner, Cepko, 1987). Типы нейронов и глиальных клеток чрезвычайно разнообразны (это можно видеть из сравнения относительно мелкой клетки зернистого слоя и огромного нейрона Пуркинье). У некоторых нейронов образуется лишь небольшое число цитоплазматических участков, в которых другие клетки могут передавать им электрические импульсы, тогда как другие нейроны формируют обширные области, доступные для этой цели. Тонкие отростки нервных клеток, служащие для восприятия электрических импульсов, называются **дендритами** (рис. 5.20). Нейроны коры головного мозга новорожденного имеют очень мало дендритов, и одним из самых важных событий первого года его жизни является увеличение числа таких рецепторных участков в этих нейронах. В течение первого года жизни ребенка у каждого нейрона в коре головного мозга образуется поверхность дендритов, достаточная для размещения на ней 100 000 связей с другими нейронами. В среднем один нейрон коры головного мозга соединяется с 10 000 других нервных клеток. Этот характер нервных связей делает возможным функционирование коры головного мозга как центра обучения, мышления и памяти, развития способностей к обобщениям и к произвольным ответам на воспринимаемые и расшифрованные ею стимулы.

Другой важной структурой развивающегося нейрона является **аксон**. Если дендриты часто очень многочисленны и не распространяются далеко от тела нервной клетки (или сомы), то аксоны простираются на несколько футов (1 фут = 30,5 см). Так, частоту сердечных сокращений регулируют нервы, клеточные тела которых находятся в продолговатом мозге. Болевые рецепторы большого пальца ноги воспринимают импульсы, которые должны пройти долгий путь до спинного мозга. Одна из фундаментальных концепций нейробиологии заключается в том, что аксон представляет собой непрерывное продолжение тела нервной клетки. Еще в конце прошлого столетия существовали многочисленные конкурирующие теории образования аксона. Шванн, один из основоположников клеточной теории, считал, что многочисленные нервные клетки соединяются между собой в цепочку, формируя аксон. Гензен, открывший зародышевый узелок (названный впоследствии его именем), считал, что аксон формируется вокруг предсуществующих цитоплазматических тяжей между клетками. Вильгельм Гис (His, 1886) и Сантьяго Рамон-и-Кахал (Ramon y Cajal, 1890) утверждали, что аксон, безусловно, представляет собой вырост нервной сомы (хотя и чрезвычайно длинный).

Позже Гаррисон (Harrison, 1907) продемонстрировал справедливость теории выроста в изящном эксперименте, которым одновременно были заложены основы нейробиологии развития и метода культуры тканей. Гаррисон изолировал участок нервной трубки из зародыша лягушки длиной в три миллиметра. На этой стадии (вскоре после слияния нервных валиков) еще нет видимой дифференцировки аксонов. Он поместил нейробласты на покровное стекло в каплю лимфы лягушки и перевернул стекло над углублением в предметном стекле так, чтобы было возможно наблюдать за тем, что происходит в этой «висячей капле». И Гаррисон увидел (рис. 5.21), что аксоны образуются как выросты нейробластов, удлиняющиеся со скоростью примерно 56 мкм/ч.

Движение выроста осуществляется с помощью ведущего кончика аксона, называемого **конусом роста** (рис. 5.22). Конус роста движется не по прямой, он как бы нащупывает свой путь по субстрату. Движение конуса осуществляется посредством удлинения и сокращения заостренных филоподий, называемых **микрошипами**. Эти филоподии содержат микрофиламенты, ориентированные параллельно длинной оси аксона. (Микрофиламенты обусловливают процессы миграции клеток некоторых типов и всегда принимают участие в сократительной активности клеток.) Обработка нейронов цитохалазином В подавляет их дальнейшее продвижение (Yamada et al., 1971). В пределах самого аксона прочность его структуры обеспечивается микротрубочками: если нейробласт поместить в раствор колхицина, то аксон будет втягиваться в тело клетки (рис. 5.23). Таким образом, развивающийся нейрон сохраняет черты, уже обсуждавшиеся нами при изучении формирования нервной трубки, а именно удлинение клетки при участии микротрубочек и изменение формы ее апикального конца с помощью микрофиламентов. В наиболее активно мигрирующих клетках «исследующие» филоподии прикрепляются к субстрату и тянут за собой остальную часть клетки. Учитывая длину аксона, можно понять, что ему такую операцию проделать было бы трудно. Поэтому сократительный аппарат в филоподиях аксона является, по-видимому, только исследующим, а уд-

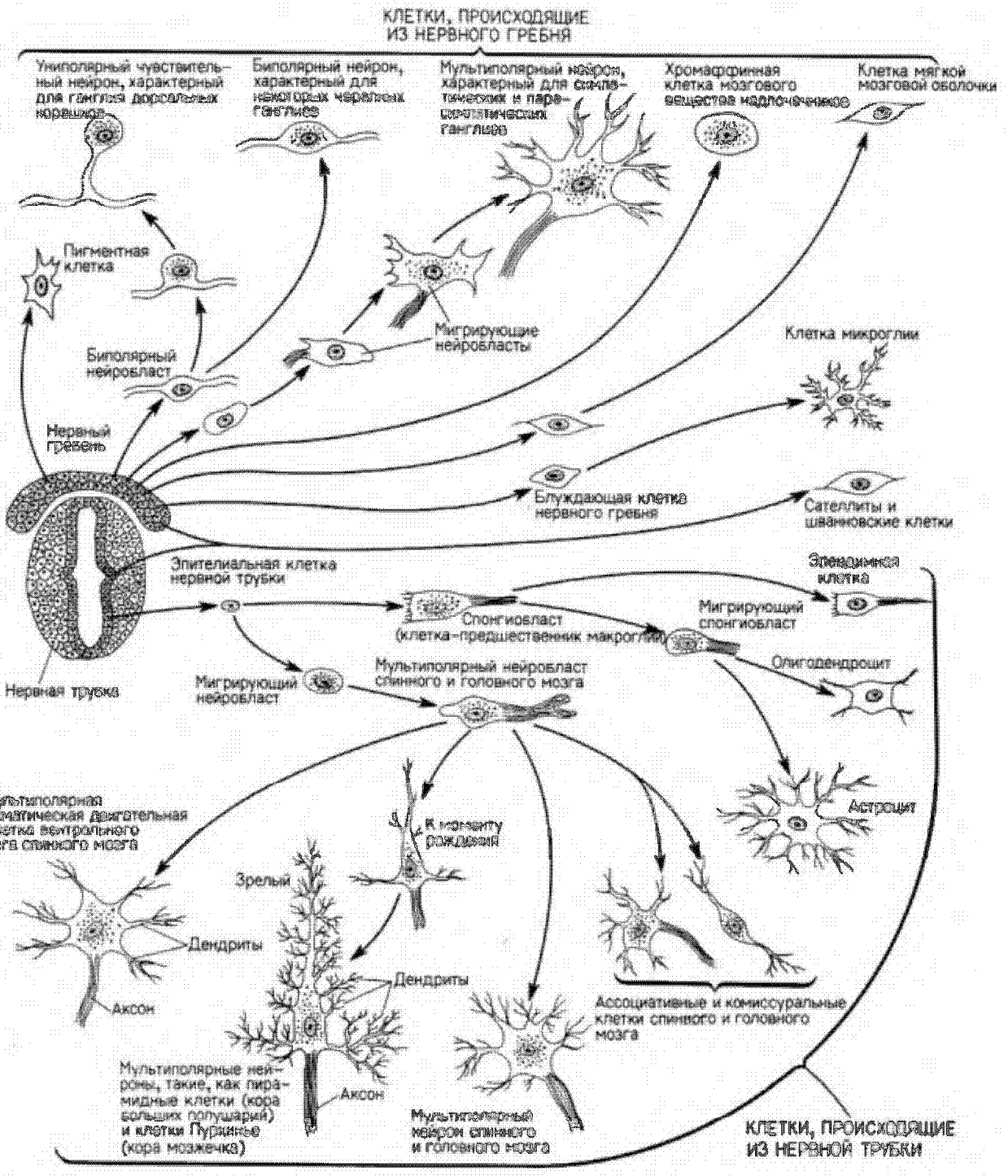


Рис. 5.19. Обобщенная схема, иллюстрирующая происхождение некоторых типов дифференцированных клеток нервной системы. (По Crelin, 1974.)

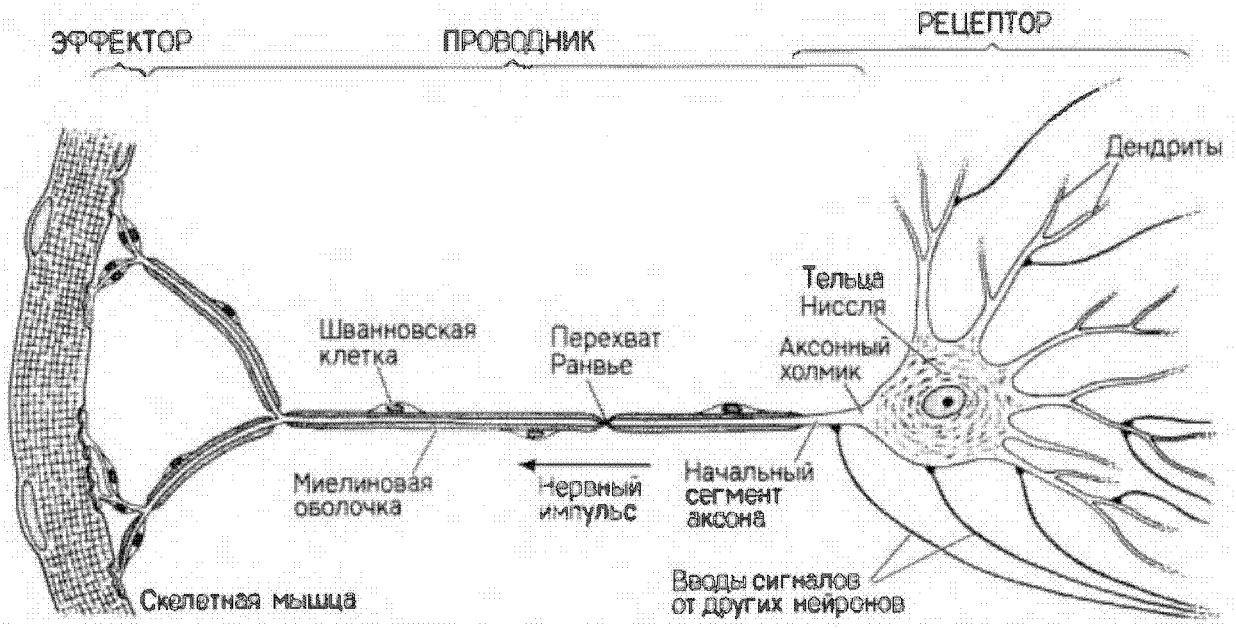


Рис. 5.20. Схематическое изображение двигательного (эфферентного) нейрона. Электрические импульсы, воспринимаемые дендритами и телом нервной клетки, передаются по аксону (который может достигать в длину до 1 м) к его ткани-мишени. Миелиновая оболочка, обеспечивающая изоляцию аксона, формируется прилежащими к нему шванновскими клетками. (По Bloom, Fawcett, 1975.)

Рис. 5.21. Рост нервного волокна в культуре. Растущий нейрон головастика зарисовывали по мере того, как он перемещался по отношению к неподвижной клетке (эритроциту). (Из Harrison, 1910.)

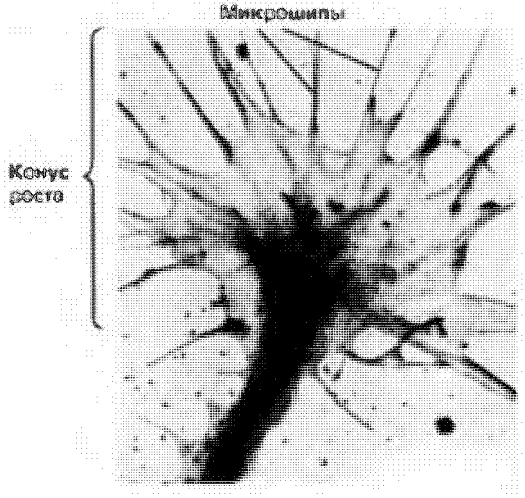


Рис. 5.22. Конус роста аксона. В области конуса роста видны микрошипы. Фотография получена с помощью просвечивающего электронного микроскопа. (Из Letourneau, 1979; фотография с любезного разрешения P. C. Letourneau.)

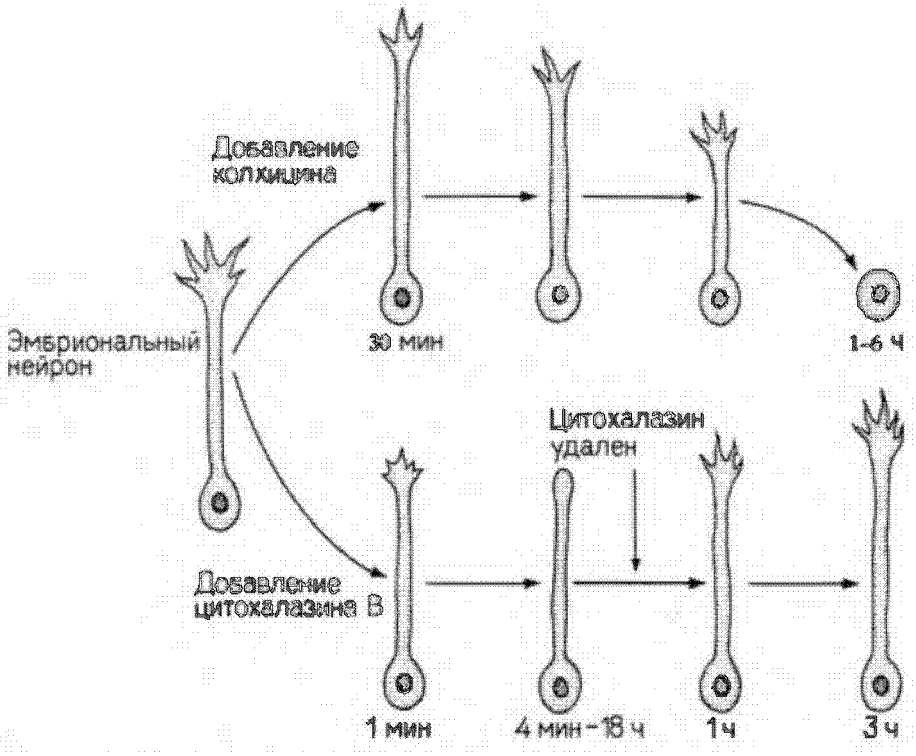


Рис. 5.23. Влияние цитохалазина В и колхицина на удлинение аксона у нейронов зародыша, культивируемых in vitro. Колхицин вызывает сокращение аксона — событие, связанное с разрушением микротрубочек. Цитохалазин В вызывает обратимую деполимеризацию микрофиламентов, что приводит к исчезновению микрошипов. Если цитохалазин удалить из среды, то конус роста появляется вновь.

линение аксона осуществляется при помощи перетекающей по нему цитоплазмы.

Нейроны передают электрические импульсы от одного участка к другому. Эти импульсы обычно проходят через дендриты в тело нейрона, где они фокусируются в аксоне. Чтобы предотвратить рассеяние электрического сигнала и облегчить его проведение, аксон в центральной нервной системе через определенные промежутки на всем его протяжении изолируется от других аксонов в нерве отростками глиальных клеток, называемых **олигодендроцитами**. Олигодендроцит как бы обвертывает собой развивающийся аксон. Затем он продуцирует специализированную клеточную оболочку, богатую основным белком миелином, которая окружает в виде спирали лежащий в ее центре аксон (рис. 5.24). Специализированная мембрана называется **миелиновой оболочкой**. (В периферической нервной системе миелинизацию аксонов осуществляют шванновские глиальные клетки.) Миелиновая оболочка имеет существенное значение для правильного функционирования нейрона; демиелинизация нервных волокон связана с некоторыми серьезными нарушениями умственной деятельности; иногда процесс демиелинизации приводит к летальному исходу.

Аксон должен быть также специализирован для секреции нейромедиаторов, способных проходить через небольшие пространства (синаптические щели), отделяющие аксон нервной клетки от поверхности его клетки-мишени (ее тела, дендритов, аксона, воспринимающего нейрона или рецепторов какого-либо периферического органа). Таким образом, развивающийся нейрон должен продуцировать специфические ферменты для синтеза и разрушения нейромедиаторов. Развитие нейрона означает не только структурную, но и молекулярную дифференцировку.

Развитие глаза

ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ ГЛАЗА. Индивидуум приобретает знания об окружающем его мире с помощью органов чувств. В этом разделе мы сосредоточим внимание на развитии глаза, потому что для него, вероятно, более, чем для какого-либо другого органа тела, необходимы точность и совершенство координации развития всех его компонентов.

Развитие органа зрения начинается в стенке будущего промежуточного мозга. У человека это происходит на 22-й день развития, когда в стенке нервной трубки образуются латеральные выпячивания, которые впоследствии станут промежуточным мозгом. Дифференциальный рост выпячиваний приводит к образованию **глазных пузырей**, связанных с промежуточным мозгом **глазными стебельками**. Позже глазные пузыри приходят в контакт с эктодермальным покровным эпителием зародыша и индуцируют образование в нем **хрусталиковых плакод** (рис.

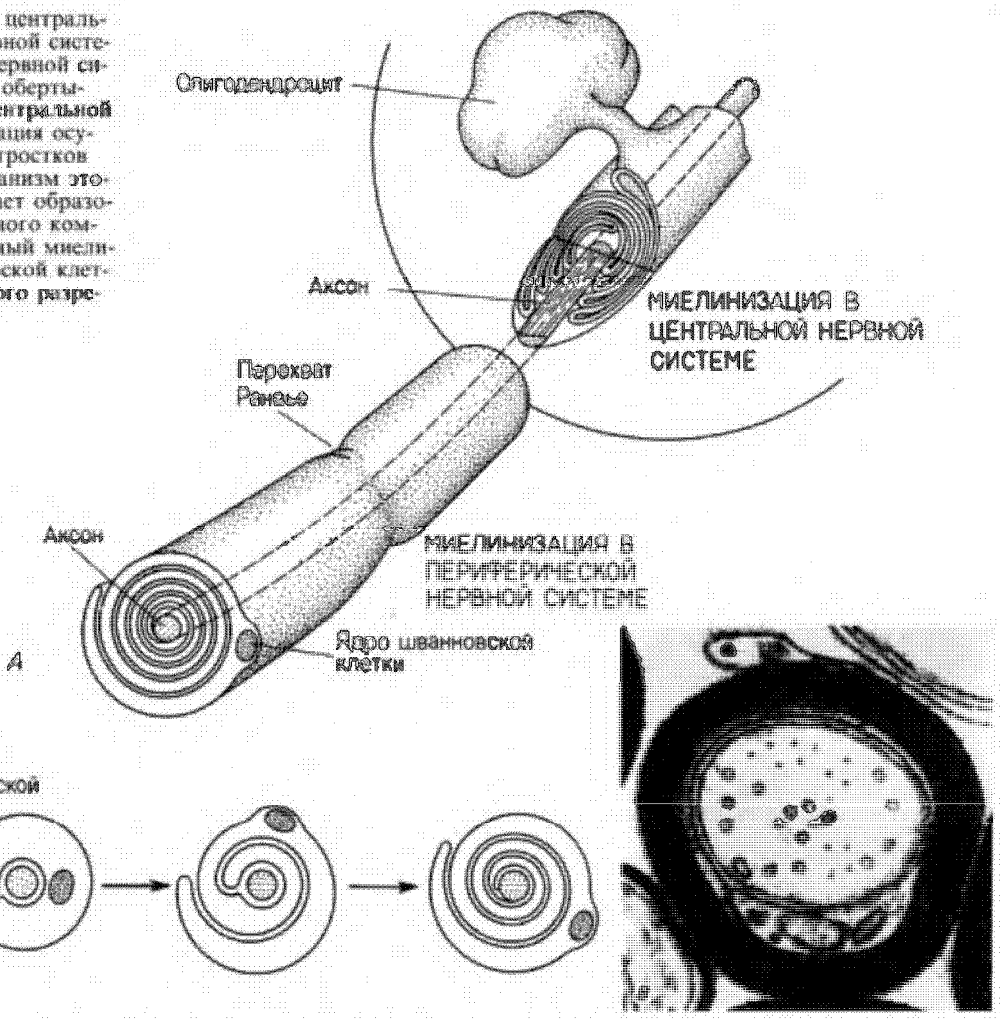


Рис. 5.24. Миелинизация в центральной и периферической нервной системе. *А.* В периферической нервной системе шванновские клетки обертываются вокруг аксона; в центральной нервной системе миелинизация осуществляется с помощью отростков олигодендроцитов. *Б.* Механизм этого обертывания обеспечивает образование огромного мембранного комплекса. *В.* Аксон, окруженный миелиновой мембраной шванновской клетки. (Фотография с любезного разрешения C. S. Raine.)

5.25)[1]. Эта индукция является специфической, поскольку изолированные глазные пузыри, имплантированные под эпителий любой области головы, будут вызывать в нем образование хрусталиковой ткани вместо эпидермальных клеток. В отсутствие контакта с глазным пузырем хрусталик не образуется. Необходимость тесного контакта между глазными пузырями и покровным эпителием подтверждается не только в экспериментах с трансплантацией глазных пузырей, но и нарушениями в развитии глаз у некоторых мутантов. Например, у мутантов мыши eyeless глазные пузыри не соприкасаются с покровным эпителием и формирование глаза прекращается (Webster et al., 1984).

Сформировавшись, хрусталиковая плакода в свою очередь вызывает изменения в глазном пузыре, передняя стенка которого инвагинирует и пузырь превращается в двустенную глазную чашу (рис. 5.26). По мере продолжения инвагинации глазной стебелек, соединяющий глазную чашу и головной мозг, сужается и связь между ними редуцируется до узкой щели. Одновременно с этим два слоя глазной чаши начинают дифференцироваться в разных направлениях. Клетки наружного слоя продуцируют пигмент и в конце концов образуют пигментированный слой, называемый пигментной сетчаткой. Число клеток внутреннего слоя быстро увеличивается, и эти клетки дают начало множеству светочувствительных (фоторецепторных) нейронов, глиальных клеток, промежуточных нейронов и ганглиозных клеток. Все эти клетки в совокупности составляют нейральную ретину, или сетчатку. Аксоны ганглиозных клеток нейральной сетчатки встречаются у основания глаза и далее проходят по глазному стебельку, который после этого начинают называть зрительным нервом.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА НЕЙРАЛЬНОЙ СЕТЧАТКИ

[1] Процессы индукции, участвующие в формировании глаза, подробно рассматриваются в гл. 8 и 16.

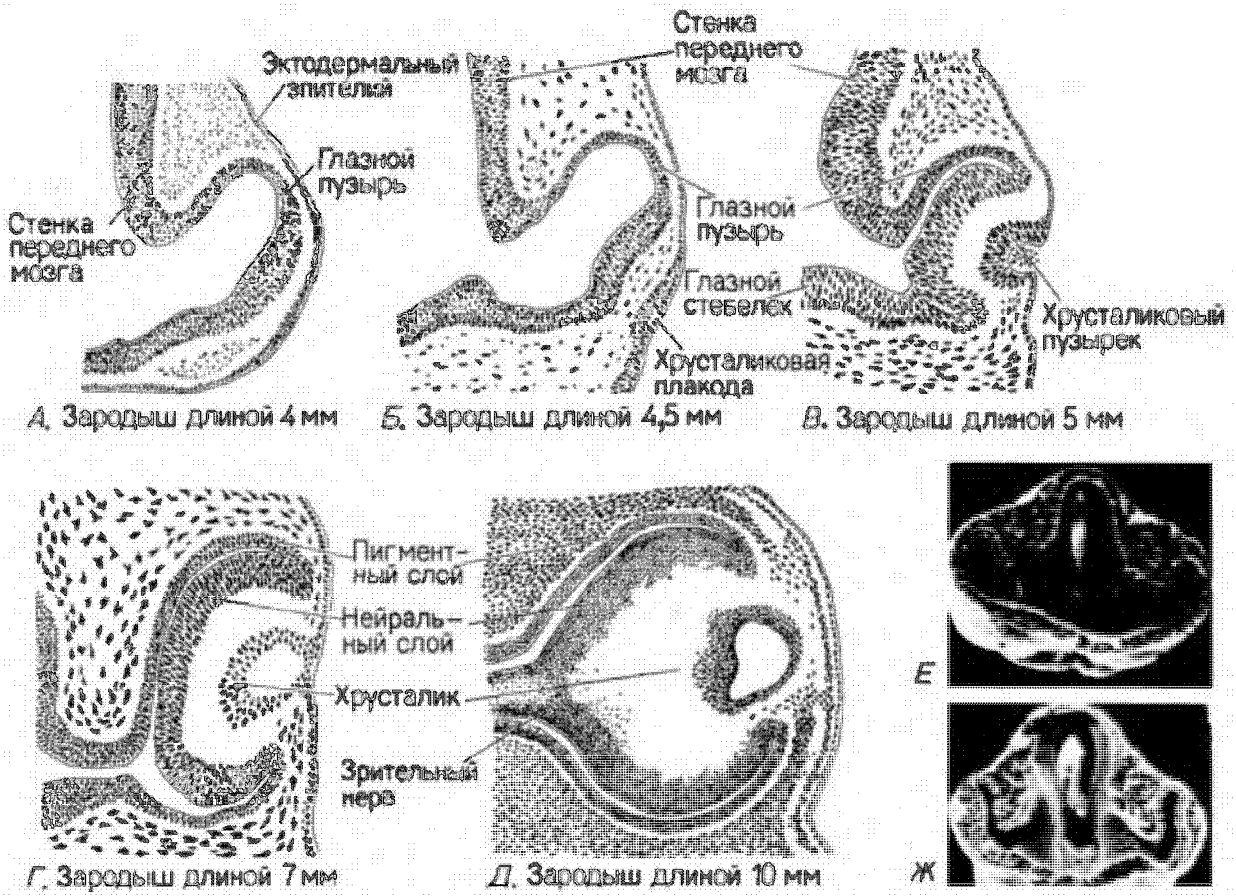


Рис. 5.25. Развитие глаза. *А*. Глазной пузырь выпячивается кнаружи от мозга и приходит в контакт с лежащим над ним эктодермальным эпителием. *Б, В*. Последний дифференцируется в клетки хрусталика; обращенная к нему стенка глазного пузыря впячивается внутрь. *Г*. Глазной пузырь превращается в нейральную сетчатку (ретину) и пигментную сетчатку (ретинальный пигментный эпителий), а хрусталик погружается внутрь глаза. *Д*. Хрусталик индуцирует образование роговицы в лежащем над ней эктодермальном эпителии, тогда как глазной стебелек превращается в зрительный нерв, передающий импульсы от глаза к мозгу. *Е, Ж*. Фотографии, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа, соответствуют стадиям *А* и *Б*. (*А—Д* — из Mann, 1964; *Е, Ж* — из Hilfer, Yang, 1980; фотографии с любезного разрешения S. R. Hilfer.)

Подобно тому как это происходит в коре головного мозга и мозжечка, в сетчатке по мере ее развития разные нейроны группируются в слои свето- и цветочувствительных фоторецепторных клеток, тел ганглиозных клеток и биполярных промежуточных нейронов, передающих электрические стимулы от палочек и колбочек к ганглиозным клеткам (рис. 5.27). В дополнение к ним имеются многочисленные глиальные клетки, поддерживающие целостность сетчатки, а также амакриновые и горизонтальные нейроны, которые передают электрические импульсы в горизонтальном направлении.

На ранних стадиях развития сетчатки образование ее слоев обусловлено делением клеток герминативного слоя, их миграцией и дифференциальной гибелью. Формирование этой сложно структурированной ткани представляет собой одну из наиболее интенсивно изучаемых проблем нейробиологии развития. Недавно было показано (Turner, Cepko, 1987), что любая единичная клетка-предшественник нейробласта может дать начало по меньшей мере трем типам нейронов или двум типам нейронов и одному типу глиальных клеток. Этот анализ был осуществлен с помощью очень хитроумного способа мечения клеток, происходящих из одной конкретной клетки-предшественника. Новорожденным крысятам (с еще развивающейся сетчаткой) в заднюю стенку глаза инъецировали вирус, который мог включаться в ДНК клеток глаза. Этот вирус содержал ген β-галактозидазы (отсутствующий в сетчатке глаза крысы), который должен был экспрессироваться в инфицированных клетках. Через месяц после введе-

Рис. 5.26. Образование глазной чаши и хрусталиковой плакоды у куриного зародыша. Фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Из Hilfer, Yang, 1980; фотография любезно предоставлена S. R. Hilfer.)

ния вируса сетчатку удаляли и окрашивали красителем, выявляющим присутствие β-галактозидазы. В синий цвет должны были окраситься только потомки инфицированных клеток. На рис. 5.28 показана одна из полос клеток, происшедших от инфицированной клетки-предшественника. Краситель виден в пяти палочках, биполярном нейроне и миллеровской глиальной клетке.

Из трех основных типов нейронов сетчатки (ганглиозные, биполярные и фоторецепторные) фоторецепторные палочки и колбочки, вероятно, завершают свою дифференцировку последними. По мере развития этих наружных нейронов тело каждого из них образует вырост, содержащий некоторые специализированные органеллы. Эти органеллы удлиняют вырост и определяют размер и форму фоторецептивных областей (Detwiler, 1932). Клеточные мембраны наружных нейронов складываются, образуя мешки, в которых размещаются фоторецептивные (зрительные) пигменты. Свет индуцирует химические изменения этих пигментов, приводящие в конечном счете к изменению мембранного потенциала. Изменение мембранного потенциала влияет на высвобождение нейромедиаторов из группы биполярных нейронов, которые переключают электрический сигнал на ганглиозные клетки. Аксоны этих клеток, соединяясь в пучки, образуют зрительный нерв, по которому полученная информация передается в головной мозг (Fesenko et al., 1985; Stryer, 1986).

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ХРУСТАЛИКА И РОГОВИЦЫ. Хрусталиковая плакода по мере своей дифференцировки в дефинитивный хрусталик округляется и приходит в контакт с вновь образованным над ней покровным эпителием (рис. 5.29). Затем хрусталиковая плакода индуцирует в нем образование прозрачной роговицы. Важную роль в развитии глаза играют физические факторы. Так, давление внутриглазной жидкости обеспечивает кривизну роговицы, необходимую для того, чтобы свет фокусировался точно на сетчатку. Значение внутриглазного давления можно продемонстрировать в эксперименте: если с помо-

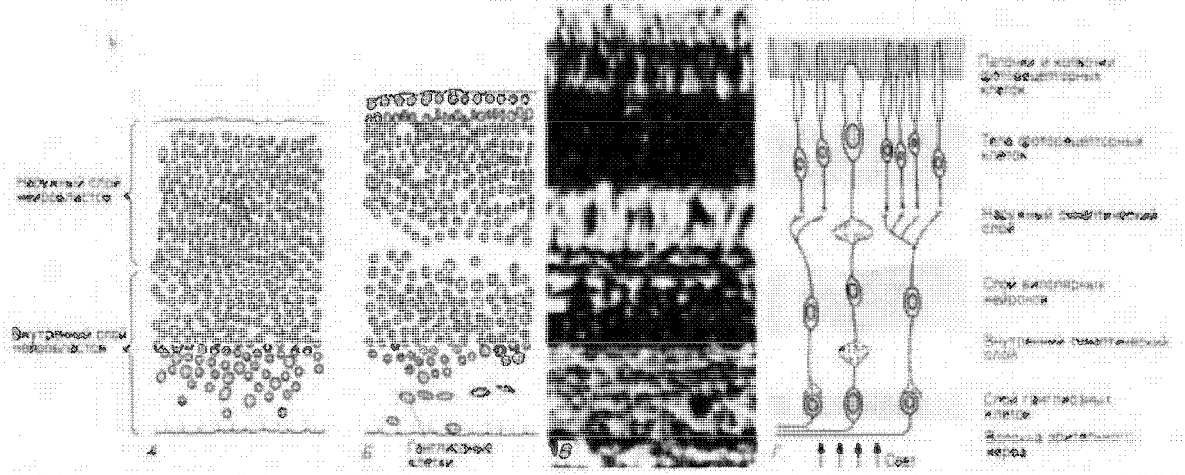


Рис. 5.27. Развитие сетчатки у человека. В процессе развития нейроны сетчатки распределяются по функциональным слоям. *А*, *Б*. Начальное разделение нейробластов в сетчатке. *В*. Три слоя нейронов в сетчатке глаза взрослого человека и синаптические слои между ними. *Г*. Схема главных функциональных связей между слоями сетчатки. Свет проходит через все слои, пока не улавливается фоторецепторами. Аксоны фоторецепторных клеток образуют синапсы с биполярными нейронами, которые передают деполяризованные сигналы ганглиозным нейронам. Аксоны ганглиозных клеток, объединяясь, образуют зрительный нерв, который входит в головной мозг. (*А*, *Б* — по Mann, 1964; фотография с любезного разрешения G. Grunwald.)

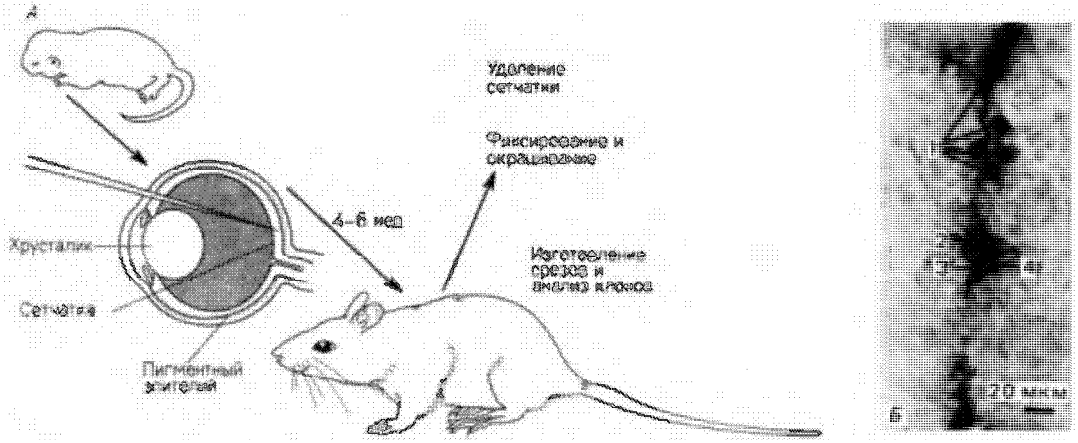


Рис. 5.28. Определение потомства единичной клетки-предшественника в сетчатке крысы. *А*. Методика, с помощью которой вирус, содержащий функциональный ген β-галактозидазы, инъецируют в заднюю стенку глаза с целью заражения некоторых клеток-предшественников сетчатки. Через месяц-полтора глаз удаляют и окрашивают сетчатку на присутствие β-галактозидазы. *Б*. Окрашенные клетки образуют в нейральной сетчатке полоску, состоящую из 5 палочек (*1*), биполярного нейрона (*4*), концевой палочки (*2*) и мюллеровской глиальной клетки (*3*). Идентичность этих клеток была подтверждена с помощью методики Номарски (с использованием фазово-контрастного микроскопа). (Из Turner, Cepko, 1987; фотография с любезного разрешения D. Turner.)

щью стеклянной микротрубочки из развивающегося глаза цыпленка эту жидкость удалить, то роговица не приобретает характерной для нее выпуклости (Coulombre, 1956, 1965). Внутриглазное давление поддерживается кольцом склеральных косточек (происходящих, вероятно, из клеток нервного гребня), которое оказывает неупругое сопротивление. В отсутствие склеральных косточек давление не сохраняется и роговица не приобретает правильной формы.

Хрусталик дифференцируется в прозрачное тело, способное направлять свет на сетчатку посредством изменений формы и структуры его клеток, а также синтеза в них специфичных для хрусталика белков, называемых кристаллинами. Эти белки синтезируются в период, когда происходят изменения формы клеток, обусловливающие превращение хрусталикового пузырька в дефинитивный хрусталик. Клетки внутренней части хрусталикового пузырька удлиняются и под влиянием сетчатки образуют хрусталиковые волокна (Piatigorsky, 1981). Растущие хрусталиковые волокна синтезируют кристаллины, которые в итоге заполняют всю клетку и выталкивают из нее ядро. Продолжая расти, волокна, синтезирующие кристаллины, в конце концов заполняют все пространство между двумя слоями хрусталикового пузырька. Клетки переднего слоя хрусталика представляют собой герминативный эпителий, в котором продолжаются митозы. Делящиеся клетки движутся к экватору и, проходя через область экватора, также начинают удлиняться (рис. 5.30). Таким образом, хрусталик состоит из трех отделов: передняя зона делящихся эпителиальных клеток, экваториальная зона удлиняющихся клеток и задняя зона вместе с центром хрусталика, содержащая волокнистые клетки, которые продуцируют кристаллин. Такая структура хрусталика сохраняется в течение всей жизни животного, поскольку в задней области хрусталика непрерывно закладываются новые волокна. У взрослой курицы процесс дифференцировки эпителиальной клетки в хрусталиковое волокно занимает два года (Papaconstantinou, 1967). Подробнее фор-

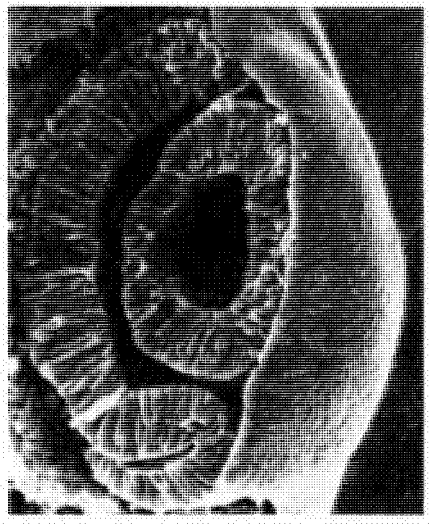


Рис. 5.29. Округлый, погруженный в глазную чашу хрусталиковый пузырек у куриного зародыша. Фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Фотография с любезного разрешения K. W. Tosney.)

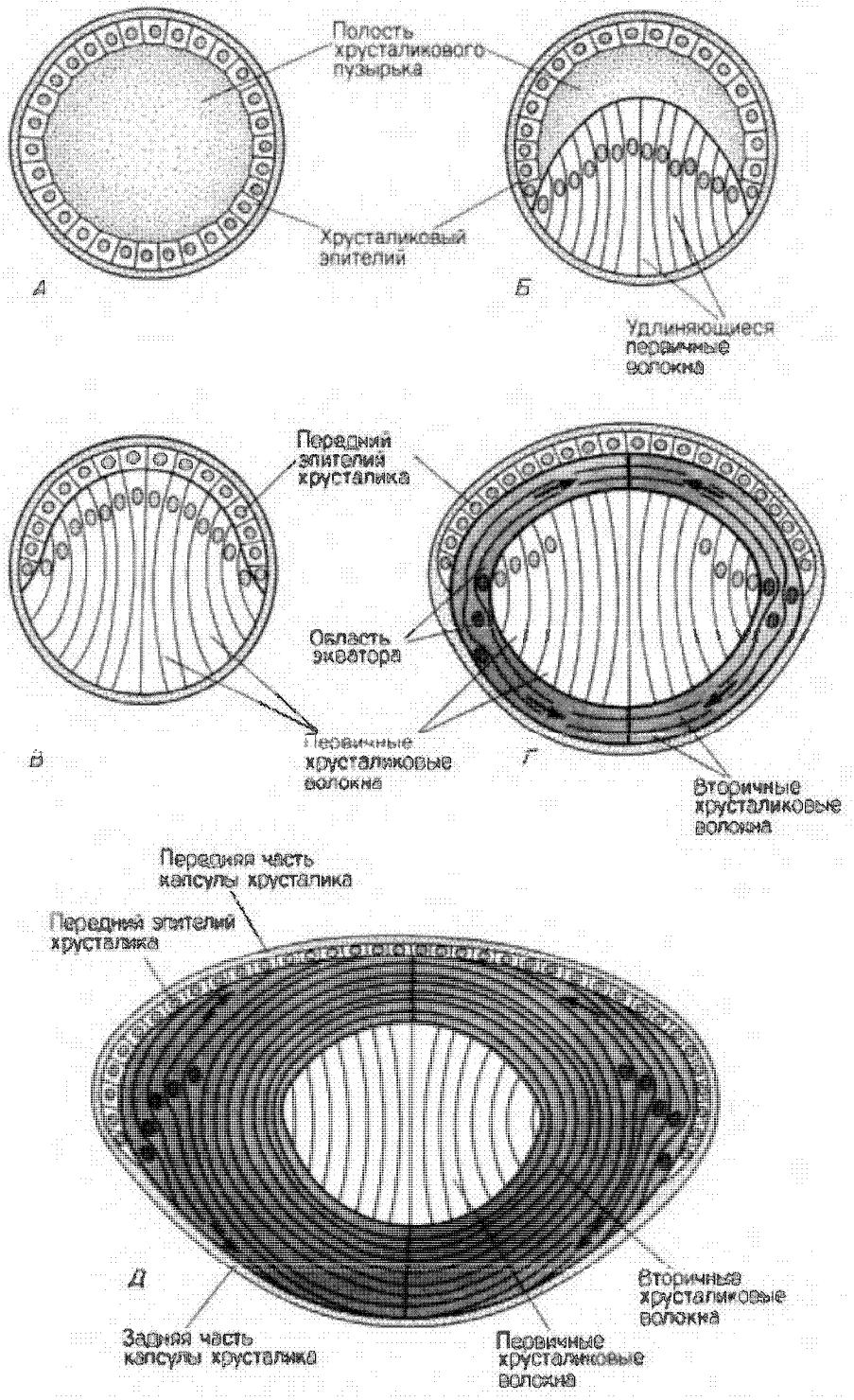


Рис. 5.30. Дифференцировка клеток хрусталика. *А*. Хрусталиковый пузырек на стадии, показанной на рис. 5.29. *Б*. Удлинение клеток, образующих хрусталиковые волокна. *В*. Хрусталик заполнен клетками, синтезирующими кристаллин. *Г*. Новые клетки хрусталика формируются из переднего эпителия. *Д*. По мере роста хрусталика происходит дифференцировка новых волокон. (По Paton, Craig, 1974.)

мирование хрусталика и роговицы рассматриваются в гл. 16.

Непосредственно перед хрусталиком лежит радужка, придающая индивидууму характерный для него (или нее) цвет глаз и содержащая мышцы, которые контролируют размер зрачка. В отличие от других мышц (происходящих из мезодермы) мышцы радужки образуются из эктодермального слоя, точнее, из той части глазной чаши, которая является продолжением нейральной сетчатки, но в ней не возникает фоторецепторов.

Нервный гребень и его производные

Нервный гребень происходит из эктодермы, но его значение для развития зародыша столь велико, что иногда нервный гребень называют четвертым зародышевым листком. Клетки нервного гребня активно мигрируют на большие расстояния и являются родоначальниками громадного числа типов клеток, включая 1) нейроны и вспомогательные глиальные клетки сенсорной, симпатической и парасимпатической нервной системы; 2) клетки надпочечника, синтезирующие адреналин; 3) содержащие пигмент клетки эпидермиса и 4) скелетные и соединительнотканные компоненты головы (табл. 5.1). Судьба клеток нервного гребня зависит от того, куда они мигрируют и где поселяются.

Пути миграции клеток нервного гребня

Как видно из рис. 5.2, нервный гребень представляет собой временную структуру, клетки которой распространяются по телу вскоре после смыкания нервной трубки. Пересаживая участки нервной трубки, взятые от зародыша цыпленка вместе с соответствующим участком нервного гребня от зародышей, имеющих радиоактивные или генетические маркеры, другим зародышам (Weston, 1963; Thiery et al., 1982), исследователи смогли проследить пути миграции клеток нервного гребня (рис. 5.31). Позже миграция этих клеток была прослежена с помощью флуоресцирующих антител, которые связываются почти исключительно с мигрирующими клетками нервного гребня. Такая методика позволяет идентифицировать отдельные клетки нервного гребня в пределах обширных областей тела. Используя флуоресцирующие антитела, исследователи из нескольких лабораторий установили три главных пути, по которым эти клетки мигрируют в разные области (Rickmann et al., 1985; Bronner-Fraser, 1986a; Teillet et al., 1987; Loring, Erickson, 1987; рис. 5.32). Первый путь простирается в вентральном направлении через передний отдел сомита. Из рис. 5.33 и цветной таблицы на обложке книги можно видеть, что мигрирующие клетки нервного гребня способны вступать только в передний, а не в задний отдел сомита. Некоторые из этих клеток достигают спинной аорты, где из них формируются **симпатические ганглии**. Ганглии представляют собой скопления нейронов, которые после стимуляции их нейронами спинного мозга передают полученные импульсы клеткам-мишеням[1]. В особых областях тела клетки нервного гребня, мигрирующие тем же путем, образуют скопления и формируют секретирующие адреналин клетки **мозгового вещества надпочечников**.

Что же происходит с теми клетками нервного гребня, которые располагаются вблизи заднего отдела сомита? Используя антитела, мы можем узнать об их положении в пространстве, но не можем выяснить направление, в котором движется специфическая группа клеток. Были проведены опыты (Teillet et al., 1987), в которых иммунологическую методику комбинировали с пересадкой генетически маркированных клеток нервного гребня перепела куриным зародышам. Антитела узнавали и метили клетки нервного гребня обоих видов животных, а генетический маркер позволял исследователю отличить клетки нервного гребня перепела от клеток нервного гребня курицы. Эти опыты дали возможность идентифицировать второй путь миграции — путь клеток, лежащих напротив задних отделов сомитов. Такие клетки нервного гребня перемещаются вдоль нервной трубки вперед или назад и затем вступают в передние отделы своих собственных или прилежащих к ним сомитов. Такие клетки объединяются с некоторыми из клеток нервного гребня, исходно расположенных напротив переднего отдела сомита и вместе с ними формируют **ганглии дорсальных корешков** — скопления нейронов, переключающих сенсорную информацию на спинной мозг. Таким образом, каждый ганглий дорсального корешка сформирован тремя популяциями клеток нервного гребня: одна — из участка нервного гребня, прилежащего к переднему отделу сомита, а две другие — из его участков, которые прилегают к задним отделам двух соседних сомитов.

Третий основной путь миграции клеток нервного гребня проходит в дорсолатеральном направлении под покровным эпителием зародыша. Некоторые из клеток, мигрирующих по этому пути, дифференцируются в пигментные клетки (у млекопитающих — **меланоциты**). Они движутся из центральной дорсальной области по вентральной поверхности покровного эпителия в этом направлении и достигают в конце концов кожи живота. У некоторых мутантов, у которых нарушены процессы миграции клеток нервного

[1] Парасимпатический отдел периферической нервной системы также формируется из клеток нервного гребня, мигрирующих тем же путем, но только в краниальные и шейные области зародыша.

Таблица 5.1. Основные производные нервного гребня [1]

Пигментные клетки	Сенсорная нервная система	Вегетативная нервная система	Скелетная и соединительная ткань	Эпокринные железы
ТУЛОВИЩНЫЙ ОТДЕЛ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ (ВКЛЮЧАЯ ШЕЙНЫЙ ОТДЕЛ)				
Меланоциты	Спинальные ганглии	*Симпатическая*	Мезенхима спинного плавника у амфибий	Мозговое вещество надпочечника
Ксантофоры (эритрофоры)	Участие в ганглиях дорсальных корешков блуждающего нерва (X)	Верхний шейный ганглий	Стенки артериальных дуг	Клетки, продуцирующие кальцитонин
Иридофоры (гуанофоры) в корионе, эпидермисе и производных эпидермиса		Превертебральные ганглии	Соединительная ткань паращитовидной железы	Клетки типа I каротидного синуса
		Паравертебральные ганглии		Парафолликулярные клетки щитовидной железы
		Мозговое вещество надпочечников		
		Парасимпатическая		
		Ремаков узел		
		Крестцовое сплетение		
		Висцеральные и кишечные ганглии		
	Некоторые опорные клетки			
	Глия (олигодендроциты)			
	Шванновские клетки			
	Некоторые клетки мозговой оболочки			
ЧЕРЕПНОЙ ОТДЕЛ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ				
Незначительное участие	Тройничный (V)	*Парасимпатическая система*	Большая часть висцеральных хрящей	
	Лицевой (VII) корешковый ганглий	Ресничный	Передние черепные трабекулы	
	Языкоглоточный (IX) корешковый (верхний) ганглий	Рецепторный	Клетки, участвующие в образовании задних трабекул, базальной мембраны парахордальных хрящей	
		Клиновидноёбный	Одонтобласты	
	Блуждающий (X) корешковый (яремный) ганглий	Субмандибулярный	Головная мезенхима (покровные кости)	
		Ганглии внутренних органов		
	Опорные клетки			

[1] Weston, 1970; Bockman, Kirby, 1984

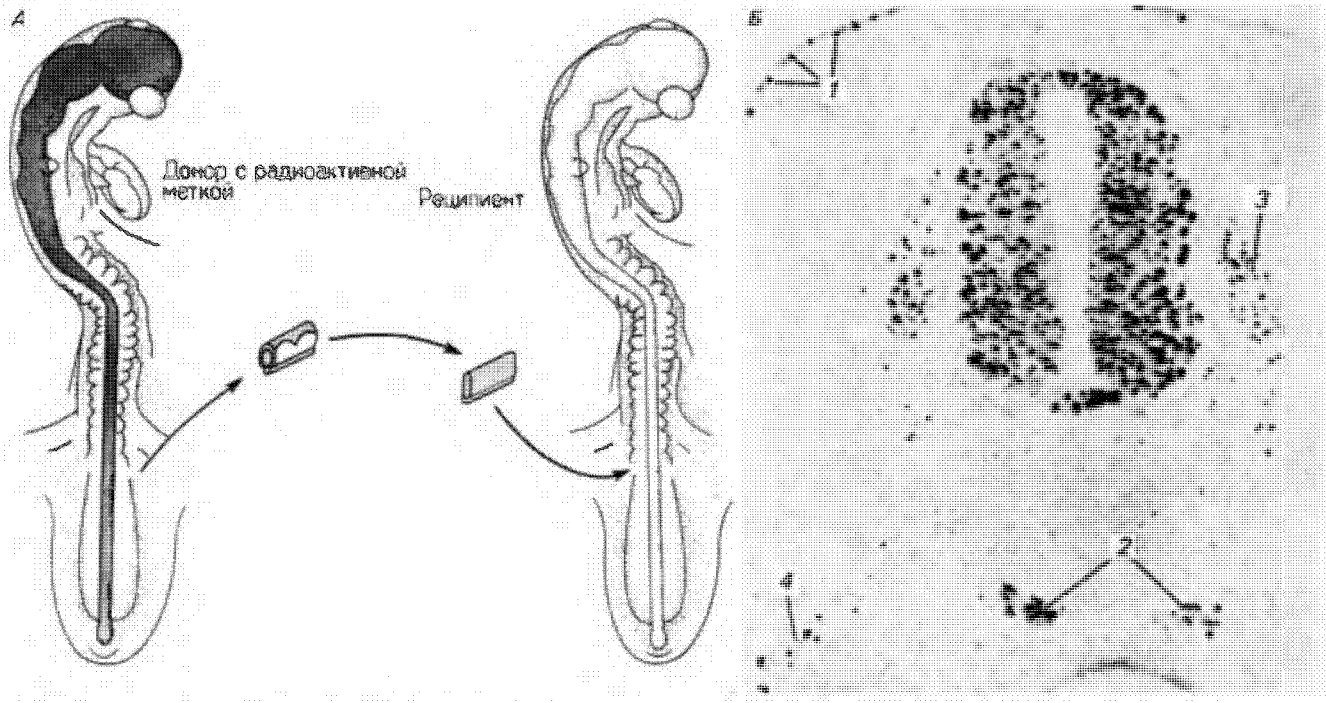


Рис. 5.31. Миграция клеток нервного гребня. *А.* **Методика пересадки с целью маркировки клеток нервного гребня.** У зародыша-донора вырезают участок дорсальных осевых структур; из этого участка изолируют нервную трубку и нервный гребень и пересаживают эти структуры зародышу-реципиенту на место, из которого такие же структуры были предварительно удалены. Если клетки нервного гребня донора помечены ^{3}H-тимидином или генетически (взяты от зародыша другого вида или линии), то потомки этих клеток могут быть прослежены на последующих стадиях развития. *Б.* Локализация методом радиоавтографии клеток нервного гребня, которые мигрировали из пересаженного донорского нервного гребня, меченного радиоактивным изотопом, и дифференцировались в меланобласты (*1*), клетки симпатических ганглиев (*2*), ганглиев дорсальных корешков (*3*) и глиальные клетки (*4*). *В.* Цыпленок, развившийся из зародыша непигментированной линии кур, которому был пересажен участок нервного гребня, взятый от зародыша пигментированной линии. Из клеток пересаженного нервного гребня дифференцировались пигментные клетки, способные мигрировать в кожу крыла. (По Weston, 1963; фотографии любезно предоставлены J. Weston.)

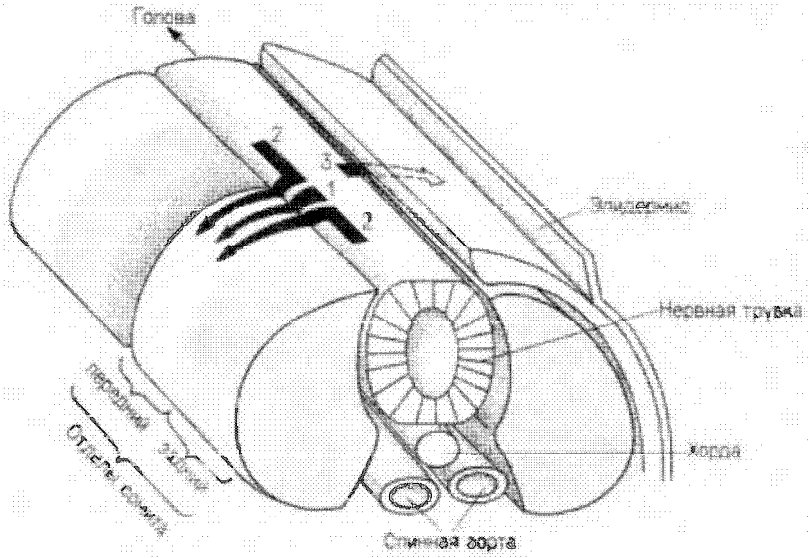


Рис. 5.32. Миграция клеток нервного гребня в туловищной области куриного зародыша. Путь 1: клетки перемещаются в вентральном направлении через передний отдел сомита. Эти клетки, вероятно, участвуют в образовании симпатических и парасимпатических ганглиев, а также становятся клетками мозгового вещества надпочечников и ганглиев дорсальных корешков. Путь 2: клетки, примыкающие к заднему отделу сомита, мигрируют между нервной трубкой и сомитом, а затем вступают в передний отдел лежащего рядом сомита. Эти клетки были обнаружены в ганглиях дорсальных корешков. Путь 3: клетки мигрируют в дорсолатеральном направлении под покровным эпителием. Эти клетки становятся меланоцитами, вырабатывающими пигмент.

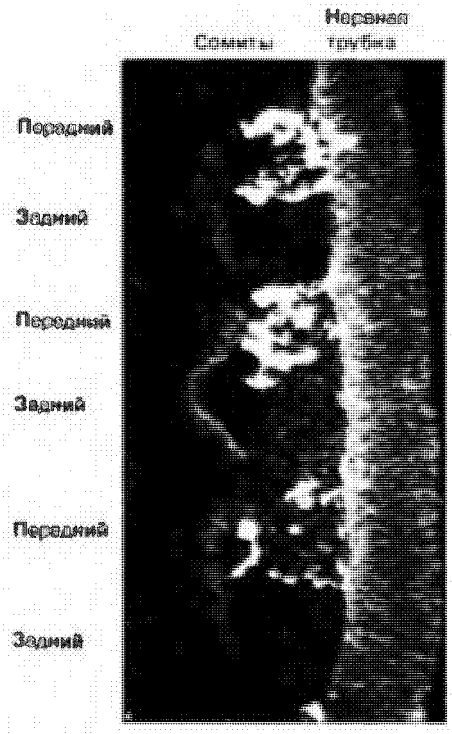


Рис. 5.33. Миграция клеток нервного гребня. Продольные срезы через сомиты, окрашенные связанной с флуоресцеином антисывороткой HNK-1, которая избирательно «узнает» клетки нервного гребня. Интенсивное свечение клеток видно только в переднем, но не в заднем отделе каждого сомита. (Из Bronner-Fraser, 1986a; фотография с любезного разрешения M. Bronner-Fraser.)

гребня, на брюхе образуется белое пятно, свидетельствующее о том, что пигментные клетки этого места не достигли (рис. 5.34).

Таким образом, клетки нервного гребня мигрируют не случайно, а следуя строго определенным путям. Природа этих направляющих их движение путей еще неизвестна, однако полагают, что миграция клеток контролируется субстратом, по которому они продвигаются. В 1941 г. Пауль Вейс высказал предположение, что между специфическими молекулами поверхности клетки и комплементарными молекулами субстрата должны возникать временные связи. Сравнительно недавно были получены данные, свидетельствующие о том, что по крайней мере в отношении клеток нервного гребня дело обстоит именно так. Во-первых, когда нервную трубку и связанный с нею нервный гребень переворачивают так, что нервная трубка оказывается вверху, клетки нервного гребня продолжают мигрировать из него. Однако теперь они движутся в дорсальном, а не в вентральном направлении, тем самым сохраняя прежнюю ориентацию по отношению к нервной трубке. Во-вторых, когда клетки нервного гребня или их производные помещают (посредством пересадки или инъекции) на место, по которому в норме пролегает путь их миграции, они мигрируют по этому пути. Другие же эмбриональные клетки неспособны ориентироваться подобным образом и остаются в том месте, на которое их поместили (Erickson et al., 1980; Bronner-Fraser, Cohen, 1980). Следовательно, клетки нервного гребня могут узнавать некоторые пути в зародыше и мигрировать по ним.

Возможно, клетки нервного гребня узнают правильный путь потому, что он маркирован белком фибронектином. Розавио и др. (Rosavio et al., 1983) было обнаружено, что мигрирующие клетки нервного гребня, прикрепляясь к этому белку, движутся по нему. Если клетки нервного гребня, помещенные в чашку Петри, приходят в контакт с полоской фибронектина, то они предпочитают двигаться по ней в направлении от более высоких концентраций клеток к более низким (рис. 5.35). Это имитирует поведение клеток нервного гребня в головной области, где такие клетки путешествуют по тонким, богатым фибронектином трекам, удаляясь от участков с высокой плотностью клеток (Mayer et al., 1981). Клетки нервного гребня обнаруживают также сродство к ламинину, другому белку, секретируемому клетками и участвующему в образовании внеклеточ-

Рис. 5.34. Миграция пигментных клеток. Вид с дорсальной (*А*) и вентральной (*Б*) сторон мыши, гетерозиготной по мутации *White*. Меланобласты не мигрируют по всей поверхности тела мыши: в центре брюха сохраняется белое пятно (отсутствуют пигментные клетки). У мышей, гомозиготных по этой мутации (на рисунке они не показаны), шерсть белая, но в сетчатке можно видеть пигмент меланин. (Фотографии с любезного разрешения Джексоновской лаборатории.)

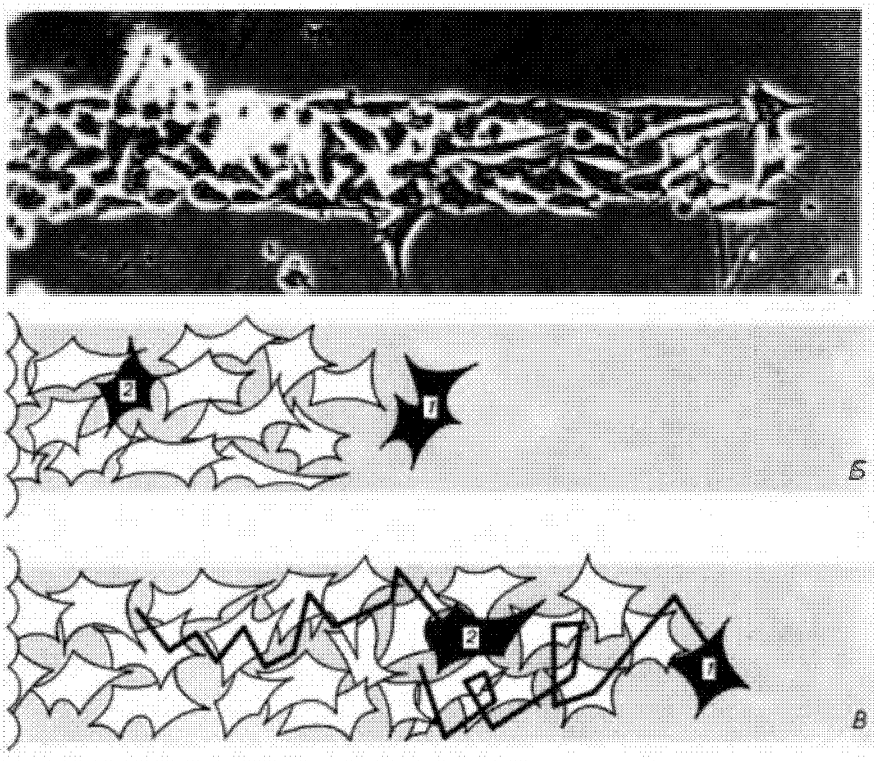


Рис. 5.35. Миграция клеток нервного гребня по фибронектиновому субстрату. Нервную трубку и связанный с ней нервный гребень удаляли у зародышей и помещали в чашки Петри на фибронектиновую подложку. *А*. Клетки нервного гребня мигрируют от фиксированного места (*слева*) по фибронектиновой подложке не случайным образом. *Б*, *В*. Треки движения клеток, выбранных для наблюдения, по полоске фибронектина. Волнообразная линия слева представляет собой нервную трубку и нервный гребень, служившие источником мигрирующих клеток. (По Rosavio et al., 1983; фотография с любезного разрешения J.-P. Thiery.)

ного матрикса (Newgreen et al., 1986). Было показано (Bronner-Fraser, 1986b), что если ранним куриным зародышам в область головы инъецировать антитела против фибронектиновых и ламининовых рецепторов клеток нервного гребня, то миграция этих клеток резко нарушается. Итак, узнавание фибронектина и ламинина играет важную, но пока еще невыясненную роль в миграции клеток нервного гребня.

Если миграция клеток нервного гребня зависит от наличия этих молекул внеклеточного матрикса, то можно ожидать, что концентрация или локализация фибронектина (или ламинина) в местах, по которым мигрируют эти клетки, различны. Было высказано предположение (Loring, Erickson, 1987), что такие различия могут быть обнаружены между передним отделом сомита (по которому мигрируют клетки нервного гребня) и его задним отделом (по которому они не мигрируют). Как мы узнаем из следующей главы, блок ткани сомита расщепляется на внутреннюю часть — склеротом, из которого образуются хрящи позвоночника, и наружную — дермамиотом, который даст начало мышцам и собственно коже, или кориуму. Лоринг и Эриксон обнаружили, что у куриного зародыша клетки нервного гребня проникают в сомит в период формирования дермамиотома. В переднем отделе сомита этот процесс происходит раньше, чем в заднем, и к тому времени, когда образуется задний отдел дермамиотома, клетки нервного гребня уже завершают свою миграцию через его передний отдел. Кроме того, мигрирующие клетки, по-видимому, прилипают к секретируемому клетками сомита внеклеточному матриксу, богатому фибронектином и ламинином (рис. 5.36).

Согласно этой модели, передний отдел сомита оказывает пермиссивное (и, возможно, директивное) влияние на миграцию клеток нервного гребня, образуя подходящий субстрат для их передвижения. Без такого субстрата миграция клеток была бы невозможна. Это предположение подтверждается данными, полученными эмбриологами более 50 лет назад. Леман (Lehmann, 1927) показал, что удаление сомита влечет за собой неспособность к образованию соответствующего чувствительного ганглия, а Детвайлер (Detwiler, 1937) обнаружил, что пересадка дополнительных сомитов зародышу какой-либо амфибии приводит к увеличению у него числа этих ганглиев. Таким образом, можно думать, что миграция клеток нервного гребня опосредована изменениями в составе белков внеклеточного матрикса, которые представляют собой их среду в зародыше.

Кроме фибронектина и ламинина, в детерминации миграционных путей клеток нервного гребня могут играть важную роль и другие вещества. Одним из таких веществ является гиалуроновая кислота. Для миграции клеток нервного гребня необходимо пространство, в котором они могут двигаться. Полагают, что гиалуроновая кислота вызывает

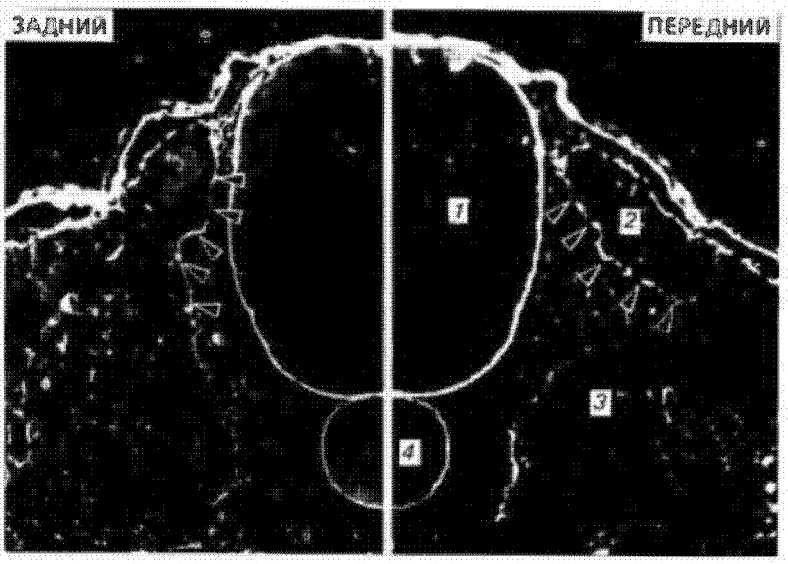


Рис. 5.36. Различия между передним и задним отделами сомита. Фотография составлена из снимков срезов через задний и передний отделы одного и того же сомита у куриного зародыша. Срезы были сделаны после того, как сомит разделился на склеротом и дермамиотом. Микроскопические препараты окрашены флуоресцирующими антителами против ламинина. Ламинин, окружающий клетки нервного гребня, указывает им путь проникновения в передний отдел сомита. В заднем отделе сомита отделение склеротома от дермамиотома еще не завершилось и ламинин не может обеспечить миграцию клеток нервного гребня в сомит. *1* — нервная трубка; *2* — дермамиотом; *3* — склеротом; *4* — хорда. (Фотография с любезного разрешения J. F. Loring.)

образование свободного от клеток пространства, в которое затем внедряются клетки нервного гребня (Pratt et al., 1975; Solursh et al., 1979). Эта модель сходна с моделью, предложенной для объяснения инвазии бластоцеля у птиц клетками-предшественниками мезодермы. И действительно, Мейер (Meier, 1981) обнаружил, что гиалуроновая кислота накапливается в некоторых областях, где происходит миграция клеток нервного гребня.

Кроме того, клетки нервного гребня сами могут изменять путь, по которым они мигрируют, делая затруднительным использование этих путей другими клетками нервного гребня. Было показано (Weston, Butler, 1966), что клетки нервного гребня, взятые от позднего зародыша и помещенные в окружение, состоящее из клеток более раннего зародыша, способны мигрировать во все области, в которые в норме должны попасть эти клетки. Однако если клетки нервного гребня от раннего зародыша помещают в окружение из клеток нервного гребня более позднего зародыша, то большинство «молодых» клеток образуют только ганглии дорсальных корешков. Это наблюдение подтверждает тот факт, что в среде, по которой должны были перемещаться эти клетки, уже произошли какие-то изменения. Эти изменения могут быть вызваны самим перемещением клеток раннего гребня; указанный путь может подвергнуться облитерации в результате дальнейшего развития сомитов.

Полипотентность клеток нервного гребня

Одним из наиболее удивительных свойств клеток нервного гребня является их **полипотентность**. Единичная клетка нервного гребня может дать начало разным клеточным типам в зависимости от места ее локализации в зародыше. Например, парасимпатические нейроны, формируемые клетками шейного отдела нервного гребня, синтезируют в качестве нейромедиатора ацетилхолин. Поэтому их называют **холинергическими нейронами**. Симпатические нейроны, образованные клетками грудного отдела нервного гребня, синтезируют норадреналин. Поэтому их называют **адренергическими нейронами**. Однако когда производят реципрокную пересадку шейного и грудного отделов нервного гребня, то клетки бывшего грудного отдела дают начало холинергическим нейронам парасимпатических ганглиев, а клетки бывшего шейного отдела — адренергическим нейронам симпатических ганглиев (LeDouarin et al., 1975). Таким образом, клетки грудного отдела нервного гребня способны развиваться в холинергические нейроны парасимпатических ганглиев, когда они помещены в область шеи, а клетки шейного отдела — в адренергические нейроны, когда их помещают в область туловища. Было обнаружено (Kahn et al., 1980), что клетки шейного и грудного отделов нервного гребня до начала их миграции содержат ферменты, необходимые для синтеза как ацетилхолина, так и норадреналина. Полипотентность некоторых участков нервного гребня такова, что клетки из участков нервного гребня, которые в нормальном зародыше никогда не образуют нервов, при определенных условиях могут быть вынуждены делать это. Клетки нервного гребня из области среднего мозга в норме мигрируют в глаз и, взаимодействуя с клетками пигментного эпителия, превращаются в склеральные хрящевые клетки (Noden, 1978). Однако если этот участок нервного гребня пересадить в область туловища, то он сформирует нейроны чув-

ствительных ганглиев, клетки мозгового вещества надпочечника (хромаффинную ткань), глию и шванновские клетки (Schweizer et al., 1983).

Выбор нейромедиаторов осуществляется, вероятно, в два этапа, которые соответствуют функциональному разделению периферической нервной системы. Первая ступень заключается в отделении клеток-предшественников вегетативной нервной системы (образующих симпатические и парасимпатические нейроны) от клеток-предшественников чувствительной (сенсорной) нервной системы, образующих спинномозговые (спинальные) и черепные (краниальные) ганглии. ЛеДуарен (LeDouarin, 1986) предположила, что каждая мигрирующая клетка нервного гребня уже стала коммитированной к развитию в клоны либо вегетативных, либо сенсорных нейронов. Среда, в которой находятся мигрирующие клетки, отбирает соответствующую популяцию, стимулируя клетки одного из этих типов к размножению. Чувствительные ганглии, например, развиваются в контакте с центральной нервной системой, которая, возможно, продуцирует факторы с малым радиусом действия, обеспечивающие селективное выживание клеток-предшественников только чувствительных нейронов. И действительно были выделены белки, обладающие такими свойствами (Le Douarin, 1986; Barde et al., 1982).

Окончательная дифференцировка клеток, синтезирующих определенные нейромедиаторы, также в значительной степени детерминируется окружением, в котором развиваются эти клетки; гибель клеток в данном случае роли не играет (Coulombe, Bronner-Fraser, 1987). Клетки сердца, например, могут секретировать фактор (или факторы), который превращает норадренергические симпатические нейроны и холинергические парасимпатические нейроны, не изменяя показателей их выживания или роста (Chun, Patterson, 1977; Fukada, 1980). Идентификация этих факторов затруднена тем, что они содержатся в очень малых количествах и их определение занимает две-три недели. Однако Фукада (Fukada, 1985) выделил из культивируемых клеток сердца гликопротеин с молекулярной массой 45 000 дальтон, который индуцировал синтез ацетилхолина в норадренергических нейронах симпатических ганглиев крысы и образование холинергических синапсов.

Было также обнаружено (Anderson, Axel, 1987), что гормональная среда может определять судьбу клеток нервного гребня. Клетки, мигрирующие в область, предназначенную стать хромаффинной тканью, могут дифференцироваться в двух направлениях. В присутствии фактора роста нервов такие клетки дифференцируются в симпатические нейроны. Однако если их подвергнуть действию гликокортикоидов, подобных тем, которые продуцируются клетками коры надпочечников, они дифференцируются в клетки мозгового вещества надпочечника (хромаффинные клетки).

Кроме периферических нейральных структур, нервный гребень продуцирует также все меланинсодержащие клетки в организме (за исключением некоторых нейральных производных, таких, как пигментный эпителий глаза). В серии классических экспериментов Роулс (Rawles) с коллегами трансплантировали нервную трубку и нервный гребень, взятые от пигментированных куриных зародышей, в нервную трубку зародышей альбиносов. В результате (см. рис. 5.31, *Б*) из таких зародышей получались белые цыплята с участком окрашенных перьев. Следует отметить, что при образовании норадреналина и адреналина (симпатическими нейронами и мозговым веществом надпочечников) и меланина (меланоцитами) происходит гидроксилирование тирозина и последующее окисление этого продукта.

Из всего изложенного выше может показаться, что все клетки нервного гребня вначале идентичны по своим потенциям. Однако это наблюдается не во всех случаях. Так, например, только клетки краниального отдела нервного гребня, по-видимому, способны продуцировать хрящи головы. Клетки его грудного отдела не могут заменить их в этом отношении. Кроме того, краниальный отдел нервного гребня, будучи пересажен в область туловища, участвует в формировании хрящей тела, которые в норме из клеток нервного гребня не возникают. Итак, нервный гребень предоставляет в распоряжение специалистов по биологии развития некий набор довольно легко идентифицируемых клеток, которые могут служить модельной системой для изучения проблемы клеточной миграции и дифференцировки.

Эпидермис и его производные

Клетки, покрывающие зародыш после завершения нейруляции, представляют собой презумптивный эпидермис. Первоначально эта ткань образует слой толщиной в одну клетку, однако у большинства позвоночных она вскоре становится двухслойной структурой. Наружный слой дает начало перидерме — временному покрову, который затем будет замещен, как только лежащий под ним слой дифференцируется в истинный эпидермис. Этот внутренний слой, называемый **базальным** или **герминативным слоем** (stratum germinativum), дает начало всем клеткам эпидермиса (рис. 5.37). Сначала клетки герминативного слоя делятся, образуя другую, наружную популяцию клеток — **шиповатый слой**. Вместе эти два слоя обозначают термином **malpighиев (ростковый) слой**. Клетки мальпигиева слоя делятся, образуя **зернистый**, или **гранулярный**, слой, названный так потому, что его клетки содержат гранулы белка ке-

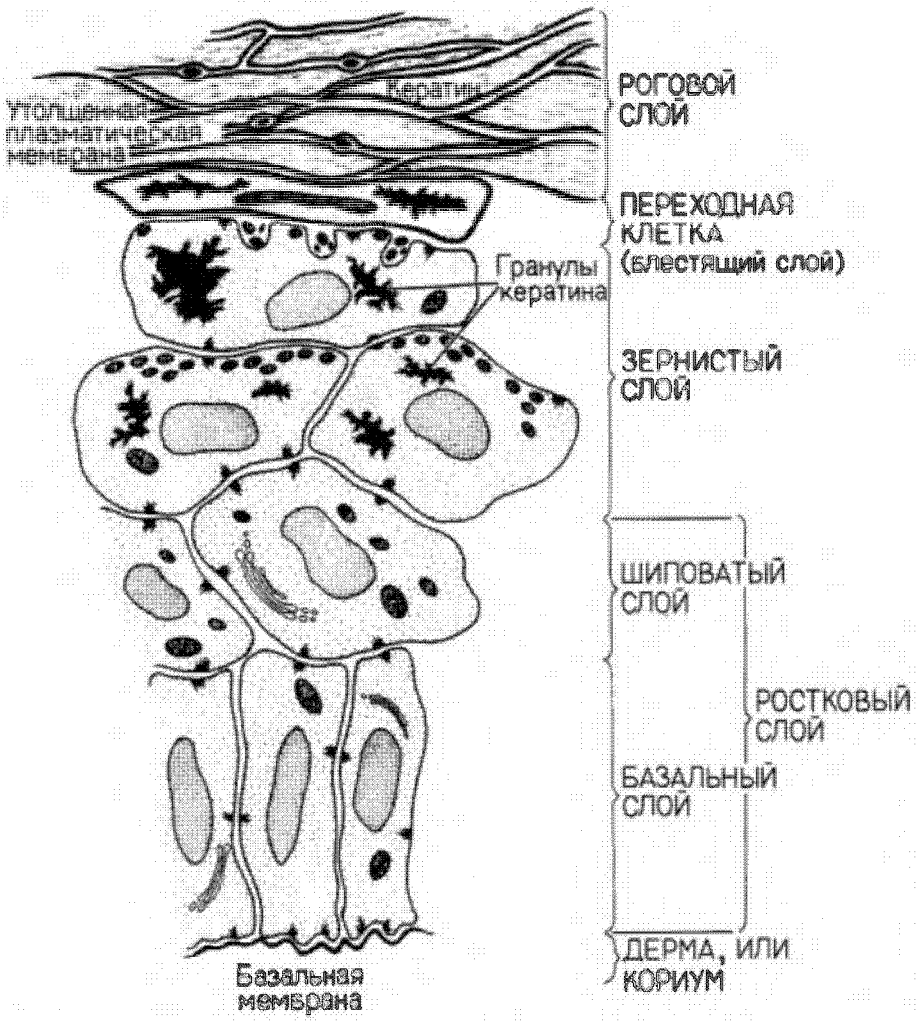


Рис. 5.37. Схематическое изображение слоев эпидермиса. Базальные клетки активно делятся, тогда как полностью кератинизированные клетки поверхностного слоя кожи мертвы и слущиваются. (По Montagna, Parakkal, 1974.)

ратина. В отличие от клеток, остающихся в мальпигиевом слое, клетки зернистого слоя не делятся. Они превращаются в **кератиноциты**. Клетки этого слоя заполняются кератином по мере того, как они стареют и мигрируют кнаружи. Здесь они формируют **роговой слой** (stratum corneum), превращаясь в плоские мешки с кератином. Ядра оттесняются к одной стороне клетки. Вскоре после рождения ребенка клетки рогового слоя слущиваются и замещаются новыми клетками, поступающими из зернистого слоя. В течение всей жизни мертвые кератинизированные клетки рогового слоя слущиваются (человек теряет примерно 1,5 грамма мертвых клеток ежедневно [1]) и замещаются новыми клетками, источником которых служат делящиеся клетки росткового слоя. Пигментные клетки нервного гребня также поселяются в мальпигиевом слое, где они передают свои пигментные мешочки (меланосомы) развивающимся кератиноцитам. Клетке, образовавшейся в мальпигиевом слое взрослого человека, требуется примерно две недели, чтобы достичь рогового слоя. У больных псориазом, характеризующимся слущиванием огромных количеств эпидермальных клеток, для этого требуется всего два дня (Weinstein, van Scott, 1965; Halprin, 1972).

Один эпидермис не образует кожи. В следующей главе будет показано, что подстилающая его мезодерма дает начало собственно коже, называемой также **дермой или корнумом**. Этот слой состоит из рыхлой соединительной ткани, заключенной в эластичный гликопротеиновый матрикс. Взаимодействуя в определенных местах, дерма и эпидермис образуют производные кожи: волосы, чешуи или перья (в

[1] Бóльшая часть этих клеток становится «домашней пылью», покрывающей мебель и полы. Если вы сомневаетесь в этом, сожгите немного такой пыли. Она будет пахнуть точно так же, как паленая кожа.

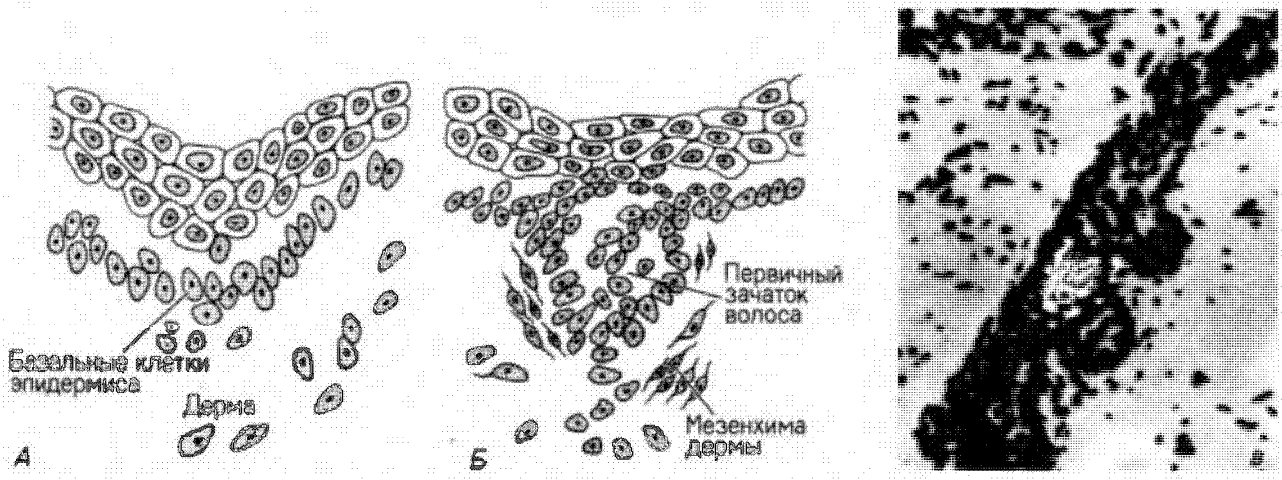


Рис. 5.38. Развитие волосяного фолликула в коже плода человека. *А*. Базальные эпидермальные клетки становятся цилиндрическими и слегка погружаются в дерму. *Б*. Эпидермальные клетки продолжают активно размножаться, а мезенхимные клетки дермы накапливаются у основания первичного зачатка волоса. *В*. Удлиняющийся зачаток волоса. Самое верхнее выпячивание развивается в апокриновую потовую железу, а центральное выпячивание — в сальную железу. Нижнее выпячивание дифференцируется в волосяную луковицу. (Фотография с любезного разрешения W. Montagna.)

зависимости от вида животного), потовые и сальные железы.

Первым указанием на то, что в данном месте будет формироваться волосяной фолликул, служит скопление клеток в базальном слое эпидермиса. Такие скопления возникают в разное время и в разных местах зародыша. Базальные клетки удлиняются и делятся, погружаясь в дерму, где образуют волосяной фолликул (рис. 5.38). На этой стадии происходит набухание эпидермиса в двух участках. Клетки верхнего участка впоследствии образуют **сальные железы**, единственным секретом которых является жировое вещество, называемое **кожным салом**. У многих млекопитающих, в том числе и у человека, жировой секрет смешивается со слущивающимися клетками периодермы, образуя беловатую массу, **vernix caseosa**, окружающую плод к моменту рождения. Набухший нижний участок превращается в **волосяную луковицу**, которую затем окружает поднимающаяся мезенхима. Герминативный эпидермис, лежащий непосредственно над этой мезенхимой, пролиферирует и образует кератинизированный волос.

Первые волосы у зародыша человека, очень тонкие и густые, называются **лануго**. Волосы этого типа обычно утрачиваются перед рождением и замещаются (по меньшей мере отчасти новыми фолликулами) короткими и шелковистыми волосами — **веллюсом** (vellus). Веллюс сохраняется на многих частях человеческого тела, обычно считающихся безволосыми, таких, как лоб и веки. В других областях тела веллюс уступает место «терминальным» (дефинитивным) волосам. В течение жизни человека некоторые из фолликулов, дающих начало веллюсу, могут вновь вернуться к его образованию. Кончики пальцев детей, например, имеют фолликулы, продуцирующие веллюс вплоть до наступления юношеского возраста. К этому времени образуются уже дефинитивные кератинизированные волосы. И напротив, при нормальном мужском облысении фолликулы в области лысины возвращаются вновь к образованию непигментированных и очень тонких волос типа веллюса (Montagna, Parakkal, 1974). Взаимодействия между дермой и эпидермисом, определяющие размещение и характерные особенности волос, перьев, чешуи, подробнее обсуждаются в гл. 16 и 17.

Из герминативных клеток эпидермиса возникают также потовые железы и являющиеся в эмбриологическом смысле слова их модификацией молочные железы. Подобно волосяным луковицам, эти железы образуются путем врастания герминативных базальных клеток эпидермиса в дерму. Взаимодействия между эпителием и мезенхимой, необходимые для развития молочных желез, рассматриваются в гл. 19.

Дополнительные сведения и гипотезы

Тератология

Развитие организма представляет собой сложное, хорошо скоординированное сочетание таких процессов, как деление клеток, их миграция, взаимодействие, генная регуляция и дифференцировка. Любое воздействие, нарушающее эти процессы, может вызвать пороки развития зародыша. Фактически примерно половина всего числа зародышей не доживает до рождения. У большинства из них аномалии обнаруживаются на очень ранних стадиях, и такие зародыши не могут имплантироваться в стенку матки. Другие зародыши имплантируются, но не могут укрепиться в стенке матки настолько, чтобы беременность стала успешной. Таким образом, наиболее аномальные зародыши спонтанно абортируются даже до того, как женщина узнает о своей беременности (Boué et al., 1985). В одной из работ (Hertig, Rock, 1949) было показано, что у 13 из 34 зародышей в возрасте от 1 до 17 сут имелись те или иные хорошо различимые аномалии. Почти 90% плодов, абортированных до месячного возраста, были аномальными (Mikamo, 1970; Miller, Poland, 1970). С помощью чувствительного иммунологического теста, который способен выявить наличие хорионического гонадотропина через 8 или 9 сут после оплодотворения, была установлена беременность у 112 нормальных женщин. У 67 из них в дальнейшем не обнаружилось никаких признаков беременности (Edmonds et al., 1982).

Из этого следует, что развитие многих зародышей человека нарушается рано и они недолго живут в матке. Дефекты легких, конечностей или рта не столь опасны для плода (который, находясь в организме матери, не зависит от этих органов), но они могут серьезно угрожать жизни ребенка после его рождения. Примерно 5% всех родившихся детей имеют явные уродства. Одни из них не опасны для жизни, а другие представляют собой тяжелые отклонения от нормы (McKeown, 1976).

Наука о врожденных аномалиях называется **тератологией**, а агенты, ответственные за их возникновение, называются **тератогенами** (создателями чудовищ, монстров). Тератогены действуют в течение определенных **критических периодов**. Для любого органа наиболее критическим периодом является время его роста и образования специфических для этого органа структур. Различные органы имеют различные критические периоды, хотя период между 15 и 60 сут беременности — критический для многих органов. Сердце формируется между 3-й и 4-й неделями, тогда как наружные половые органы наиболее чувствительны к воздействиям между 8-й и 9-й неделями. Мозг и скелет чувствительны к вредным влияниям постоянно, начиная с 3-й недели после зачатия до конца беременности и позже.

Существует много разных тератогенов. К одному из классов относятся агенты, вызывающие генные мутации. Ионизирующая радиация и некоторые лекарственные препараты вызывают разрыв хромосом и изменяют структуру ДНК. По этой причине беременным женщинам следует избегать лишних воздействий рентгеновских лучей, хотя данных о врожденных аномалиях, вызванных облучением в целях диагностики, у нас нет (Holmes, 1979). Врожденные уродства, такие, как ахондропластическая карликовость (детерминируется аутосомным доминантным геном, вызывающим развитие укороченных конечностей при нормальном туловище) или синдром Роберта (аутосомная рецессивная болезнь, при которой у ребенка наблюдаются выраженная редукция конечностей, расщепленное небо и сильное отставание в умственном развитии), являются примерами мутации по одному-единственному гену (наследуемой по законам Менделя). Другие врожденные заболевания обусловлены наличием лишних хромосом. К числу таких заболеваний относятся, например, синдром Дауна (наличие лишней хромосомы в 21-й паре, что вызывает умственную отсталость, пороки сердца, сохранение определенных черт, характерных для мышц плода) и синдром Клайнфельтера (наличие лишней Х-хромосомы у самца, что влечет за собой недоразвитие семенников, стерильность и небольшую задержку умственного развития).

Еще один класс тератогенов представлен вирусами. Грегг (Gregg, 1941) документально подтвердил, что у женщин, перенесших краснуху (немецкую корь) в первой трети беременности, в каждом одном из шести случаев рождались дети с катарактой, болезнями сердца и глухотой. Это были первые данные о том, что мать не полностью защищает плод от влияния внешней среды. Чем раньше вирус краснухи поражает беременную женщину, тем больше риск, что пострадает зародыш. По-видимому, первые пять недель являются критическими, потому что в это время формируются сердце, органы зрения и слуха. Эпидемия краснухи в 1963—1965 гг. вызвала гибель 20 000 плодов и рождение 30 000 детей с врожденными пороками развития. Два других вируса — цитомегаловирус и вирус простого герпеса — также являются тератогенными. Инфицирование раннего зародыша цитомегаловирусом почти всегда фатально, но заражение более поздних зародышей может

привести к слепоте, глухоте, церебральному параличу и задержке умственного развития.

Микроорганизмы редко бывают тератогенными, но два из них могут оказать вредное воздействие на человеческий зародыш. *Toxoplasma gondii* — простейшее, переносимое кроликами и кошками (и содержащееся также в их фекалиях), — может проникнуть в зародыш через плаценту и вызвать поражение мозга и глаз у плода. *Treponema pallidum* — возбудитель сифилиса — может убить ранние плоды и вызвать врожденную глухоту при воздействии на плоды старшего возраста.

Четвертый класс тератогенов представлен также некоторыми лекарственными препаратами и, кроме того, химическими соединениями, встречающимися в природе. Тератогены были обнаружены даже в нетронутых цивилизацией альпийских лугах Скалистых гор. Там растет скунсовая капуста (*Veratrum californicum*), которую едят овцы. У ягнят, родившихся от овец, которые питались этим растением во время беременности, нередко обнаруживаются тяжелые неврологические нарушения развития, включая циклопию, т.е. слияние обоих глаз в один, расположенный в центральной части головы (рис. 5.39). Такое уродство встречается также у людей, свиней и многих других млекопитающих; в результате тяжелых нарушений развития мозга, например отсутствия гипофиза, организм погибает вскоре после рождения.

Хинин и алкоголь — два вещества, получаемые из растений, также вызывают врожденные уродства: хинин — глухоту, а алкоголь (при употреблении в количестве, большем 50—85 г в 1 сутки) — отставание в умственном и физическом развитии ребенка. Мы не располагаем данными о том, что никотин и кофеин вызывают врожденные аномалии, но у женщин — злостных курильщиц (20 и более сигарет в день) — часто рождаются более мелкие дети, чем у некурящих. Курение также значительно понижает количество и подвижность спермиев в семенниках мужчин, которые выкуривают по меньшей мере 4 сигареты в день (Kulikauskas et al., 1985).

Кроме того, наше индустриальное общество поставляет сотни новых искусственных веществ, которые ежегодно включаются во всеобщее потребление. Пестициды и органические вещества, содержащие ртуть, вызывают нарушения неврологического характера и аномалии в поведении у детей, матери которых во время беременности ели пищу, содержащую эти вещества. (Это доказала трагедия, случившаяся в 1965 г., когда одна из японских фирм сбросила ртуть в озеро, где она попала в рыбу, которой питались жители деревни Минамата, в том числе и беременные женщины. Врожденные уродства — поражения головного мозга и слепота у рожденных ими детей — стали известны как болезнь Минаматы.)

Рис. 5.39. Голова циклопического ягненка, родившегося у овцы, которая в начале беременности ела один из видов чемерицы — *Veratrum californicum*. Полушария головного мозга слились, и образовался только один глаз. Гипофиз отсутствует. (Из Binns et al., 1964; фотография с любезного разрешения J. F. James и USDA-ARS Poisonous Plant Laboratories.)

За последние 5 лет медики обнаружили новый тератоген — **13-цис-ретиноевую кислоту (РК)**. Ретиноевые кислоты являются аналогами витамина А и могут имитировать влияние витамина на дифференцировку эпителия, но они менее токсичны, чем высокие дозы самого витамина А. Эти аналоги, в том числе и 13-*цис*-ретиноевая кислота, оказались полезными при лечении угрей и стали доступными для пациентов под названием аккутан в 1982 г. Поскольку вредное действие больших доз витамина А и его аналогов на беременных самок разных видов животных было известно с 1950-х гг. (Cohlan, 1953; Giroud, Martinet, 1959; Kochhar et al., 1984), этикетка на лекарстве предупреждала, что им не должны пользоваться беременные женщины. Однако около 160 000 женщин в детородном возрасте (от 15 до 45 лет) все же пользовались им со времени его введения в медицинскую практику, а некоторые пользовались им и во время беременности. Ламмер и его коллеги (Lammer et al., 1985) изучили группу женщин, которые по небрежности пользовались РК и тем не менее решили сохранить беременность. Из 59 плодов 26 родились без заметных дефектов, 12 были спонтанно абортированы и 21 родились с явными уродствами. Эти дети имели характерный набор аномалий — отсутствие ушей или их дефекты, отсутствие или уменьшение челюстей, расщепленное нёбо, аномальную артериальную дугу, неполноценный тимус и аномалии ЦНС.

Такой характер множественных врожденных аномалий сходен с наблюдавшимися у зародышей крыс и мышей, матери которых во время беременности

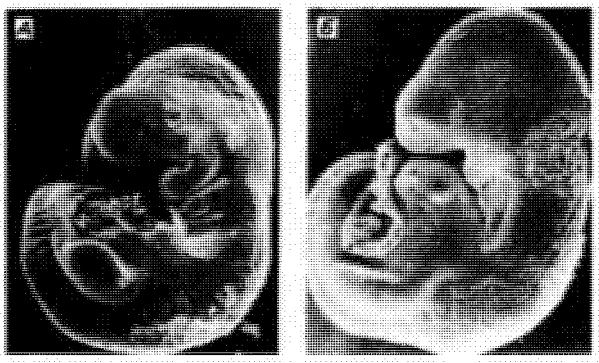


Рис. 5.40. Результаты культивирования 8-дневного зародыша мыши в течение 48 ч в контрольной среде (*А*) и в среде, содержащей $2 \cdot 10^{-6}$ М 13-*цис*-ретиноевой кислоты (*Б*). Первая жаберная дуга у зародыша, подвергавшегося воздействию этого вещества, короче и более плоская, чем у контрольного зародыша, и слилась со второй жаберной дугой. Фотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Из Goulding, Pratt, 1986; фотографии с любезного разрешения авторов.)

получали с пищей этот препарат. Следовательно, существуют модели с использованием животных, на которых мы можем изучать болезни человека. На животных можно проводить эксперименты, чтобы помочь исследователям выяснить механизмы действия тератогенов. Были поставлены опыты (Goulding, Pratt, 1986), в которых 8-дневных мышиных зародышей помещали в раствор, содержащий РК в очень низкой концентрации ($2 \cdot 10^{-9}$ М). Даже при этой концентрации примерно у $^1/_3$ зародышей развивались специфические аномалии, включая резкую редукцию размеров первой и второй жаберных дуг (рис. 5.40). Первая дуга обычно участвует в образовании верхне- и нижнечелюстной костей и двух косточек среднего уха, тогда как вторая дуга формирует третью косточку среднего уха, а также другие лицевые кости.

В основе этого явления, по-видимому, лежит тот факт, что препарат подавляет миграцию клеток из краниального отдела нервного гребня. У зародышей млекопитающих эти клетки мигрируют раньше, чем замкнется нервная трубка (Tan, Morriss-Kay, 1985); они дают начало мезенхимным клеткам скелета лица (Johnston, 1975), многие их потомки станут хрящевыми клетками. Клетки нервного гребня, мигрирующие на уровне переднего и среднего мозга, участвуют в образовании носовых отростков, нёба и мезенхимы первой жаберной дуги (рис. 5.41). Клетки нервного гребня, расположенные над передним отделом заднего мозга, образуют мезенхиму второй жаберной дуги, а клетки шейного отдела нервного гребня дают начало мезенхиме третьей, четвертой и шестой жаберных дуг. Ретиноевая кислота, меченная радиоактивными предшественниками, связывается с клетками краниальной области нервного гребня и останавливает их пролиферацию и миграцию (Johnston et al., 1985; Goulding, Pratt, 1986). Связывание с РК является, по-видимому, специфическим свойством этих клеток, а тератогенный эффект препарата приурочен к специфическому периоду развития (8—10 сут беременности у мыши, 20—35 сут — у человека). Модели тератогенеза с использованием животных оказались чрезвычайно полезными для выяснения механизмов тератогенеза на клеточном уровне. В настоящее время усилия исследователей сосредоточены на изучении молекулярных механизмов влияния этого препарата на клетки краниального отдела нервного гребня.

До 1961 г. было очень мало данных об уродствах у человека, вызванных лекарственными препаратами. Однако затем два исследователя независимо друг от друга (McBride, 1961; Lenz, 1962) собрали данные, свидетельствующие о том, что очень слабый транквилизатор талидомид индуцирует появление в большом числе случаев ранее очень редко встречавшегося синдрома врожденных уродств. Наиболее заметной аномалией является **фокомелия** — состояние, при котором длинные кости конечностей либо отсутствуют (амелия), либо очень резко редуцированы (меромелия), и в результате образуются конечности, напоминающие плавники тюленя (рис. 5.42). Свыше 7 000 уродливых детей родилось у жен-

Рис. 5.41. Миграция клеток нервного гребня в голове зародыша крысы, у которого частично удалена латеральная эктодерма. Можно видеть мигрирующие клетки нервного гребня над средним мозгом, а также столбик клеток нервного гребня, мигрирующих в будущую первую жаберную дугу. Фотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Из Tan, Morriss-Kay, 1985; фотография с любезного разрешения S.-S. Tan.)

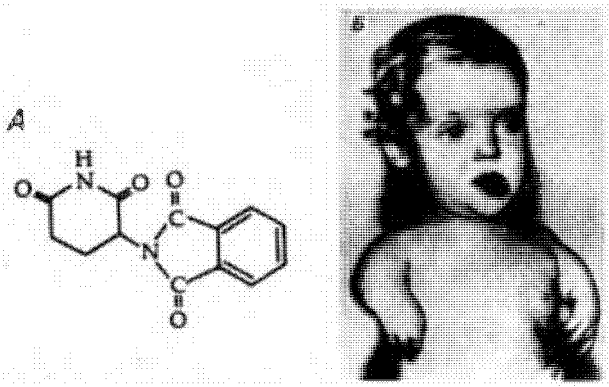


Рис. 5.42. Структура талидомида и его тератогенный эффект. *А*. Химическая структура талидомида. *Б*. Фокомелия у новорожденного младенца, мать которого принимала талидомид в течение двух первых месяцев беременности. (Фотография любезно предоставлена W. Scott.)

шин, принимавших талидомид. Достаточно было одной таблетки, чтобы родился ребенок со всеми четырьмя деформированными конечностями (Toms, 1962; Lenz, 1966). К другим аномалиям, вызванным применением талидомида, относятся различные пороки развития сердца, отсутствие ушных раковин, деформированный кишечник.

Новак (Nowack, 1965) определил **период чувствительности**, в течение которого талидомид вызывает эти аномалии. Он обнаружил, что лекарство является тератогенным только в период от 34 до 50 сут после последней менструации (примерно от 20 до 36 сут после зачатия). Специфичность действия талидомида показана на рис. 5.43. При применении между 34 и 38 сут он не индуцирует развития дефектных конечностей, но может приводить к редукции или отсутствию компонентов уха. Аномалии верхних конечностей наблюдались при более раннем приеме талидомида, чем аномалии нижних, поскольку в процессе развития руки формируются несколько раньше ног.

Трагедия с талидомидом показала, что возможности моделей с использованием животных не безграничны при определении потенциальных тератогенных воздействий тех или иных лекарственных препаратов. У различных видов животных (и разных линий одного вида) талидомид по-разному включается в обмен. Беременные мыши и крысы, обычно используемые для тестирования таких препаратов, не дали уродливого потомства при скармливании им талидомида. У кроликов родилось несколько уродливых крольчат, но дефекты развития отличались от наблюдавшихся у пораженных талидомидом человеческих детенышей. У приматов, таких, как мартышки, чувствительность к талидомиду была сходна с чувствительностью к нему человека, поэтому пораженные плоды мартышек использовали для выяснения вопроса о том, каким путем талидомид вызывает нарушения развития. Было показано (McBride, Vardy, 1983), что наиболее заметные различия до момента образования уродливых конечностей касаются размеров ганглиев дорсальных корешков и их нейронов. Число нейронов в этих ганглиях заметно редуцировано (рис. 5.44). Авторы предположили, что нейроны ганглиев спинных корешков необходимы для поддержания развития конечностей и что действие талидомида заключается в повреждении или разрушении этих ацетилхолинергических нейронов. Молекулярный механизм такого избирательного действия талидомида все еще неизвестен, но имеющаяся модель для его изучения на животных должна привести к более глубокому знанию.

В настоящее время известно свыше 50 000 искусственных химических веществ, которые находят практическое применение, и примерно от 200 до 500 новых материалов появляются каждый год (Johnson, 1980). Проблема оценки тератогенного эффекта этих веществ чрезвычайно важна, а стандартные средства для такой проверки очень дороги, процедура проверки весьма длительная, и ее результаты зависят от межвидовых различий в метаболизме животных. Пока еще нет единого мнения по вопросу о том, как следует испытывать тератогенность веществ для зародышей человека. Тератогены всегда сопровождали нас. Известно, что некоторые металлы и растительные продукты вызывают тяжелые аномалии развития. Однако, поскольку мы производим и потребляем все больше и больше разнообразных веществ, мы тем самым подвергаем наших будущих детей все большему риску.

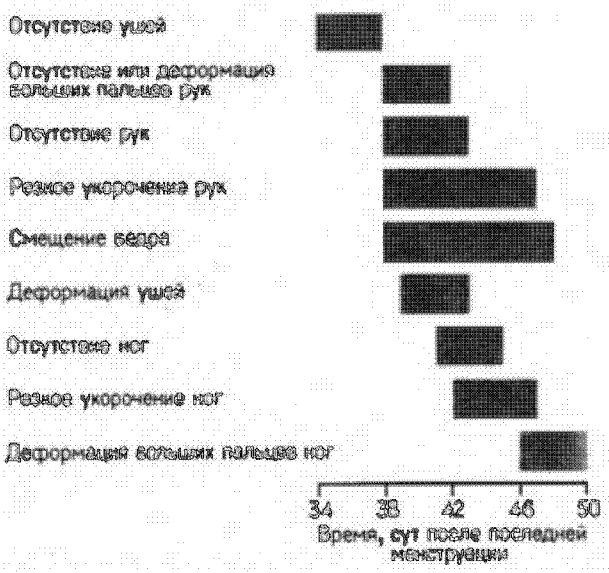
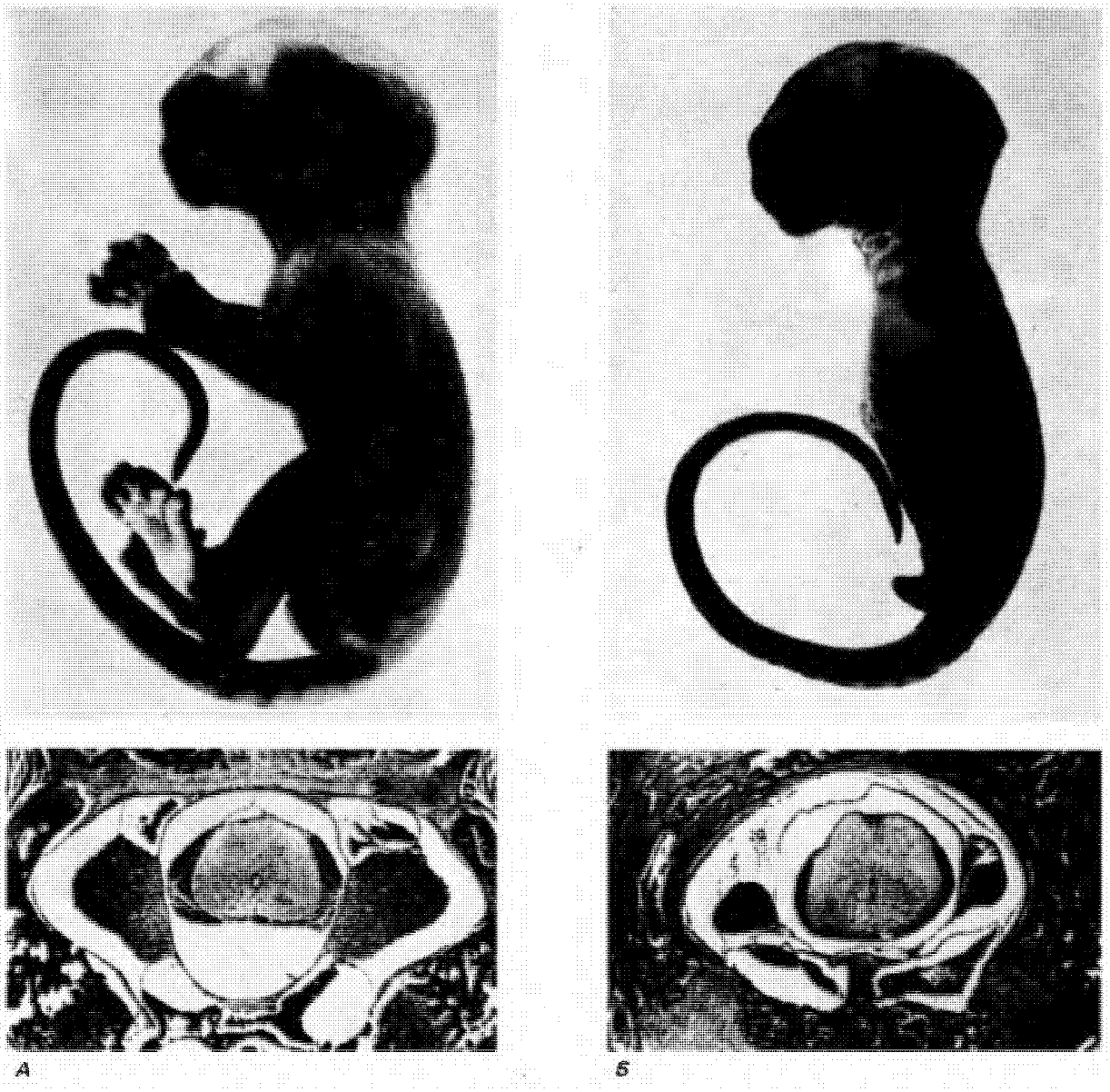


Рис. 5.43. Изменение чувствительности к тератогенному действию талидомида у раннего зародыша человека. (По Nowack, 1965.)



А *Б*

Рис. 5.44. Действие талидомида на плод мартышки. Фотографии в верхнем ряду показывают фенотип плода мартышки на поздних сроках беременности. В нижнем ряду — поперечные срезы через спинной мозг на уровне передних конечностей. *А*. Плод контрольной мартышки. *Б*. Плод мартышки, подвергшейся воздействию талидомида в дозе 25 мг/кг массы в период между 38 и 46 сут беременности. (Из McBride, Vardy, 1983; фотографии с любезного разрешения W. G. McBride.)

РЕЗЮМЕ

В этой главе мы рассмотрели дифференцировку эктодермы зародыша в процессе ее преобразования в различные ткани. Мы узнали, что в период нейруляции она дает начало трем наборам клеток: 1) клеткам нервной трубки, которые в процессе развития превращаются в нейроны, глию и эпендимные клетки центральной нервной системы; 2) клеткам нервного гребня, образующим в дальнейшем периферическую нервную систему, пигментные клетки, мозговое вещество надпочечников, некоторые хрящи головы, и 3) клеткам эпидермиса кожи, участвующим позднее в формировании кожных структур, таких,

как волосы, перья, чешуя, потовые и сальные железы. Мы также рассмотрели взаимодействия между клетками — производными эктодермы, приводящие к образованию различных тканей глаза.

В последующих главах мы более подробно обсудим индукцию нервной трубки, координированное развитие глаза и способ, которым нейроны получают указания, как достигнуть предназначенных им мест и обеспечить этим развитие рефлексов и разных типов поведения. Однако прежде следует познакомиться с развитием производных двух других зародышевых листков — энтодермы и мезодермы.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

Anderson D. J., Axel R. (1987). A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. Cell **47**, 1079—1090.

Balinsky B. I. (1975). Introduction to Embryology, 4th Ed. Saunders, Philadelphia.

Barde Y. A., Edgar D., Thoenen H. (1982). Purification of a new neurotophic factor from mammalian brain. EMBO J. **1**, 549—553.

Berry M., McConnell P., Sievers J. (1980). Dendritic growth and the control of neuronal form. Curr. Top. Dev. Biol. **15**, 67—101.

Binns W., James L. F., Shupe J. L. (1964). Toxicosis of *Veratrum californicum* in ewes and its relationship to a congenital deformity in lambs. Ann. N.Y. Acad. Sci. **111**, 571—576.

Bloom W., Fawcett D. W. (1975). Textbook of Histology, 10th Ed. Saunders, Philadelphia.

Bockman D. E., Kirby M. L. (1984). Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. Science **223**, 498—500.

Boué A., Boué J., Gropp A. (1985). Cytogenetics of pregnancy wastage. Adv. Hum. Genet. **14**, 1—57.

Bronner-Fraser M. (1986a). Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. Dev. Biol. **115**, 44—55.

Bronner-Fraser M. (1986b). An antibody to a receptor for fibronectin and laminin perturbs cranial neural crest development *in vivo*. Dev. Biol. **117**, 528—536.

Bronner-Fraser M., Cohen A. M. (1980). Analysis of the neural crest ventral pathway using injected tracer cells. Dev. Biol. **77**, 130—141.

Burnside B. (1971). Microtubules and microfilaments in newt neurulation. Dev. Biol. **26**, 416—441.

Burnside B. (1973). Microtubules and microfilaments in amphibian neurulation. Am. Zool. **13**, 989—1006.

Chun L. L. Y., Patterson P. H. (1977). Role of nerve growth factor in development of rat sympathetic neurons *in vitro*. Survival, growth, and differentiation of catecholamine production. J. Cell Biol. **75**, 694—704.

Cohlan S. Q. (1953). Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. Science **117**, 535—537.

Coulombe J. N., Bronner-Fraser M. (1987). Cholinergic neurones acquire adrenergic neurotransmitters when transplanted into an embryo. Nature **324**, 569—572.

Coulombre A. J. (1956). The role of intraocular pressure in the development of the chick eye. I. Control of eye size. J. Exp. Zool. **133**, 211—225.

Coulombre A. J. (1965). The eye. In: R. DeHaan and H. Ursprung (eds.), Organogenesis. Holt, Rinehart & Winston, New York, pp. 217—251.

Crelin E. S. (1974). Development of the central nervous system: A logical approach to neuroanatomy. Ciba Clin. Symp. **26(2)**, 2—32.

Desmond M. E. (1982). A description of the occlusion of the lumen of the spinal cord in early human embryos. Anat. Rec. **204**, 89—93.

Desmond M. E., Schoenwolf G. C. (1986). Evaluation of the roles of intrinsic and extrinsic factors in occlusion of the spinal neurocoel during rapid brain enlargement in the chick embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. **97**, 25—46.

Detwiler S. R. (1932). Experimental observations upon the developing retina. J. Comp. Neurol. **55**, 473—492.

Detwiler S. R. (1937). Observation upon the migration of neural crest cells and upon the development of the spinal ganglia and vertebral arches in *Ambystoma*. Am. J. Anat. **61**, 63—94.

Edmonds D. K., Lindsay K. S., Miller J. F., Williamson E., Wood P. J. (1982). Early embryonic mortality in women. Fertil. Steril. **38**, 447—453.

Erickson C. A., Tosney K. W., Weston J. A. (1980). Analysis of migrating behaviour of neural crest and fibroblastic cells in embryonic tissues. Dev. Biol. **77**, 142—156.

Fesenko E. E., Kolenikov S. S., Lyubarsky A. L. (1985). Induction by cyclic GMP of cationic conduction in plasma membranes of retinal rod outer segment. Nature **313**, 310—313.

Fujita S. (1964). Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. J. Comp. Neurol. **122**, 311—328.

Fujita S. (1966). Application of light and electron microscopy to the study of the cytogenesis of the forebrain. In: R. Hassler and H. Stephen (eds.), Evolution of the Forebrain. Plenum, New York, pp. 180—196.

Fukada K. (1980). Hormonal control of neurotransmitter choice in sympathetic neuron cultures. Nature **287**, 553—555.

Fukada K. (1985). Purification and partial characterization of a cholinergic neuronal differentiation factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 8795—8799.

Gallera J. (1971). Primary induction in birds. Adv. Morphog. **9**, 149—180.

Giroud A., Martinet M. (1959). Teratogenese par hypervitaminose A chez le rat, la souris, le cobaye, et le lapin. Arch. Fr. Pediat. **16**, 971—980.

Goldowitz D., Mullen R. J. (1982). Granule cell as a site of gene action in the *weaver* mouse cerebellum: Evidence from heterozygous mutant chimera. J. Neurosci. **2**, 1474—1485.

Gould S. J. (1977). Ontogeny and Phylogeny. Havard University Press, Cambridge, Mass.

Goulding E. H., Pratt R. M. (1986). Isotretinoin teratogenecity in mouse whole embryo culture. J. Craniofac. Genet. Dev. Biol. **6**, 99—112.

Gregg N. M. (1941). Congenital cataract following German measles in the mother. Trans. Opthalmol. Soc. Aust. **3**, 35.

Halprin K. M. (1972). Epidermal "turnover time" — a reexamination. J. Invest. Dermatol. **86**, 14—19.

Harrison R. G. (1907). Observations on the living developing nerve fiber. Anat. Rec. **1**, 116—118.

Harrison R. G. (1910). The outgrowth of a nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. J. Exp. Zool. **9**, 787—846.

Hatten M. E., Liem R. K. H., Mason C. A. (1986). *Weaver* mouse cerebellar granule neurons fail to migrate on wild-type processes *in vitro*. J. Neurosci. **6**, 2676—2683.

Hertig A. T., Rock J. (1949). A series of potentially abortive ova recovered from fertile women prior to the first missed menstrual period. Am. J. Obstet. Gynecol. **58**, 968—993.

Hilfer S. R., Yang J.-J. W. (1980). Accumulation of CPC-precipitable material at apical cell surfaces during formation of the optic cup. Anat. Rec. **197**, 423—433.

His W. (1886). Zur Geschichte des menschlichen Rückenmarks und der Nervenwurzeln. Ges. d. Wissensch. BD 13. S. 477.

Holmes L. B. (1979). Radiation. In: V. C. Vaughan, R. J. McKay and R. D. Behrman (eds.), Nelson Textbook of Pediatrics, 11th Ed. Saunders, Philadelphia.

Holt A. B., Cheek D. B., Mellitz E. D., Hill D. E. (1975). Brain

size and the relation of the primate to the non-primate. In: D. B. Cheek (ed.), Fetal and Postnatal Cellular Growth: Hormones and Nutrition. Wiley, New York, pp. 23—44.
Huettner A. F. (1949). Fundamental of Comparative Embryology of the Vertebrates, 2nd Ed. Macmillan, New York.
Jacobson M. (1968). Cessation of DNA synthesis in retinal ganglion cells correlated with the time of specification of their central connections. Dev. Biol. **17**, 219—232.
Jacobson M. (1978). Developmental Neurobiology. Plenum, New York.
Johnson E. M. (1980). Screening for teratogenic potential: Are we asking the proper questions? Teratology **21**, 259.
Johnston M. C. (1975). The neural crest in abnormalities of the face and brain. In: D. Bergsma (ed.), Morphogenesis and Malformation of the Face and Brain. Alan R. Liss, New York, pp. 1—18.
Johnston M. C., Sulik K. K., Webster W. S., Jarvis B. L. (1985). Isotretinoin embryopathy in a mouse model: Cranial neural crest involvement. Teratology **31**, 26A.
Kahn C. R., Coyle J. T., Cohen A. M. (1980). Head and trunk neural cresfif5Aono differentiation. Dev. Biol. **77**, 340—348.
Karfunkel P. (1972). The activity of microtubules and microfilaments in neurulation in the chick. J. Exp. Zool. **181**, 289—302.
Kochhar D. M., Penner J. D., Tellone C. I. (1984). Comparative teratogenic activities of two retinoids: Effects on palate and limb development. Terat. Carcin. Mutagen **4**, 377—387.
Kulikauskas V., Blaustein A. B., Ablin R. J. (1985). Cigarette smoking and its possible effects on sperm. Fertil. Steril. **44**, 526—528.
Lammer E. J. and eleven others. (1985). Retinoic acid embryopathy. N. Engl. J. Med. **313**, 837—841.
Langman J. (1969). Medical Embryology, 3rd Ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
LeDouarin N. (1986). Cell line segregation during peripheral nervous system ontogeny. Nature **231**, 1515—1522.
LeDouarin N. M., Cochard P., Vincent M., Duband J. L., Tucker G. C., Teillet M.-A., Thiery J.-P. (1984). Nuclear, cytoplasmic, and membrane markers to follow neural crest cell migration. A comparative study. In: R. L. Trelstad (ed.), The Role of the Extracellular Matrix in Development. Alan R. Liss, New York, pp. 373—398.
LeDouarin N. M., Renaud D., Teillet M.-A., LeDouarin G. H. (1975). Cholinergic differentiation of presumptive adrenergic neuroblast in interspecific chimeras after heterotopic transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 728—732.
Lehmann F. (1927). Further studies on the morphogenetic role of the somites in the development of the nervous system of amphibians. The differentiation and arrangement of the spinal ganglia in *Pleurodeles waltli*. J. Exp. Zool. **49**, 93—131.
Lenz W. (1962). Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet I: 45. (First reported at a 1961 symposium).
Lenz W. (1966). Malformation caused by drugs in pregnancy. Am. J. Dis. Child. **112**, 99—106.
Letourneau P. C. (1977). Regulation of neuronal morphogenesis by cell—substratum adhesion. Soc. Neurosci. Symp. **2**, 67—81.
Letourneau P. C. (1979). Cell substratum adhesion of neurite growth cones, and its role in neurite elongation. Exp. Cell Res. **124**, 127—138.
Loring J. F., Erickson C. A. (1987). Neural crest cell migratory pathways in the trunk of the chick embryo. Dev. Biol. **121**, 220—236.
Mann I. (1964). The Development of the Human Eye. Grune and Stratton, New York.
Mayer B. W., Jr., Hay E. D., Hynes R. O. (1981). Immunocytochemical localization of fibronectin in embryonic chick trunk and area vasculosa. Dev. Biol. **82**, 267—286.
McBride W. G. (1961). Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet ii: 1358.
McBride W. G., Vardy P. H. (1983). Pathogenesis of thalidomide teratogenesis in the marmot (*Callithrix jacchus*): Evidence suggesting a possible trophic influence of cholinergic nerves in limb morphogenesis. Dev., Growth Differ. **25**, 361—373.
McKeown T. (1976). Human malformations: An introduction. Br. Med. Bull. **32**, 1—3.
Meier S. (1981). Development of the chick embryo mesoblast: Morphogenesis of the prechordal plate and cranial segments. Dev. Biol. **83**, 49—61.
Mikamo K. (1970). Anatomical and chromosomal anomalies in spontaneous abortions. Am. J. Obstet. Gynecol. **103**, 143—154.
Miller J. R., Poland B. J. (1970). The value of human abortuses in the surveillance of developmental anomalies. Can. Med. Assoc. J. **103**, 501—502.
Montagna W., Parakkal P. F. (1974). The piliary apparatus. In: W. Montagna (ed.), The Structure and Formation of Skin. Academic, New York, pp. 172—258.
Nagele R. G., Lee H. Y. (1980). Studies on the mechanism or neurulation in the chick: Microfilament-mediated changes in cell shape during uplifting of neural folds. J. Exp. Zool. **213**, 391—398.
Newgreen D. F., Scheel M., Kaster V. (1986). Morphogenesis of sclerotome and neural crest cells in avian embryos. *In vivo* and *in vitro* studies on the role of notochordal extracellular material. Cell Tissue Res. **244**, 299—313.
Noden D. M. (1978). The control of avian cephalic neural crest cytodifferentiation. I. Skeletal and connective tissue. Dev. Biol. **69**, 296—312.
Nowack E. (1965). Die sensible Phase bei der Thalidomide-Embryopathie. Humangenetik **1**, 516—536.
Odell G. M., Oster G., Alberch P., Burnside B. (1981). The mechanical basis of morphogenesis. I. Epithelial folding and invagination. Dev. Biol. **85**, 446—462.
Papaconstantinou J. (1967). Molecular aspects of lens cell differentiation. Science **156**, 338—346.
Paton D., Craig J. A. (1974). Cataracts: Development, diagnosis, and management. Ciba Clin. Symp. **26(3)**, 2—32.
Patten B. M. (1971). Early Embryology of the Chick, 5th Ed. McGraw-Hill, New York.
Piatigorsky J. (1981). Lens differentiation in vertebrates: A review of cellular and molecular features. Differentiation **19**, 134—153.
Portmann A. (1941). Die Tragzeiten der Primaten und die Dauer der Schwangerschaft beim Menschen: Ein Problem der vergleichen Biologie. Rev. Suisse Zool. **48**, 511—518.
Portmann A. (1945). Die Ontogenese des Menschen als Problem der Evolutionsforschung. Verh. Schweiz. Naturf. Ges. **125**, 44—53.
Pratt R. M., Larsen M. A., Johnston M. C. (1975). Migration of cranial neural crest cells in a cell-free, hyaluronate-rich matrix. Dev. Biol. **44**, 298—305.
Rakić P., Goldman P. S. (1982). Development and modifiability of the cerebral cortex. Neurosci. Rev. **20**, 429—611.
Rakić P., Sidman R. L. (1973). Weaver mutant mouse cerebellum: Defective neuronal migration secondary to abnormality of Bergmann glia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**, 240—244.
Ramón y Cajal S. (1908). Sur l'origene et les ramifications des fibres neuveuses de la moelle embryonnaire. Anat. Anz. **5**, 111—119.
Rickman M., Fawcett J. W., Keynes R. J. (1985). The migration of neural crest cells and the growth of motor neurons through the rostral half of the chick somite. J. Embryol. Exp. Morphol. **90**, 437—455.
Romanes G. J. (1901). Darwin and After Darwin. Open Court Publishing, London.

Romer A. S. (1976). The Vertebrate Body, 5th Ed. Saunders, Philadelphia.

Rosavio R. A., Delouvee A., Yamada K. M., Timpl R., Thiery J.-P. (1983). Neural crest cell migration: Requirements for exogenous fibronectin and high cell density. J. Cell Biol. **96**, 462—473.

Sadler T. W., Burridge K., Yonker J. (1986). A potential for spectrin during neurulation. J. Embryol. Exp. Morphol. **94**, 73—82.

Samer F. C. (1935). Mitosis in the neural tube. J. Comp. Neurol. **62**, 377—405.

Schoenwolf G. C., Desmond N. E. (1984). Descriptive studies of the occlusion and reopening of the spinal canal of the early chick embryo. Anat. Rec. **209**, 251—263.

Schweizer G., Ayer-Le Lievre C., LeDouarin N. M. (1983). Restrictions in developmental capacities in the dorsal root ganglia during the course of development. Cell Differ. **13**, 191—200.

Sidman R. L. (1974). Cell—cell recognition in the central nervous system. In: F. O. Schmitt and F. G. Worden (eds.), The Neurosciences: Third Study Program. M. I. T. Press, Cambridge, Mass., pp. 743—758.

Soleto C., Changeaux J. P. (1974). Transsynaptic degeneration "en cascade" in the cerebellar cortex of *staggerer* mutant mice. Brain Res. **67**, 519—526.

Solursh M., Fisher J., Singley C. T. (1979). The synthesis of hyaluronic acid by ectoderm during early organogenesis in the chick embryo. Differentiation **14**, 77—85.

Stryer L. (1986). Cyclic GMP cascade of vision. Annu. Rev. Neurosci. **9**, 87—119.

Tan S.-S., Morriss-Kay G. (1985). The development and distribution of the cranial neural crest in the rat embryo. Cell Tissue Res. **240**, 403—416.

Teillet M.-A., Kalcheim C., LeDouarin N. M. (1987). Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo: Segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells. Dev. Biol. **120**, 329—347.

Thiery J.-P., Duband J. L., Delouvee A. (1982). Pathways and mechanisms of avian trunk neural crest cell migration and localization. Dev. Biol. **93**, 324—343.

Toms D. A. (1962). Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet II, 400.

Turner D. L., Cepko C. L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. Nature **328**, 131—136.

von Baer K. E. (1828). Entwicklungsgeschichte der Thiere: Beobachtung und Reflexion. Bornträger, Konigsberg.

Warkany J. (1971). Congenital Malformations. Year Book Medical Publishers, Chicago.

Webster E. H., Silver A. F., Gonsalves N. I. (1984). The extracellular matrix between the optic vesicle and the presumptive lens during lens morphogenesis in an anopthalmic strain of mice. Dev. Biol. **103**, 142—150.

Weinstein G. D., van Scott E. J. (1965). Turnover times of normal and psoriatic epidermis. J. Invest. Dermatol. **45**, 257—262.

Weiss P. (1941). The mechanics of nerve growth. Third Growth Symposium. Growth 5 [Suppl.], 163—203.

Weston J. (1963). A radiographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick. Dev. Biol. **6**, 274—310.

Weston J. (1970). The migration and differentiation of neural crest cells. Adv. Morphog. **8**, 41—114.

Weston J. A., Butler S. L. (1966). Temporal factors affecting localization of neural crest cells in the chicken embryo. Dev. Biol. **14**, 246—266.

Yamada K. M., Spooner B. S., Wessells N. K. (1971). Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. J. Cell Biol. **49**, 614—635.

Глава 6

Раннее развитие позвоночных. Производные мезодермы и энтодермы, их органо- и гистогенез

Физиологию с головы и до пят я пою,
Не только лицо человеческое и не только рассудок достойны
Музы, но все Тело еще более достойно ее,
Женское наравне с Мужским я пою[1].

УОЛТ УИТМЕН (1867)

Теории приходят и уходят. Лягушка остается.

ЖАН РОСТАН (1960)

Введение

В предыдущей главе речь шла о разных производных эктодермы. В этой главе мы рассмотрим раннее развитие производных мезодермального и энтодермального зародышевых листков. Мы увидим, что энтодерма образует выстилку органов пищеварения и дыхания, а мезодерма — ткани и органы, расположенные между эктодермальной стенкой тела и энтодермальными органами.

МЕЗОДЕРМА

В мезодерме зародыша на стадии нейрулы можно различить пять областей (рис. 6.1). Первая из них дает начало **хорде**, провизорному органу, основные функции которого состоят в индукции нервной трубки и в установлении оси тела. Вторая область — **дорсальная (параксиальная) мезодерма**. Из этой мезодермы, локализованной по обе стороны нервной трубки и хорды, будут образовываться многие ткани тела — кости, хрящ, дерма и поперечнополосатая мускулатура. Третья область — **промежуточная мезодерма** (материал сегментных ножек). Из нее формируются органы выделения и протоки половых желез. (Мы будем более подробно говорить об этой области позднее, в других главах.) На большем расстоянии от материала хорды находится четвертая область — **несегментированная мезодерма боковых пластинок**, из которой развиваются сердце, кровеносные сосуды, клетки крови, гладкая мускулатура, выстилка полости тела (целома) и все мезодермальные компоненты конечностей, кроме поперечнополосатой мускулатуры. Боковые пластинки принимают также участие в формировании внезародышевых оболочек. Наконец, пятая область мезодермы — **мезенхима головы**.

Дорсальная мезодерма: дифференцировка сомитов

Одной из главных задач гаструляции является перемещение энтодермы глубоко внутрь зародыша и мезодермальных клеток между слоями эктодермы и энтодермы. Мезодермальные и энтодермальные органы формируются не после образования нервной трубки, а одновременно с ней (рис. 6.2). У куриного зародыша мезодермальные клетки, не участвующие в формировании хорды, мигрируют латерально, образуя толстые полосы, идущие продольно вдоль каждой стороны хорды и нервной трубки. Эти полосы **дорсальной (параксиальной) мезодермы** называют у птиц **сегментной пластинкой**, а у млекопитающих — **несегментированной мезодермой**. Когда первичная полоска претерпевает регрессию, а нервные валики в центральной части зародыша начинают сближать-

[1] Перевод с англ. К. Чуковского — В кн.: Уолт Уитмен. Листья травы. — с. 37, М.: Художественная литература, 1982, с. 495.

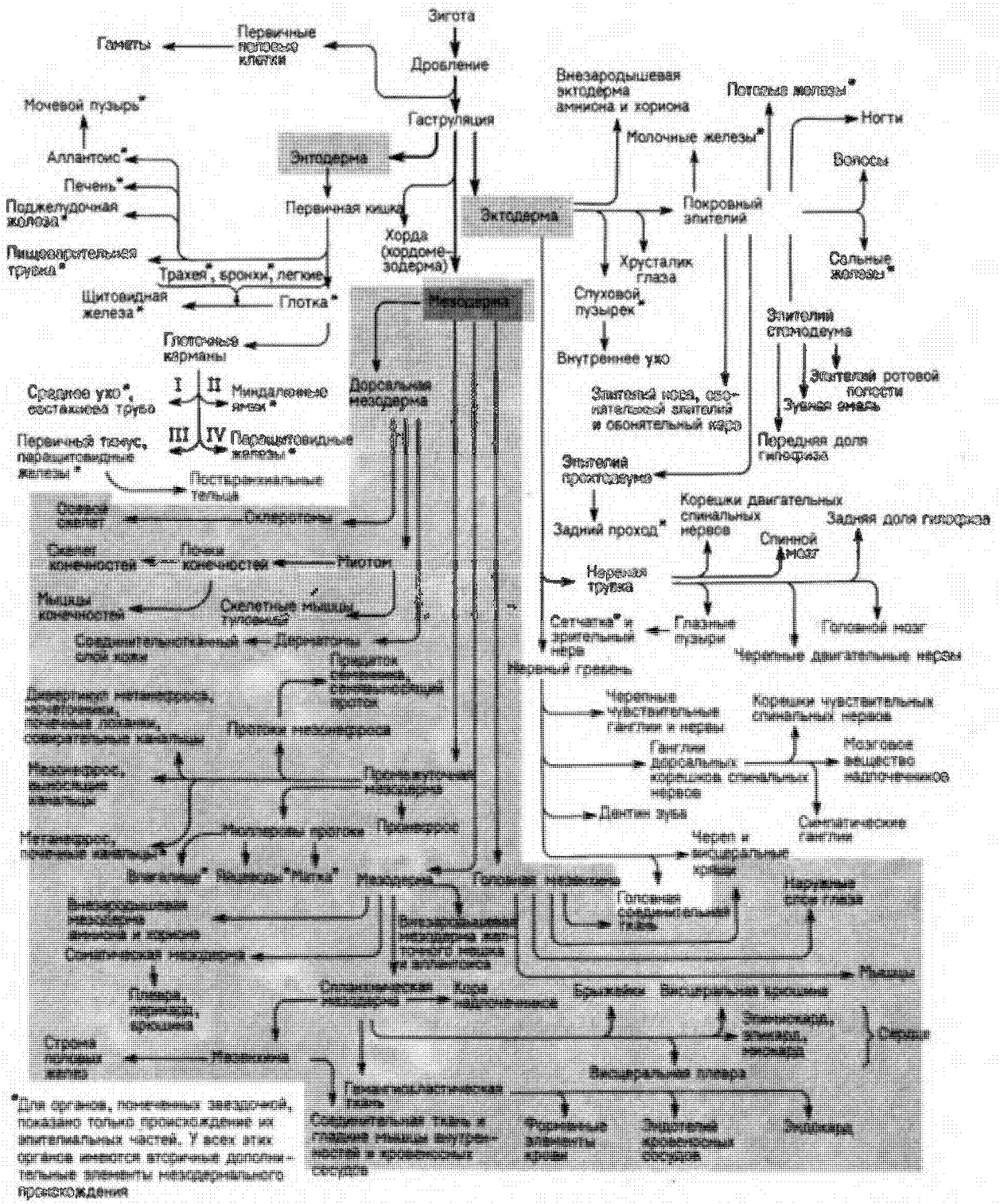


Рис. 6.1. Схема, показывающая происхождение специализированных частей тела из трех первичных зародышевых листков. Половые клетки представлены в виде линии клеток, обособленной от остальных клеток, происходящих из трех зародышевых листков; объясняется это тем, что, хотя предшественники половых клеток и локализованы в энтодерме или мезодерме, их, по-видимому, следует отнести к уникальному клеточному типу. (По Carlson, 1981).

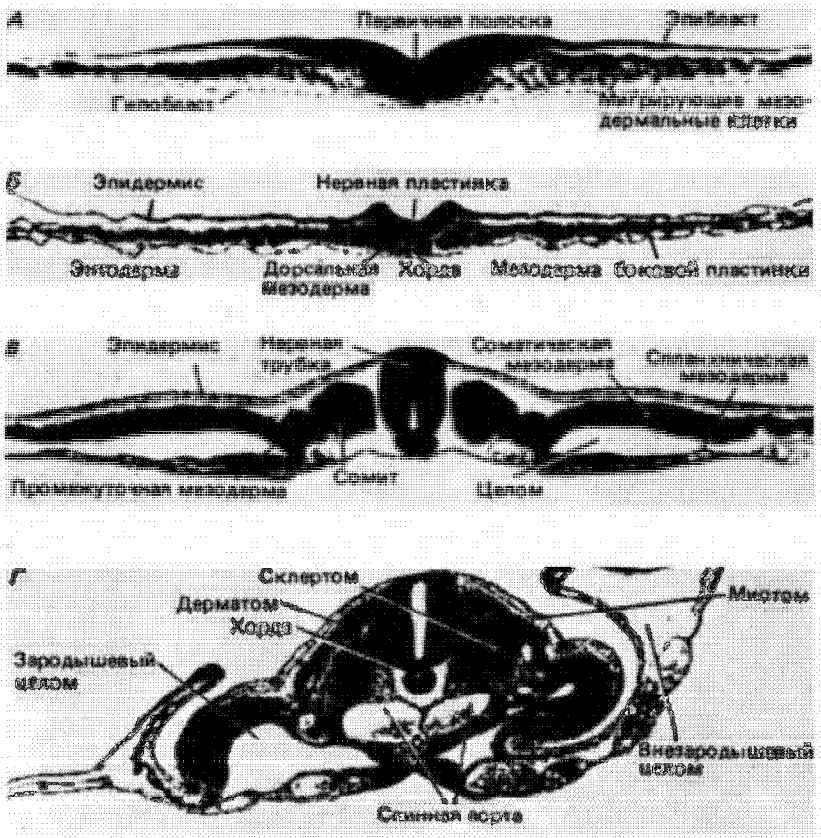


Рис. 6.2. Последовательные стадии развития куриного зародыша (основное внимание уделено мезодерме). *А*. Область первичной полоски; видна миграция клеток-предшественников мезодермы и энтодермы. *Б*. Образование хорды и дорсальной мезодермы. *В, Г*. Дифференцировка сомитов, целома и двух аорт (которые впоследствии сольются в одну). *А, Б, В* — 24 ч инкубации; *Г* — 48 ч инкубации.

са, параксиальная мезодерма постепенно разделяется на треугольные блоки клеток, называемые **сомитами.** Первые сомиты появляются в переднем отделе зародыша, новые сомиты формируются позади них через равные интервалы времени (рис. 6.2, *Г* и 6.3). Поскольку при слегка различных температурах инкубации зародыши развиваются с разными скоростями, число имеющихся сомитов служит обычно наилучшим показателем того, насколько далеко продвинулось развитие. Конечное число сомитов является видоспецифичным признаком.

Механизм образования сомитов не вполне выяснен, но недавние исследования на куриных зародышах показали, что образующие их клетки сегментной пластинки организуются в виде розеток, называемых **сомитомерами** (Meier, 1979). В сегментной пластинке куриного зародыша постоянно видны от 10 до 11 пар сомитомеров, которые затем становятся сомитами (Packard, Meier, 1983). Превращение сомитомера в сомит можно наблюдать тогда, когда клетки самого переднего сомитомера становятся плотно упакованными. Было высказано предположение (Lash, Yamada, 1986), что в процессе упаковки клеток сомитомера участвует фибронектин. В основе этой гипотезы лежат два ряда данных. Во-первых (Ostrovsky et al., 1984), количество фибронектина в передней области презумптивного сомита увеличивается одновременно с началом уплотнения клеток переднего края этой ткани. Во-вторых (Lash et al., 1984; Cheney, Lash, 1984), in vitro было обнаружено, что диссоциированные клетки передних участков сегментной пластинки (которые уже имели оформленные сомиты) легко реагрегируют в скопления, по размерам равные сомитам. Диссоциированные клетки из задних участков сегментной пластинки (в которых еще не образовались сомиты) не реагрегируют с такой же легкостью. Это показывает, что мезодермальные клетки становятся более адгезивными по мере того, как они приобретают способность формировать сомиты. Клетки задних отделов можно индуцировать к образованию сомитоподобных скоплений, добавляя фибронектин к культуральной жидкости, в которой происходила их реагрегация.

По мере того как сомит становится когерентным образованием, т. е. совокупностью сцепленных друг с другом клеток, его клетки приобретают характер эпителиальных, а клетки наружного слоя соседних сомитов соединяются между собой плотными контактами. Вокруг сомита, так же как вокруг хорды и нервной трубки, образуется **базальная мембрана** (рис. 6.4; см. также рис. 5.36), состоящая из коллагена, фибронектина, ламинина и гликозаминоглика-

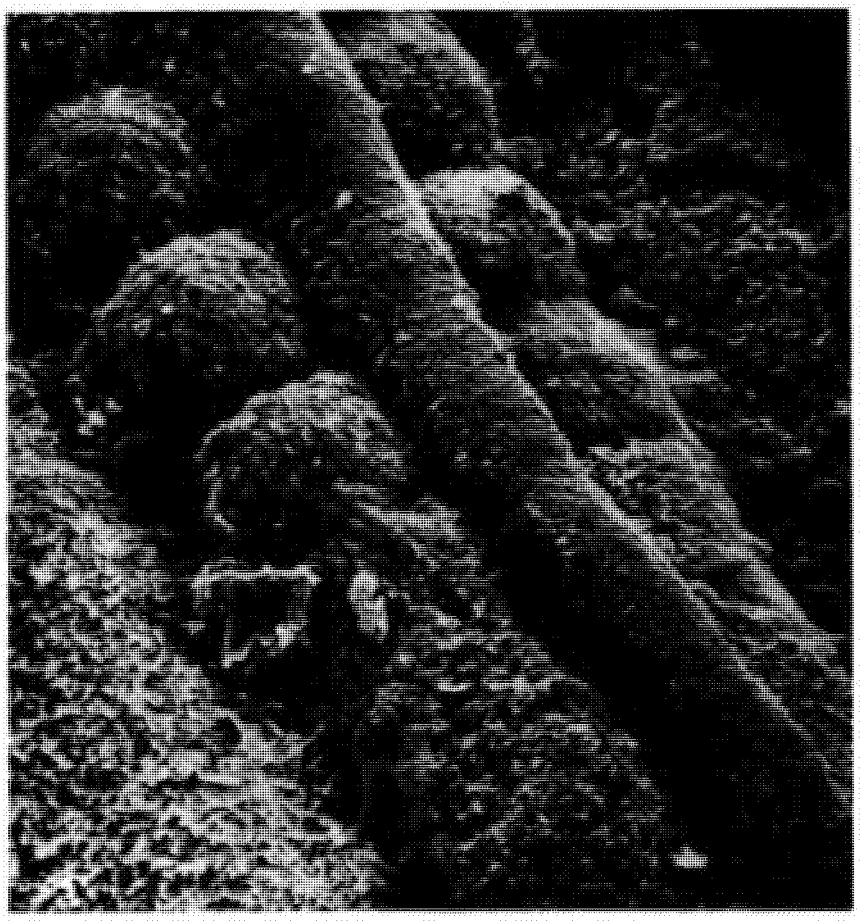


Рис. 6.3. Нервная трубка и сомиты (фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа). Видны хорошо сформированные сомиты и дорсальная мезодерма (*внизу справа*), которая еще не разделилась на отчетливо выраженные сомиты. Можно также видеть клетки нервного гребня, мигрирующие в вентральном направлении из крыши нервной трубки. (Фотография с любезного разрешения K. W. Tosney.)

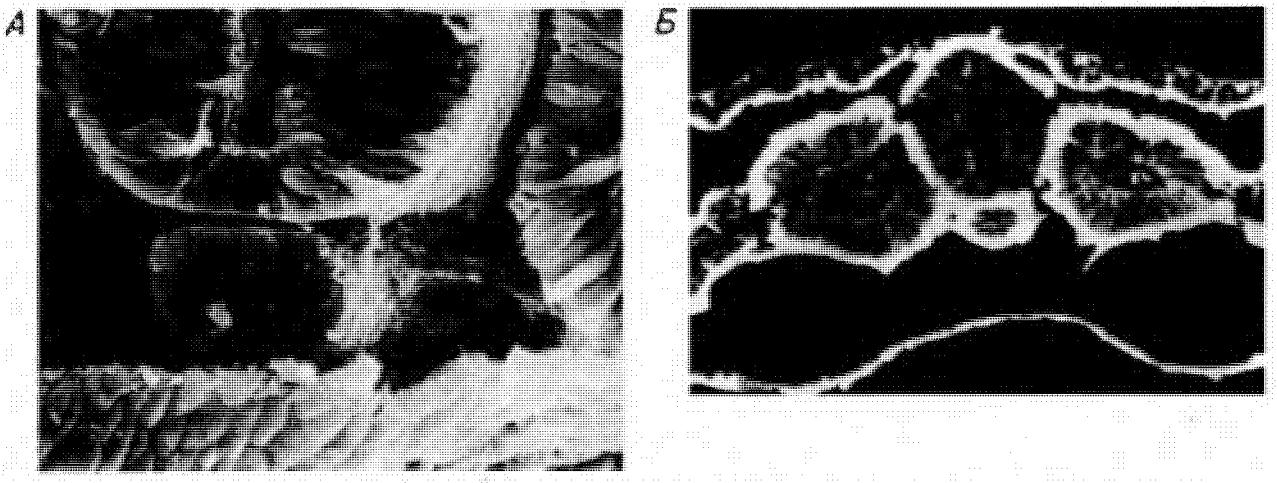


Рис. 6.4. Матрикс на поверхности сомитов и соседних тканей (фотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа). *А*. Края нервной трубки, хорда и сомитов соединены внеклеточным матриксом, образованным комплексом коллагена и гликозаминогликана и имеющим важное значение для миграции клеток и для межклеточных взаимодействий между этими структурами. *Б*. Локализация фибронектина на внеклеточной базальной мембране сомита и прилегающих тканях у 2-дневного куриного зародыша (окрашивание флуоресцирующими антителами против фибронектина). Такие мембраны, содержащие фибронектин, обнаруживаются только после того, как клетки сомитомеров конденсируются и становятся эпителиальными клетками сомитов. (Фотографии с любезного разрешения: *А* — K. W. Tosney; *Б* — J. Lash.)

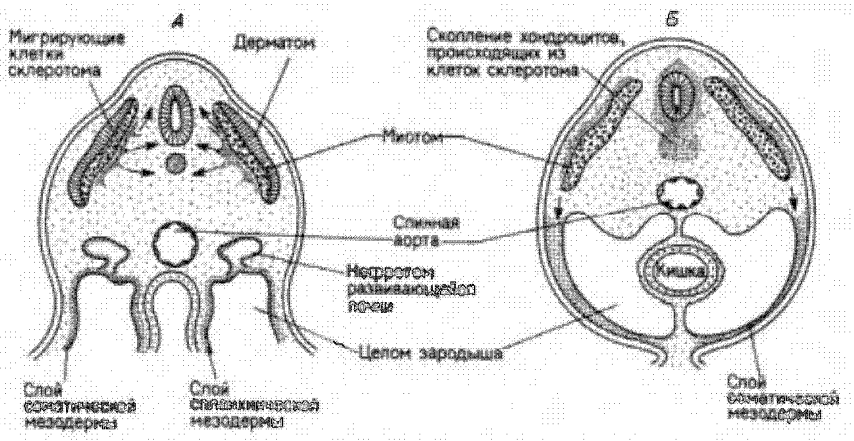


Рис. 6.5. Схематическое изображение поперечного среза через туловище зародыша человека в начале (*А*) и в конце (*Б*) четвертой недели развития. *А*. Клетки склеротома начинают мигрировать, удаляясь от миотома и дерматома. *Б*. К концу четвертой недели клетки склеротома конденсируются и образуют хрящевые позвонки, дерматом начинает формировать дерму, а клетки миотома распространяются вниз в вентральном направлении вдоль стенок тела зародыша. (По Langman, 1969.)

нов (ГАГ). По-видимому, ГАГ хорды и нервной трубки индуцируют в сомитах секрецию их собственных ГАГ. Если с помощью фермента удалить с поверхности хорды ГАГ, синтез ГАГ в сомитах прекращается до тех пор, пока на хорде заново не появится ГАГ. Под воздействием ГАГ или какого-то другого фактора, секретируемого либо хордой, либо нервной трубкой, *вентральные* клетки сомита (т. е. те, которые находятся дальше других от спинной стороны зародыша) начинают делиться митотически, теряют признаки, характерные для округлых эпителиальных клеток, и снова становятся мезенхимными клетками. Часть сомита, в которой образуются эти клетки, называют **склеротомом**; мезенхимные клетки в конечном счете становятся **хондроцитами** (рис. 6.2 и 6.5). Хондроциты ответственны за секрецию специфических типов коллагенов и гликозаминогликанов (таких, как хондроитинсульфат), характерных для хряща. Эти хондроциты участвуют в образовании осевого скелета (позвонков, ребер и т. д.).

После того как прекращается миграция клеток склеротома из сомита, оставшиеся эпителиальные клетки (совокупность которых называется **дермамиотомом**) формируют двуслойную плотную трубку (рис. 6.2 и 6.5). Наружный слой ее называется **дерматомом**; он дает начало мезенхимной соединительной ткани кожи — дерме, или кориуму. Внутренний слой называется **миотомом**; эти клетки образуют поперечнополосатые мышцы стенки тела и конечностей (Chevallier et al., 1977).

Миогенез: дифференцировка скелетной мышцы

Скелетная мышца образована пучками поперечнополосатых мышечных волокон — симпластов, развивающихся из многоядерных мышечных трубочек. В середине шестидесятых годов специалисты в области биологии развития дискутировали по поводу происхождения мышечных трубочек: возникают ли они в результате слияния нескольких одноядерных клеток-предшественников мышцы (**миобластов**) или образуются путем многократных делений ядра единичного миобласта, не сопровождающихся цитокинезом. Данные, полученные из двух независимых источников, показали, что мышечные трубочки формируются путем слияния миобластов.

Наиболее значительных успехов в изучении развития мышц удалось достичь после того, как было показано (Konigsberg, 1963), что миобласты могут дифференцироваться в мышечные трубочки в условиях культивирования in vitro. Культивирование in vitro позволило исследователям изучить механизм этого процесса и связать его с дифференцировкой мышечного волокна. Клетки из эмбриональных областей, содержащих миобласты, отделяли одну от другой с помощью переваривания внеклеточного матрикса трипсином. Затем их помещали в покрытые коллагеном чашки Петри, содержащие питательные вещества и сыворотку (рис. 6.6). Через 48 ч подавляющее большинство клеток представляло собой быстро делящиеся миобласты. Вскоре после этого в миобластах прекращался синтез ДНК и они сливались с соседними клетками, образуя широкие мышечные трубочки (Konigsberg, 1963), которые начинали синтезировать специфические для мышц белки. В многоядерных мышечных трубочках деления ядер и синтеза ДНК не наблюдается.

Слияние миобластов, приводящее к образованию мышечных трубочек, четко разделяется на два отдельных процесса. На первой стадии наблюдаются миграция клеток, узнавание и выстраивание их в ряд. В культуре изолированных клеток грудной мышцы 11-дневного куриного зародыша (которая еще содержала большое число одноядерных миобластов) можно было наблюдать, что эти клетки делились и мигрировали. Многие из мигрировавших клеток затем сливались и образовывали мышечные трубочки. Оказалось возможным (Nameroff, Munar, 1976) от-

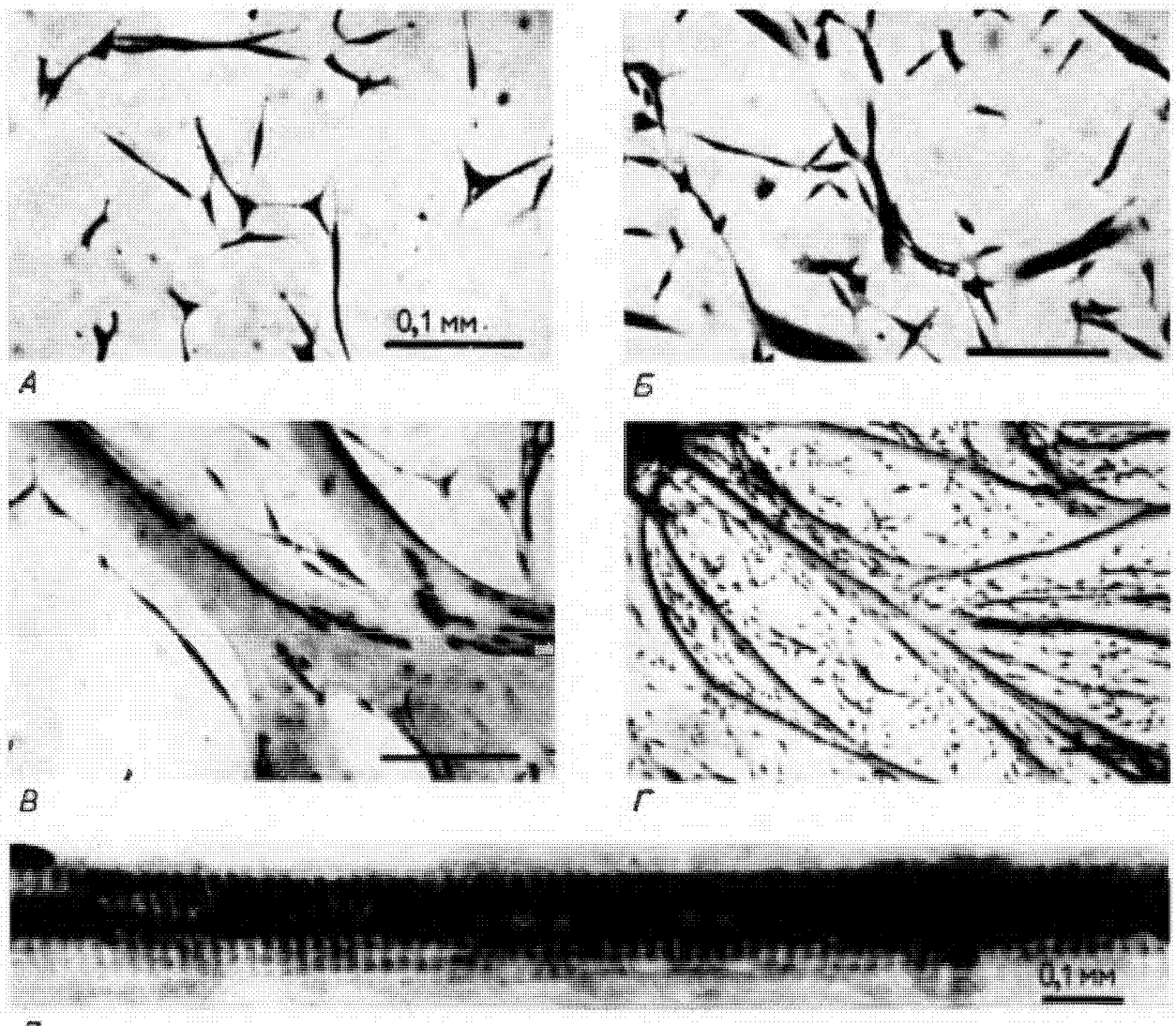


Рис. 6.6. Дифференцировка миобластов у зародышей перепела. Миобласты помещали в культуральную среду, затем фиксировали, окрашивали и фотографировали на сроках 2, 3 и 5 сут после начала культивирования. *А*. Двухдневная культура, состоящая из одноклеточных миобластов. *Б*. Слияние миобластов, обнаруживаемое впервые в трехдневной культуре. *В*. Увеличение числа ядер в многоядерных мышечных трубочках в пятидневной культуре. *Г*. Та же 5-дневная культура при малом увеличении; наблюдается интенсивное слияние клеток. *Д*. Многоядерная мышечная трубочка при большем увеличении; видна характерная поперечная исчерченность. Масштабная полоска соответствует 0,01 мм (на рис. ошибка). (Из Buckley, Konigsberg, 1974; фотографии с любезного разрешения J. M. Konigsberg.)

делить процесс узнавания (выстраивание миобластов в цепочку) от процесса слияния, обработав культивируемые клетки фосфолипазой С. Этот фермент препятствует слиянию мембран, но не действует на процесс узнавания. Поэтому в присутствии фермента клетки образовывали цепочки, но их мембраны не сливались. Эти опыты также показали, что процесс узнавания ответствен за остановку синтеза ДНК в миобласте. ^{3}H-тимидин включался в ДНК мигрирующих миобластов, но не включался в миобласты, расположенные в цепочку (рис. 6.7). Следовательно, процесс узнавания клетками приостанавливает их дальнейшее деление.

Вторая стадия миогенеза — это процесс слияния миобластов. Оба события — и узнавание, и слияние — зависят от наличия ионов кальция, но во время слияния ионы кальция должны поступать в миобласты. В соответствии с этим слияние можно активировать

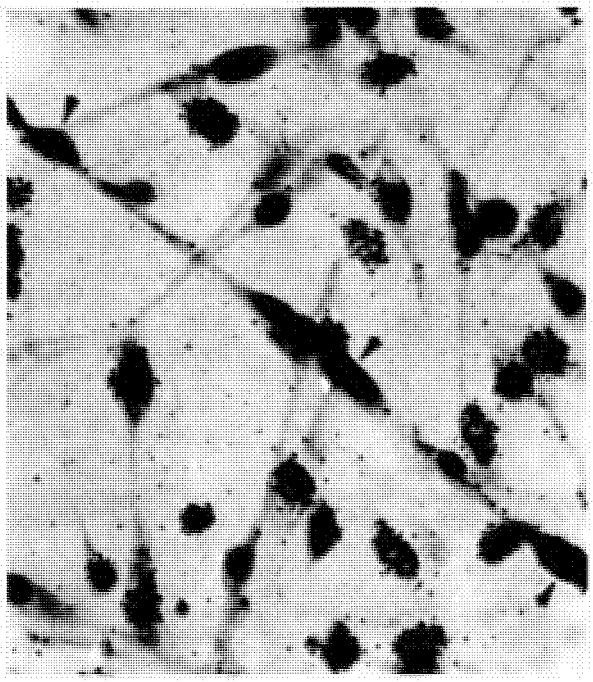


Рис. 6.7. Синтез ДНК в культуре миобластов куриного зародыша. Миобласты были обработаны фосфолипазой С, а затем подвергнуты воздействию ^{3}H-тимидина. Неприкрепившиеся миобласты продолжают делиться и поэтому включают ^{3}H-тимидин в ДНК. Включенные в ДНК меченые нуклеотиды вызывают потемнение зерен серебра в эмульсии, что можно обнаружить после проявления пленки. Выстроившиеся в одну линию (но еще не слившиеся) клетки (показаны стрелками) метку не включают. (Из Nameroff, Munar, 1976; фотографии с любезного разрешения M. Nameroff.)

ионофорами кальция, такими, как A23187, который переносит ионы кальция через клеточные мембраны (Schainberg et al., 1969; David et al., 1981). Если выстраивание миобластов в цепочку опосредовано гликопротеидами клеточной мембраны (Knudsen, 1985), то их слияние, по-видимому, регулируется интенсивной реорганизацией мембранных компонентов, приводящей к образованию участков, свободных от белков и содержащих фосфолипиды (Kaufman, Foster, 1985; Wakelam, 1985). Было показано (Kalderon, Gilula, 1979), что опосредованное кальцием слияние миобластов происходит в тех участках их мембран, которые обогащены фосфолипидами. Эта гипотеза объясняет, почему фосфолипаза С является таким мощным ингибитором слияния клеток.

Хотя узнавание клетками друг друга и их слияние — существенные черты миогенеза, видовая специфичность в этих явлениях отсутствует. Миобласты сливаются только с миобластами, и они не обязательно должны принадлежать одному и тому же виду животных. Показано (Yaffe, Feldman, 1965), что миобласты зародышей крысы и курицы легко сливаются, образуя гибридные мышечные трубочки.

Результаты исследований, проведенных на аллофенных мышах, также свидетельствуют в пользу гипотезы о слиянии миобластов. Таких мышей получают путем слияния двух ранних зародышей; у развивающихся мышей имеются две четко различимые популяции клеток (см. рис. 3.29). В одном из опытов (Mintz, Baker, 1967) объединяли зародышей двух линий мышей, у которых синтезируются разные формы фермента изоцитратдегидрогеназы. Этот фермент, обнаруженный во всех клетках, состоит из двух идентичных субъединиц. Если мышечные трубочки образуются из одной клетки, ядра которой делятся без цитокинеза, то следует ожидать появления у аллофенной мыши двух разных («родительских») форм фермента (рис. 6.8). Вместе с тем, если мышечные трубочки формируются путем слияния миобластов, то следует ожидать появления мышечных клеток, в которых экспрессируются гены не только одной из двух «родительских» изоформ фермента (AA или BB), но также и третьей изоформы, образованной субъединицами каждого из родительских типов фермента (AB). Различные формы изоцитратдегидрогеназы могут быть разделены и идентифицированы по их подвижности в электрическом поле. Результаты опыта ясно показали наличие гибридного фермента в экстрактах из скелетных мышц, хотя в экстрактах из всех других тканей был обнаружен фермент только двух родительских типов. Следовательно, мышечные трубочки действительно формируются путем слияния многочисленных миобластов.

Все исследователи считают слияние миобластов и синтез специфических мышечных белков независимыми друг от друга явлениями, хотя и происходящими обычно одновременно. Как только миобласты выстраиваются в цепочку и прекращают делиться, они начинают синтезировать тропомиозин, тяжелую цепь миозина и специфичные для мышц изоформы актина и креатинкиназы. Креатинкиназа представляет собой димерный белок. До слияния миобластов в них синтезируется креатинкиназа, состоящая только из субъединиц B (димер BB). К моменту слияния в культуре они начинают синтезировать другую специфичную для мышц форму фермента (M), создавая димеры MM (рис. 6.9, *А*). Слияние миобластов можно стимулировать, заменив среду, поддерживающую пролиферацию, средой, в которой отсутствуют определенные факторы роста. В лимитированной среде миобласты прекращают делиться и в течение короткого периода времени сливаются. Эта методика была использована (Devlin, Emerson, 1978) для синхронизации слияния клеток и изучения синтеза миозина, актина и тропомиозина (рис. 6.9, *Б*). В начале культивирования ни одного из белков обнаружить не удается. Однако ко времени слияния миобластов эти структурные белки очень быстро выяв-

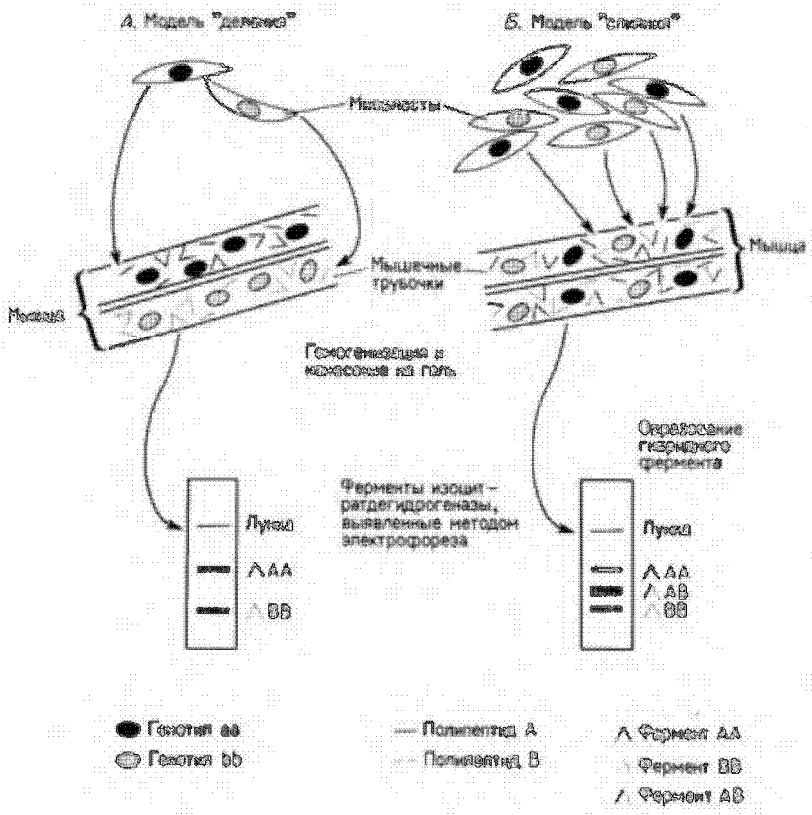


Рис. 6.8. Схема, иллюстрирующая два возможных механизма формирования скелетных мышц и способ выбора между ними. Аллофенных мышей получают путем слияния мышиных зародышей разных линий; клетки каждой из двух линий можно различить по наличию разных форм фермента изоцитратдегидрогеназы. Этот фермент состоит из двух субъединиц; одна линия мышей продуцирует А-субъединицы изоцитратдегидрогеназы, другая — В-субъединицы. *А*. Если ферменты синтезируются одной клеткой или в многоядерных клетках, образовавшихся путем деления ядер в одной клетке, то изоформы фермента будут либо АА, либо ВВ. *Б*. Если в одной и той же клетке имеются два разных ядра, то одно из них может кодировать субъединицу В, тогда как другое — субъединицу А, и в результате некоторые молекулы фермента будут гибридными (АВ). Эти три типа молекул разделяют методом электрофореза. Присутствие молекулы АВ только в клетках скелетных мышц (но не в других типах клеток) подтверждает правильность модели слияния. (По Mintz, Baker, 1967.)

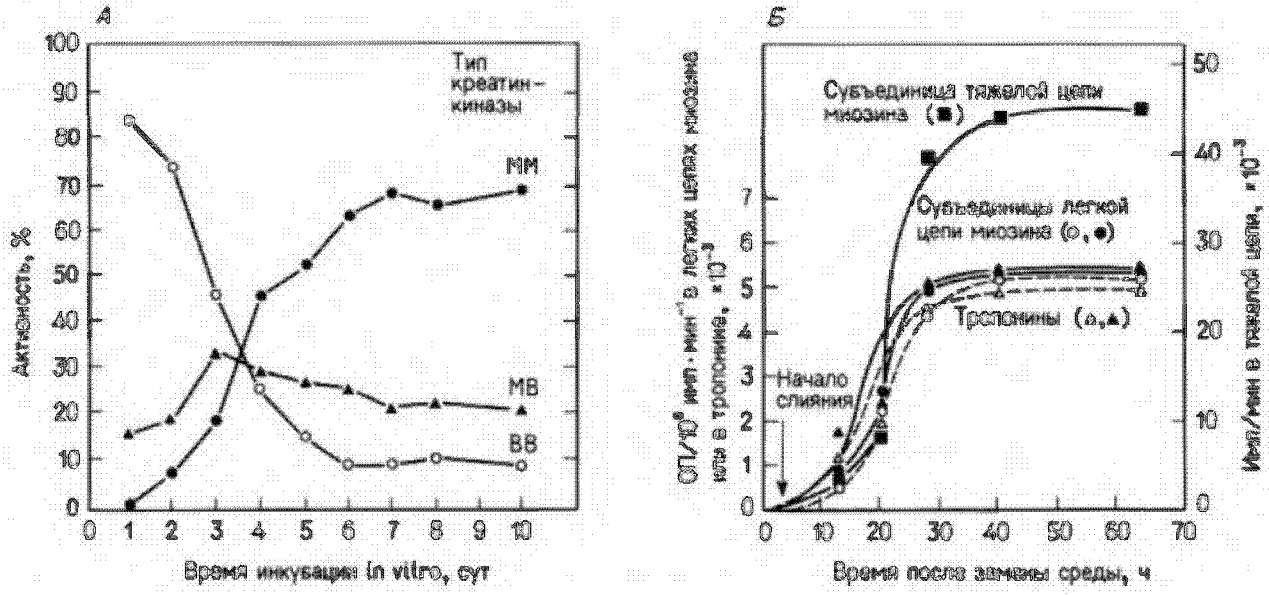


Рис. 6.9. Синтез новых ферментов, сопутствующий слиянию миобластов. *А*. Уменьшение активности субъединиц немышечной креатинкиназы (В-типа), сопровождающееся замещением их субъединицами специфичной для мышц креатинкиназы (М-типа) по мере слияния миобластов куриного зародыша, культивируемых in vitro. Слияние начинается после первых суток культивирования, и на вторые сутки культивирования в мышечных трубочках обнаруживается 38% ядер. *Б*. Синтез специфичных для мышц сократительных белков после перенесения делящихся миобластов в среду, способствующую их слиянию. Культуры метили ^{35}S-метионином, который включается в белки, а затем через определенные сроки выявляли синтез разных белков (*А* — по Lough, Bischoff, 1977; *Б* — по Devlin, Emerson, 1978.)

ляются. Показано (Sutherland, Konigsberg, 1983), что, когда прекращается синтез ДНК, синтез специфичных для мышц белков увеличивается как обычно, даже в том случае, если слияние миобластов подавлено понижением концентрации кальция в среде. Отсюда можно заключить, что, как только клетки прекращают делиться, они приобретают способность и к слиянию, и к синтезу специфичных мышечных белков.

Общепризнано, что огромное увеличение синтеза таких белков происходит к моменту слияния миобластов, однако остается неясным, на каком уровне осуществляется контроль этих процессов — на транскрипционном, трансляционном или на том и другом вместе. Некоторые исследователи (см. гл. 14) сообщили, что в миобластах до их слияния обнаруживаются мРНК, специфичные для мышечных белков. Если это так, то акт слияния должен действовать как сигнал для начала *трансляции* этих уже имеющихся мРНК. Другие исследователи (Devlin, Emerson, 1979; Daubas et al., 1981) не смогли обнаружить в делящихся миобластах мРНК для сократительных белков. Эти исследователи полагают, что синтез таких белков происходит на новообразованных мРНК. В любом случае слияние миобластов и накопление специфичных мышечных белков, по-видимому, координируется прекращением синтеза ДНК в пролиферирующих миобластах.

Остеогенез: развитие кости

Кости — наиболее четко выраженные производные соматической мезодермы. В этой главе будут рассмотрены только самые общие механизмы формирования костей. Студенты, желающие получить более подробные сведения, могут обратиться к учебникам по гистологии, где этой теме посвящены целые главы. Существуют два способа формирования костей (**остеогенеза**), и оба включают в себя трансформацию предсуществующей соединительной ткани в костную ткань. Превращение малодифференцированной соединительной ткани в костную называется **интрамембранным окостенением**, а замещение хряща костью — **эндохондральным окостенением**. Образование плоских костей, например костей черепа, осуществляется посредством интрамембранного окостенения. Рыхло расположенные мезенхимные клетки пролиферируют и образуют плотные скопления. Некоторые из этих клеток дают начало капиллярам, а другие изменяют свою форму и становятся **остеобластами** — клетками, способными секретировать костный матрикс. Синтезируемый ими коллагено-гликозаминогликановый матрикс обладает способностью связывать соли кальция, приносимые капиллярами в область окостенения. Таким образом, матрикс становится кальцифицированным (обызвествленным). В большинстве случаев остеобласты отделяются от области обызвествления слоем предкостного (остеоидного) матрикса, который они секретируют. Однако время от времени остеобласты захватываются костным матриксом, и тогда они становятся **остеоцитами** — костными клетками. По мере обызвествления костные спикулы распространяются радиально от центра, где началось окостенение (рис. 6.10). Кроме того, целая область обызвествленных спикул окружается плотно лежащими над ней мезенхимными клетками, формирующими **периост**, или **надкостницу**. Клетки на внутренней поверхности надкостницы также становятся остеобластами и секретируют костный матрикс параллельно с матриксом уже образовавшихся спикул. Таким образом формируется много слоев кости.

Эндохондральное окостенение заключается в замещении хрящевой ткани костной. В данном случае хрящ служит моделью для последующего формирования кости. Сначала образуется хрящевой зачаток

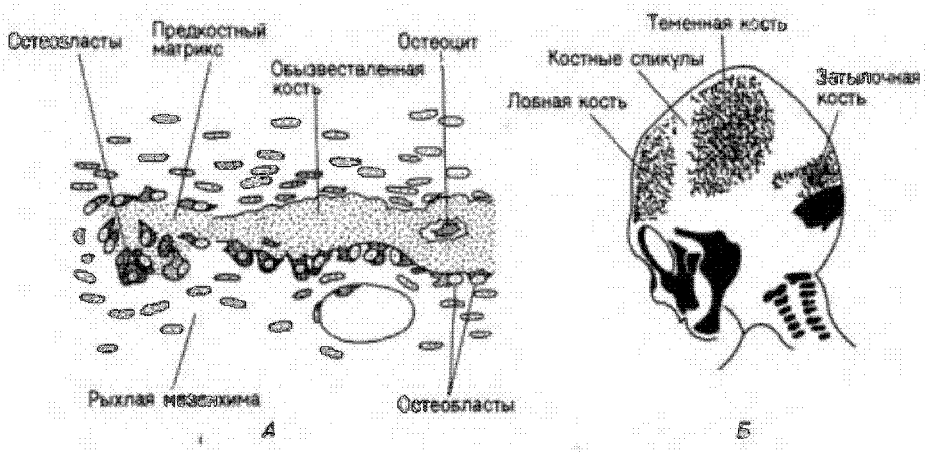


Рис. 6.10. Схема, иллюстрирующая внутримембранное окостенение. *А*. В скоплениях мезенхимы образуются остеобласты, которые секретируют костеподобный (предкостный) матрикс. Эти остеобласты располагаются вдоль обызвествленного участка матрикса. Остеобласты, попавшие внутрь костного матрикса, становятся остеоцитами. *Б*. Распространение костных спикул от места первичного окостенения в костях черепа трехмесячного зародыша человека. Кости, образующиеся путем эндохондрального окостенения, обозначены черным цветом. (По Langman, 1969.)

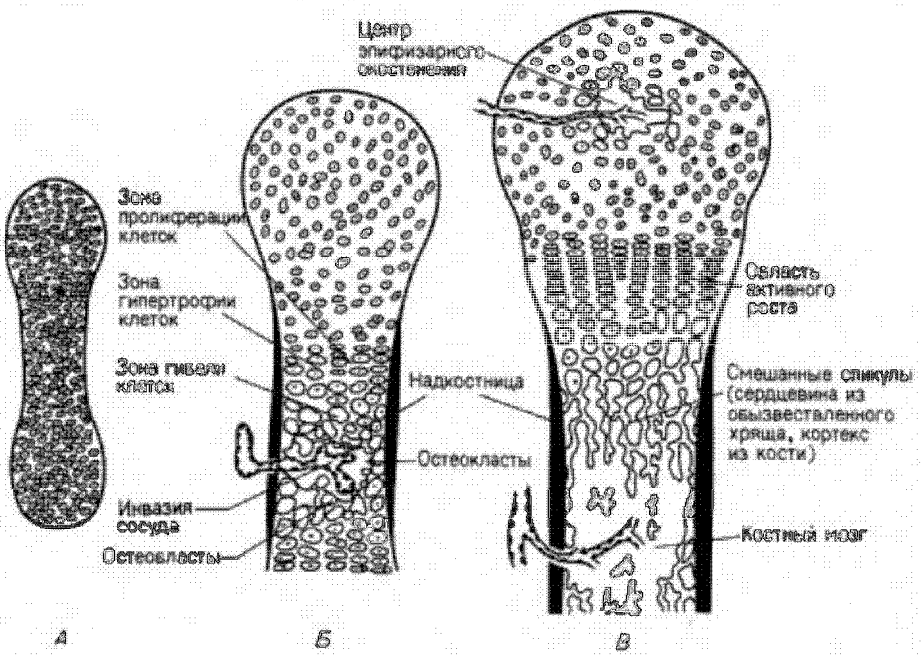


Рис. 6.11. Схема, иллюстрирующая эндохондральное (внутрихрящевое) окостенение. *А*. Хрящевая «модель» кости. *Б*. Инвазия кровеносного сосуда в центр хрящевого диафиза, приводящая к образованию зон клеточной пролиферации, гипертрофии клеток и клеточной гибели. *В*. Формирование костного мозга в диафизе и центра вторичного окостенения в эпифизе. (По Langman, 1969.)

будущих костей позвоночного столба, таза и конечностей, а позже хрящ замещается костной тканью. Этот замечательный процесс координирует хондрогенез (образование хряща) с остеогенезом (ростом кости), в течение которого скелетные элементы одновременно испытывают нагрузку, растут в ширину и отвечают на локальные стрессы. Одна из гипотез, предложенная для объяснения механизма этой координации, постулирует сдвиг в функции митохондрий, вызываемый изменением количества кислорода и питательных веществ, доступных клеткам. У зародыша человека в возрасте 7 нед «длинные кости» образованы только хрящом, окруженным оболочкой из плотной мезенхимы. Эта оболочка становится надкостницей (рис. 6.11). Затем капилляры из надкостницы проникают в центр хрящевого зачатка, ранее лишенного кровеносных сосудов. Хрящ реагирует на это формированием зон интенсивной клеточной пролиферации, гипертрофии клеток (увеличения их размеров) и клеточной гибели.

Если клетка находится в зоне пролиферации, то она лежит вблизи несущего кислород кровеносного сосуда и хорошо снабжается гликогеном — источником энергии. Митохондрии этих делящихся клеток синтезируют АТФ, необходимый для митоза. Однако в зоне гипертрофии снабжение клеток кислородом ухудшается. Согласно этой теории, дыхание клеток в зоне гипертрофии становится анаэробным, и митохондрии переключаются с образования АТФ на накопление кальция (Brighton, Hunt, 1974; Brighton, 1984). В анаэробном участке зоны гипертрофии снабжение клеток гликогеном полностью прекра-

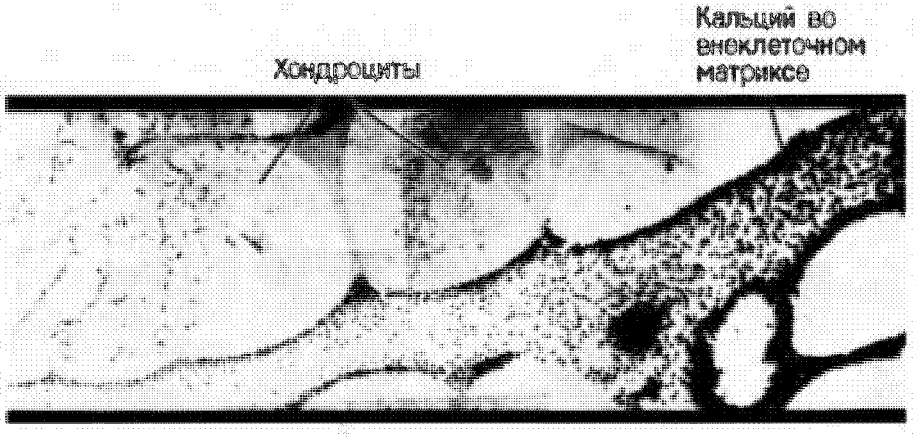


Рис. 6.12. Отложение кальция хондроцитами в дистальной области зоны гипертрофии клеток. Кальций (окрашенный в черный цвет на смонтированной электронной микрофотографии) откладывается во внеклеточном матриксе крупными хондроцитами. (Из Brighton, Hunt, 1974; фотография с любезного разрешения С. Т. Brighton.)

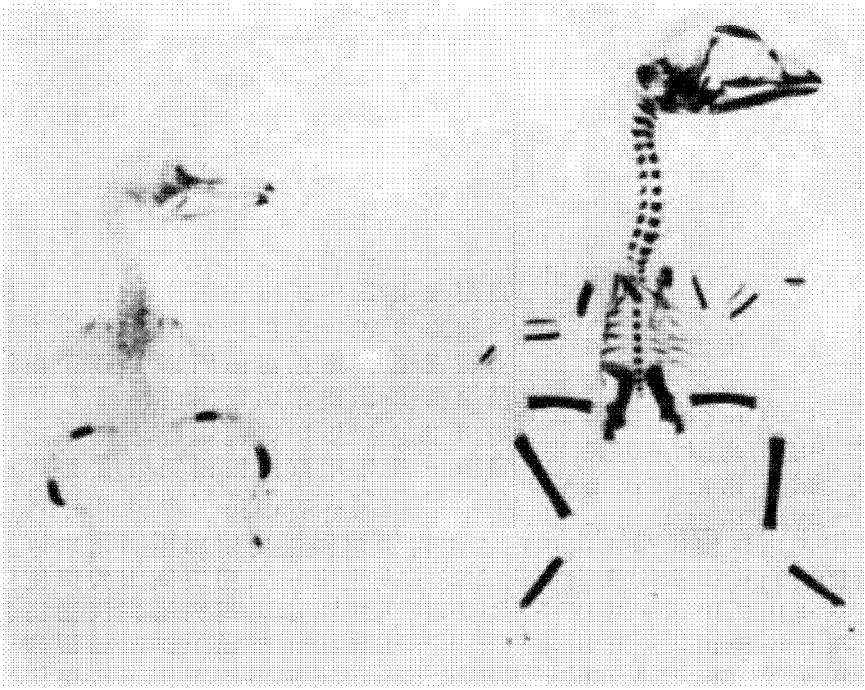


Рис. 6.13. Минерализация скелета у 17-дневных куриных зародышей: нормальных (*справа*) и культивировавшихся без скорлупы (*слева*). Зародышей фиксировали и окрашивали ализарином красным для выявления обызвествленного матрикса. (Из Tuan, Lynch, 1983; фотография с любезного разрешения R. Tuan.)

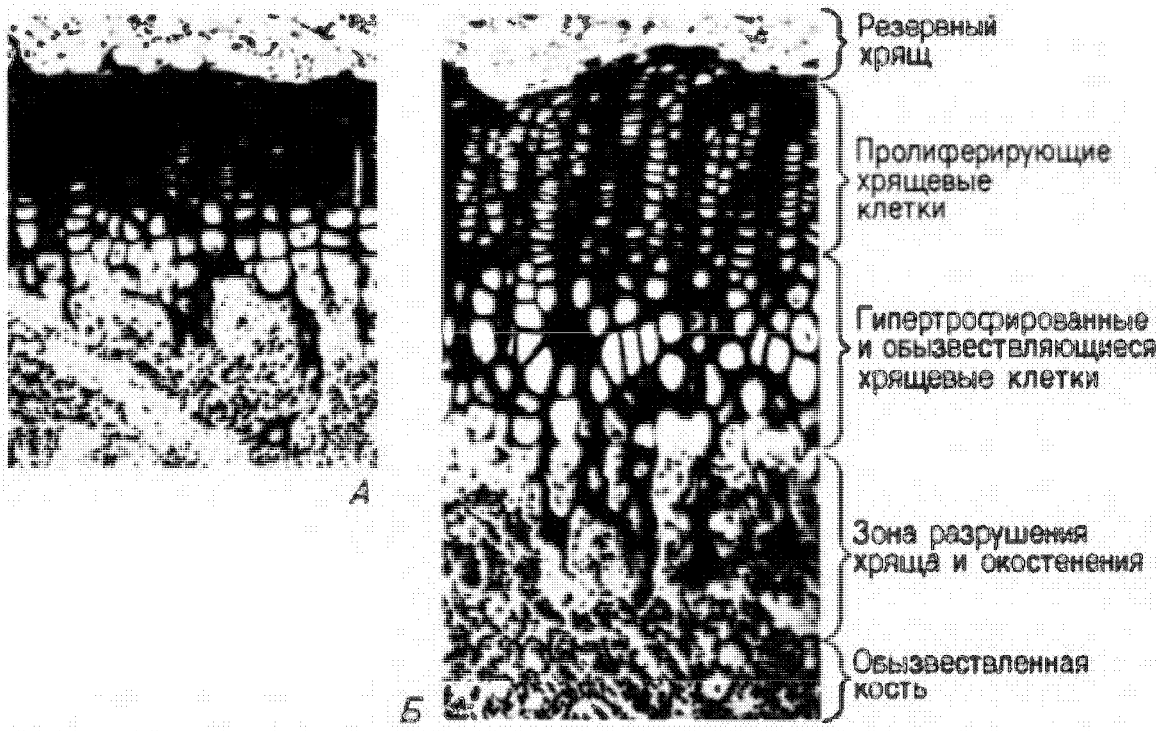
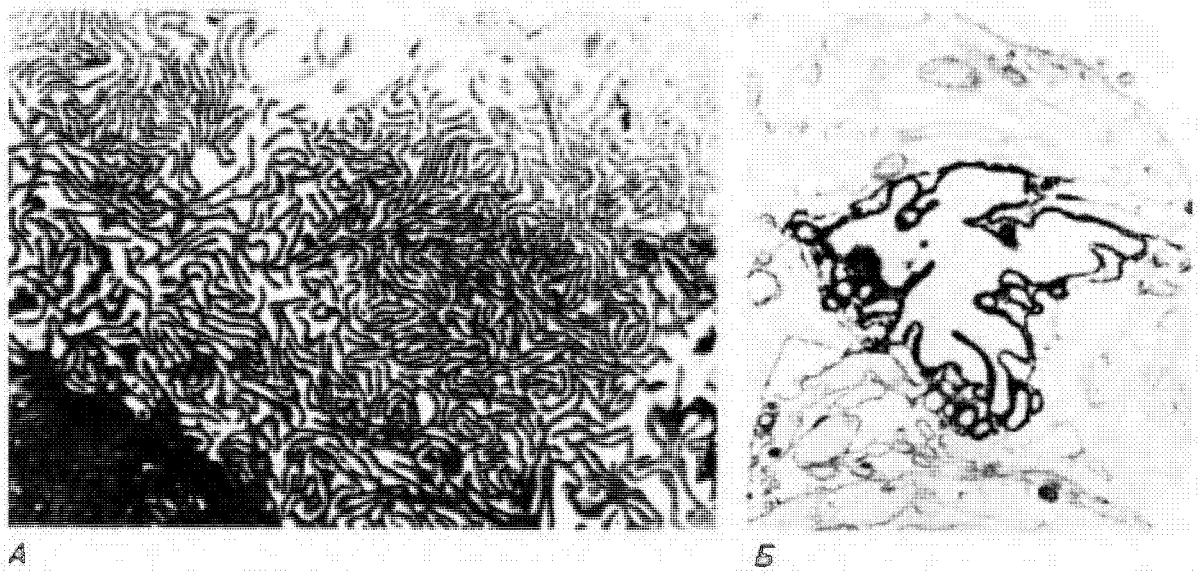


Рис. 6.14. Пролиферация клеток в эпифизарной пластинке, стимулированная гормоном роста. *А*. Участок хряща в кости молодой крысы, у которой удалением гипофиза вызван дефицит гормона роста. *Б*. Такой же участок хряща у крысы после инъекции ей гормона роста. (Фотографии J. Gersh из Bloom, Fawcett, 1975.)



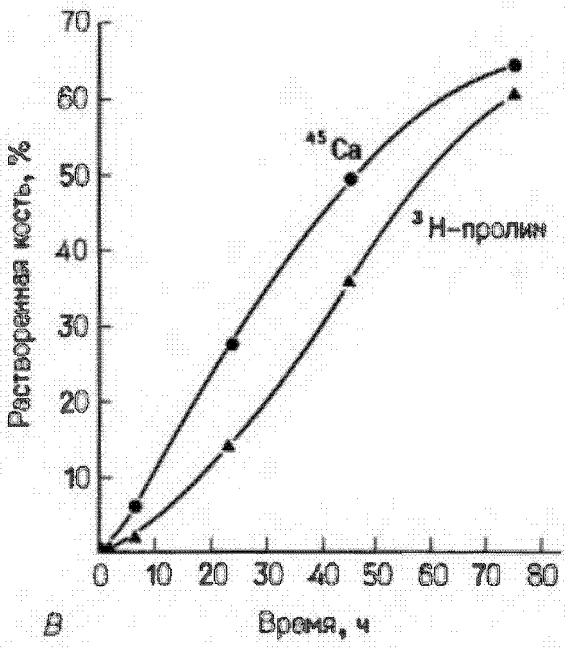


Рис. 6.15. Активность остеокластов в костном матриксе. *А*. Ундулирующая мембрана куриного остеокласта, культивируемого на реконструированном костном матриксе. *Б*. Участок ундулирующей мембраны, окрашенной на присутствие АТФазы, способной к транспорту H^+ из клетки. АТФаза локализована только в мембране клеточного отростка. (*А* и *Б* — фотографии получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа). *В*. Растворение неорганического и коллагенового компонентов матрикса (измеряемое соответственно по высвобождению ^{45}Ca и ^{3}H-пролина из 10 000 остеокластов, инкубированных на меченых фрагментах кости). (*А* и *В* — из Blair et al., 1986; *Б* — из Baron et al., 1986; фотографии с любезного разрешения авторов.)

шается и митохондрии более не могут накапливать кальций (его накопление — активный энергоемкий процесс). В результате отмирающие хондроциты высвобождают кальций, и за его счет формируется провизорный обызвествленный (кальцифицированный) матрикс (рис. 6.12). Остеобласты выстраиваются в ряд вдоль обызвествленных полос матрикса и начинают откладывать на них кость. В конечном счете эти полосы исчезают и остается лишь кость, сформированная остеобластами. Таким образом, кость оказывается там, где ранее находился хрящ.

Другая гипотеза подчеркивает различное происхождение начальных запасов фосфата кальция во внеклеточном матриксе. Согласно этой гипотезе, главными действующими агентами в накоплении кальция являются не митохондрии хондроцитов, а пузырьки матрикса. Считают, что эти пузырьки представляют собой специализированные участки плазматической мембраны хондроцита, которые отпочковываются от клетки и прилипают к внеклеточному матриксу. Попав на это место, они накапливают большие количества кальция и фосфата из окружающей лимфы (Dereszewski, Howell, 1978; Wuthier et al., 1985). Действительно, эти пузырьки связаны с самыми начальными отложениями кальция в хряще и кости. Недавно обнаружено (Wuthier et al., 1985), что некоторые пузырьки содержат кальций из хондроцитов. Это позволяет предположить, что обе модели могут быть правильными и что накопление кальция может осуществляться с помощью не одного, а двух или более механизмов.

Замещение хондроцитов остеобластами зависит, по-видимому, от минерализации внеклеточного матрикса. У куриных зародышей источником кальция

служит углекислый кальций скорлупы яйца. За время развития кровеносная система зародыша переносит около 120 мг кальция от скорлупы к скелету (Tuan, 1987). Если у развивающегося куриного зародыша на третьи сутки инкубации удалить скорлупу, поместить его в пластиковую оболочку и культивировать до конца эмбриогенеза, то в условиях дефицита кальция бóльшая часть хрящевого скелета не превращается в костную ткань (Tuan, Lynch, 1983; рис. 6.13).

Остеогенез в длинных костях начинается в диафизе и постепенно распространяется к концам хрящевого зачатка. У новорожденного младенца диафизы длинных костей обызвествлены, тогда как их концы (называемые эпифизами) все еще образованы хрящом. Вскоре после рождения в хрящевых эпифизах (по мере того как в них проникают кровеносные сосуды) возникают вторичные центры окостенения. Между кальцинированной тканью в эпифизах и диафизом продолжает сохраняться хрящевая пластинка. Эта **эпифизарная пластинка** играет важную роль в росте ребенка после рождения, так как она отвечает пролиферацией на поступающий в нее гормон роста (рис. 6.14). Гормоны также ответственны и за прекращение роста: высокие концентрации эстрогена или тестостерона вызывают слияние центров окостенения в эпифизах и диафизе, что приводит к утрате эпифизарной пластинки. Такое **эпифизарное слияние** происходит в юношеском возрасте, причем у девушек на два года раньше, чем у юношей.

По мере увеличения костного матрикса на периферии кости в ее внутренней части образуются полости и формируется костный мозг. Эта деструкция костной ткани осуществляется **остеокластами** — многоядерными клетками, поступающими в кость по кровеносным сосудам (Kahn, Simmons, 1975).

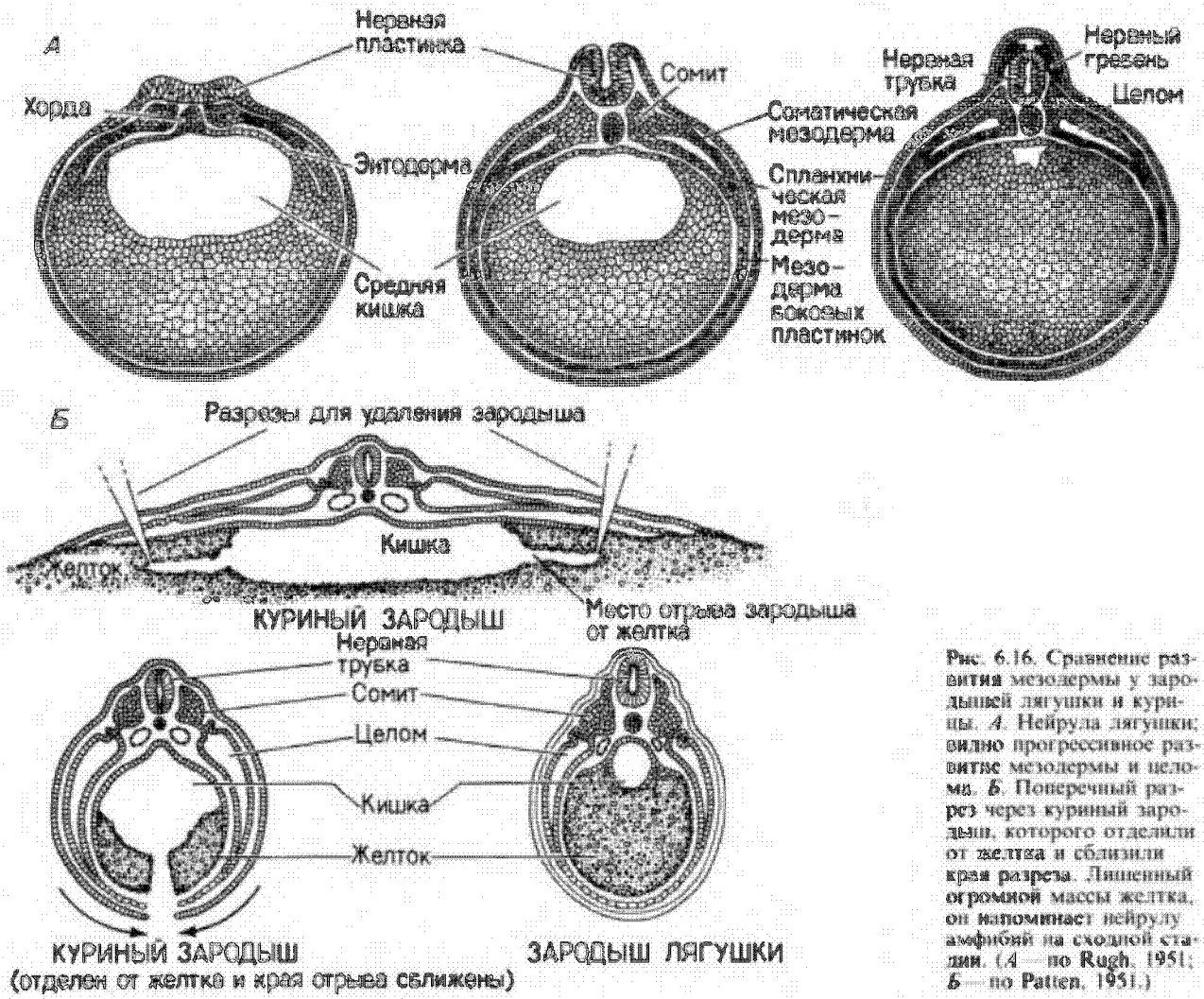


Рис. 6.16. Сравнение развития мезодермы у зародышей лягушки и курицы. *А*. Нейрула лягушки; видно прогрессивное развитие мезодермы и целома. *Б*. Поперечный разрез через куриный зародыш, которого отделили от желтка и сблизили края разреза. Лишенный огромной массы желтка, он напоминает нейрулу амфибий на сходной стадии. (*А* — по Rugh, 1951; *Б* — по Patten, 1951.)

Остеокласты, вероятно, происходят из тех же клеток-предшественников, что и клетки крови; они растворяют как неорганические, так и белковые компоненты костного матрикса (Ash et al., 1980; Blair et al., 1986). Остеокласт направляет многочисленные отростки в матрикс и накачивает ионы водорода в окружающий его материал, тем самым окисляя и растворяя его (Baron et al., 1985, 1986; рис. 6.15). Кровеносные сосуды поставляют в костный мозг также кроветворные клетки, которые остаются в нем на всю жизнь.

Мезодерма боковых пластинок

Мезодермальная мантия не полностью превращается в сомиты. К мезодерме сомитов прилегает область **промежуточной мезодермы** — материал сегментных ножек, из которых развиваются почки и протоки половых желез. Развитие этих систем органов будет подробно рассматриваться в гл. 16 и 21. Далее находится несегментированная **мезодерма боковых пластинок**. Эти пластинки расщепляются продольно на **соматическую (или париетальную) мезодерму**, которая подстилает покровный эпителий, и **спланхническую (висцеральную) мезодерму**, лежащую над энтодермой (см. рис. 6.2, *В*). Между этими двумя слоями образуется вторичная полость тела — **целом**, который простирается от будущего шейного отдела до заднего конца тела. На более поздних стадиях развития соматическая мезодерма образует складки, разделяющие целом на отдельные полости. У млекопитающих целом подразделен на плевральную, перикардиальную и перитонеальную полости. Механизм образования мезодермы сомитов и выстилки тела мало изменялся в процессе эволюции позвоночных, поэтому можно сравнить развитие мезодермы у куриного зародыша и лягушки (рис. 6.16).

Дополнительные сведения и гипотезы

Изоформы

В ходе развития многочисленные линии клеток мезодермы характеризуются замещением одного набора структур (клеток или молекул) другим. Молекулы или клетки, участвующие в этих процессах, часто родственны одна другой и называются **изоформами** (Caplan et al., 1983). Примером набора клеточных изоформ могут служить хондроцит и замещающий его остеобласт. Клетки обоих типов секретируют большое количество обызвествленного (кальцифицированного) матрикса. Примерами молекулярных изоформ являются образующиеся последовательно гемоглобин зародыша, гемоглобин плода и гемоглобины взрослого организма.

В ходе развития у мышей формируются три изоформы популяции миобластов. В популяции первых миобластов (миобласт I), образующихся после отделения миотома от склеротома, слияние идет не очень интенсивно и возникают мелкие мышечные трубочки, содержащие всего лишь 4—6 ядер. Эти трубочки не формируют функционирующих мышц. Вскоре появляется популяция миобластов II; эти миобласты сливаются в крупные мышечные трубочки (20—100 ядер), которые вытесняют миобласты I (Bonner, Hauschka, 1974). В то же самое время аксоны главных двигательных нейронов начинают врастать в конечности. Эти нейроны стимулируют образование третьей популяции миобластов (Womble, Bonner, 1980). Мышечные трубочки, происходящие из популяции миобластов III, образуют мышцы, характерные для новорожденной мыши. В конечностях миобласты III впервые начинают синтезировать характерные для них M- и Z-подобные белки (Jockusch, Jokusch, 1980).

В мышцах, сформированных миобластами III, появляются и исчезают *молекулярные* изоформы. Рассмотрим тяжелые (200 000 дальтон) цепи миозина. Анализ этих белков показывает, что в период развития плода у него обнаруживается эмбриональная форма тяжелой цепи миозина. Ко времени родов она заменяется на форму, характерную для новорожденного, которая позже (в быстрых мышцах) заменяется взрослой формой тяжелой цепи миозина (Whalen et al., 1979). Таким образом, существуют два типа смены изоформ, участвующих в развитии мышц, один на клеточном, другой на молекулярном уровне.

Появление этих изоформ может быть изменено экспериментально (если воспрепятствовать контакту нервов с конечностью) или в результате естественной мутации. У кур существует генетическая мутация, вызывающая мышечную дистрофию. Как и в случае мышечной дистрофии Дюшена у человека, у кур такие мышцы имеют многие признаки, характерные для незрелых мышц,— сходство, которое свидетельствует об отсутствии у них соответствующей программы для нормального развития мышц. Было показано (Bandman, 1985), что у таких мутантов в мышцах продолжается синтез неонатальной

формы в течение долгого времени после того, как эта форма исчезает в нормальной взрослой мышце. Эти факты говорят о том, что развитие ткани не завершается ее формированием. Для того чтобы возник фенотип взрослого индивидуума, необходимо неоднократное моделирование этой ткани как на внутриклеточном, так и на межклеточном уровнях.

Формирование внезародышевых оболочек

Зародышевое развитие у рептилий, птиц и млекопитающих в процессе эволюции приняло новое направление. У рептилий возник механизм откладки яиц на суше, позволивший им использовать ниши, расположенные далеко от воды. Для этого у зародыша появились четыре внезародышевые оболочки, служащие посредниками между ним и средой обитания. И хотя у большинства млекопитающих вместо скорлупы сформировалась плацента, у них сохранились те же самые внезародышевые оболочки. У зародышей рептилий, птиц и млекопитающих на ранней стадии развития четких различий между зародышевыми и внезародышевыми областями обнаружить не удается. Однако по мере формирования тела зародыша расположенные на периферии бластодермы эпителиальные ткани образуют ряд туловищных складок, окружающих развивающийся зародыш и тем самым изолирующих его от желтка; они очерчивают контуры собственно зародышевых областей.

Внезародышевые оболочки образуются посредством разрастания эктодермального и энтодермального эпителиев, подостланных мезодермой. При комбинации эктодермы с мезодермой (эту комбинацию часто обозначают термином **соматоплевра**) формируются амнион и хорион; комбинация энтодермы и мезодермы (называемая **спланхноплеврой**) дает начало желточному мешку и аллантоису. Клетки энтодермальной или эктодермальной ткани действуют как функционирующие эпителиальные клетки, а мезодерма дает обширную сеть кровеносных сосудов, несущих кровь от зародыша к эпителию и от эпителия к зародышу. Схематическое изображение полностью сформированных внезародышевых оболочек показано на рис. 1.26, а их формирование — на рис. 6.17.

Первая проблема, возникающая при развитии яйца на суше,— это высыхание. Эмбриональные клетки, оказавшись вне водной среды, должны были бы очень быстро высохнуть. Эту водную среду обеспечивает **амнион**. Клетки амниона секретируют амниотическую жидкость, и таким образом эмбриогенез по-прежнему осуществляется как бы в воде. Это эволюционное новшество оказалось столь значительным и специфическим, что рептилий, птиц и млекопитающих объединили в одну группу **амниот** (Amniota).

Вторая проблема для развития яйца, отложенного на суше,— газообмен. Он осуществляется с помощью **хориона** — самой наружной внезародышевой оболочки. У птиц и рептилий она плотно прилегает к скорлупе и тем самым делает возможным обмен газами между яйцом и наружной средой. У млекопитающих, как мы видели, хорион включается в плаценту, которая кроме дыхательной осуществляет много других функций.

Аллантоис накапливает конечные продукты азотистого обмена и участвует в обмене газов. У рептилий и птиц аллантоис представляет собой большой мешок, поскольку другого пути накопления токсических побочных продуктов метаболизма, образующихся у развивающегося зародыша, нет. Мезодермальный слой аллантоиса часто сближается и сливается с мезодермальным слоем хориона, образуя **хориоаллантоисную оболочку**. Эта чрезвычайно сильно васкуляризованная оболочка имеет очень важное значение для развития куриного зародыша — она ответственна за необходимый для образования костей транспорт кальция из скорлуповой оболочки к зародышу. Размеры аллантоиса у млекопитающих зависят от того, насколько хорошо справляется хорионическая плацента с удалением конечных продуктов азотистого обмена из зародыша. У человека аллантоис представляет собой рудиментарный мешок, тогда как у свиньи это большой и важный орган.

Желточный мешок у птиц и рептилий формируется раньше других внезародышевых оболочек, так как он обеспечивает питание зародышей. Он образуется из энтодермальных клеток, которые обрастают желток. Желточный мешок соединяется со средней кишкой трубкой, открытой на обоих концах,— **желточным протоком**. В результате стенки желточного мешка и стенки кишки переходят друг в друга. Кровеносные сосуды в мезодерме спланхноплевры желточного мешка переносят питательные вещества из желтка в тело зародыша; непосредственно через желточный проток желток не поступает в тело зародыша. Сначала энтодермальные клетки переваривают белки желтка до растворимых аминокислот, которые затем переходят в кровеносные сосуды, окружающие желточный мешок. Таким образом, четыре внезародышевые оболочки делают возможным развитие зародыша на суше.

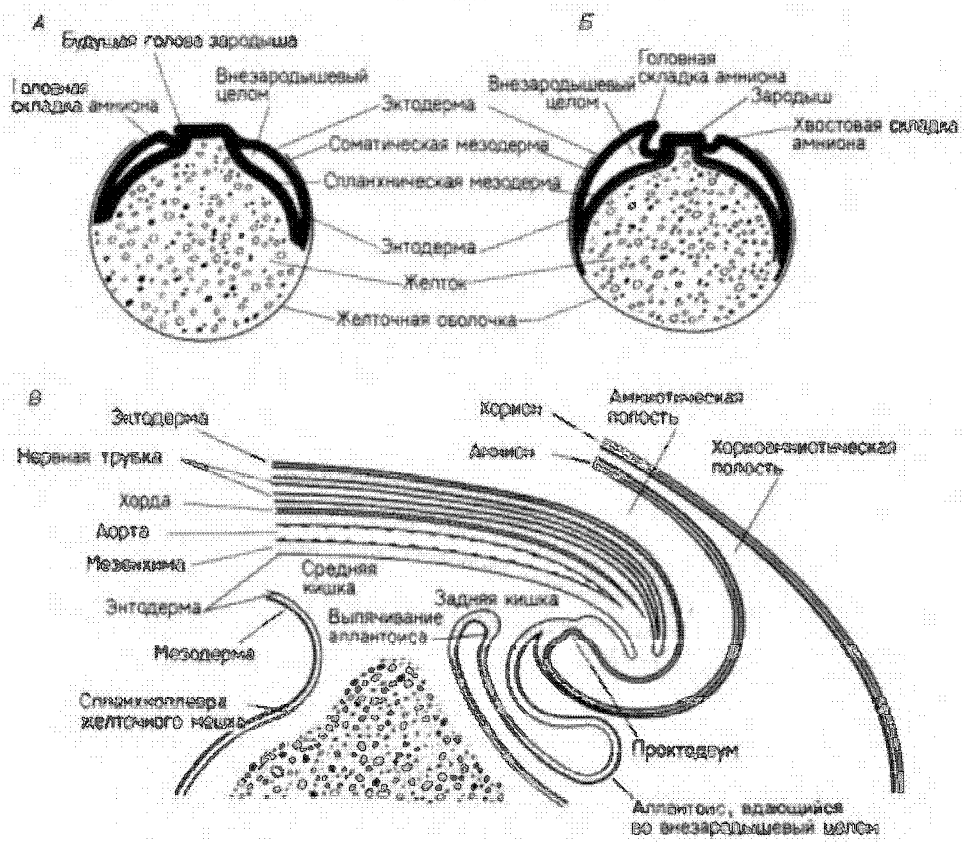


Рис. 6.17. Схема внезародышевых оболочек у куриного зародыша. Зародыш разрезан продольно, белковая и скорлуповая оболочки не показаны. *А*. 2-дневной зародыш. *Б*. 3-дневный зародыш. *В*. Более подробная схема каудальной части 4-дневного зародыша, показывающая формирование аллантоиса. *Г*. 5-дневный зародыш. *Д*. 9-дневный зародыш. По Carlson, 1981.)

Сердце и системы кровообращения

Система замкнутого кровообращения — одно из крупных достижений в эволюции позвоночных животных. Она развивается из мезодермы боковых пластинок и состоит из сердца, форменных элементов крови и сложной сети кровеносных сосудов. Она обеспечивает питание развивающегося зародыша позвоночных животных. Система кровообращения является первой функциональной единицей зародыша, а сердце — его первым функциональным органом.

Сердце

У зародышей позвоночных сердце исходно развивается в переднем отделе, в области спланхнической мезодермы, лишь позже оно перемещается в область груди. У амфибий две презумптивные области образования сердца вначале находятся в са-

мом переднем участке мезодермальной мантии. Во время нейруляции эти две области сходятся в вентральной части зародыша, формируя сердечную трубку и общую перикардиальную полость. У амниот — птиц и млекопитающих — сердце также развивается путем слияния парных зачатков, но слияние происходит значительно позже в развитии. У этих позвоночных зародыш представляет собой уплощенный диск и мезодерма боковых пластинок не окружает желток полностью. Презумптивные клетки сердца начинают мигрировать из боковых участков мезодермы (на уровне гензеновского узелка), когда зародыш достигнет возраста всего 6—7 ч. К этому времени зародыш еще относительно прост устроен, он состоит только из трех зародышевых листков. Клетки будущего сердца, двигаясь между эктодермой и энтодермой к середине зародыша, сохраняют тесный контакт с поверхностью энтодермы (рис. 6.18; Linask, Lash, 1986). Когда же они достигают передней области зародыша, где находится кишка, их миграция прекращается. Два формирующих сердце зачатка независимо друг от друга претерпевают четко выраженную дифференцировку. У птиц и млекопитающих каждый из них превращается в трубку с двойными стенками: внутренней — эндокардом и наружной — эпимиокардом. Эндокард будет формировать внутреннюю выстилку сердца, а эпимиокард — мышцу сердца, которая в течение всей жизни организма будет служить насосом, перекачивающим кровь.

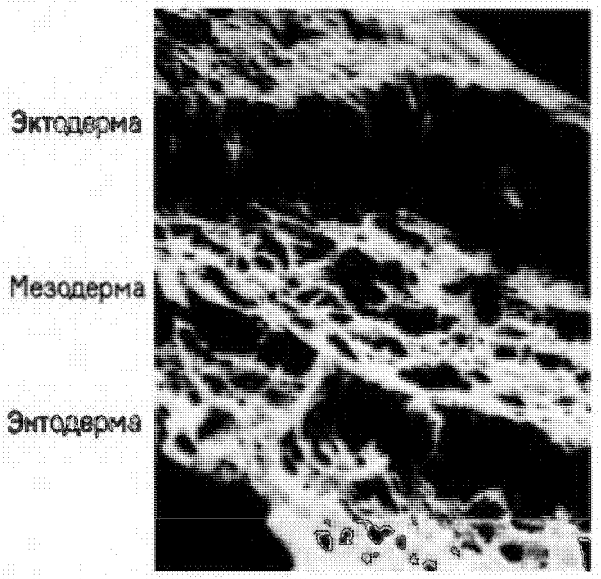


Рис. 6.18. Область мезодермы 6-часового куриного зародыша, образующая сердце (фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа). Мезодерма легко отделяется от эктодермы, но остается прочно связанной с энтодермой. (Из Linask, Lash, 1986; фотография с любезного разрешения К. Linask.)

Пока зародыш проходит период нейруляции, выпячивание складки спланхнической мезодермы приводит к обособлению передней кишки (рис. 6.19). В результате две трубки сердца сближаются и в конце концов сливаются вместе, соединяя эпимиокард в одну трубку. Два эндокарда в течение короткого времени находятся в общей камере, но они также сольются. К этому времени исходно парные целомические камеры объединяются, образуя полость тела, в которой располагается сердце. Билатеральное происхождение сердца можно продемонстрировать результатами эксперимента, в котором хирургическим способом предотвращали слияние мезодермы боковых пластинок (Gräper, 1907; DeHaan, 1959). Опыт приводил к состоянию, известному под названием cardia bifida, при котором с каждой стороны тела формируется отдельное сердце (рис. 6.20). Следующей ступенью формирования сердца является слияние эндокардиальных трубок в единую насосную камеру (см. рис. 6.19, *В*, *Г*). Это слияние происходит у куриного зародыша примерно через 29 ч инкубации, а у человека — через три недели беременности. Неслившиеся задние участки эндокарда становятся отверстиями желточных вен в сердце (рис. 6.21). Эти вены будут нести питательные вещества из желточного мешка в венозный синус. Затем кровь через похожий на створку клапан проходит в предсердный отдел сердца. Сокращения артериального ствола быстро прогоняют кровь в аорту.

Пульсация сердца начинается еще во время слияния парных зачатков. Водителем ритма (пейсмекером) сердечных сокращений является венозный синус. Здесь начинается сокращение, а затем волна сокращений распространяется по трубчатому сердцу. Таким образом, сердце начинает перекачивать кровь еще до того, как завершится образование сложной системы клапанов. Клетки сердечной мышцы обладают собственной внутренне присущей им способностью к сокращению: изолированные мышечные клетки 7-дневного зародыша крысы или куриного зародыша, помещенные в чашку Петри, продолжают сокращаться (Harary, Farley, 1963; DeHaan, 1967). У зародыша эти сокращения начинают регулироваться электрическими стимулами, поступающими из мозжечка через блуждающий нерв. Через 4 дня электрокардиограмма у куриного зародыша становится очень сходной с электрокардиограммой взрослой особи.

Формирование кровеносных сосудов

Потребности развивающегося зародыша отличаются от потребностей взрослого организма, и эти различия отражает его система кровообращения. Во-первых, пища поступает в зародыш не через кишечник, а либо из желтка, либо из плаценты. Во-

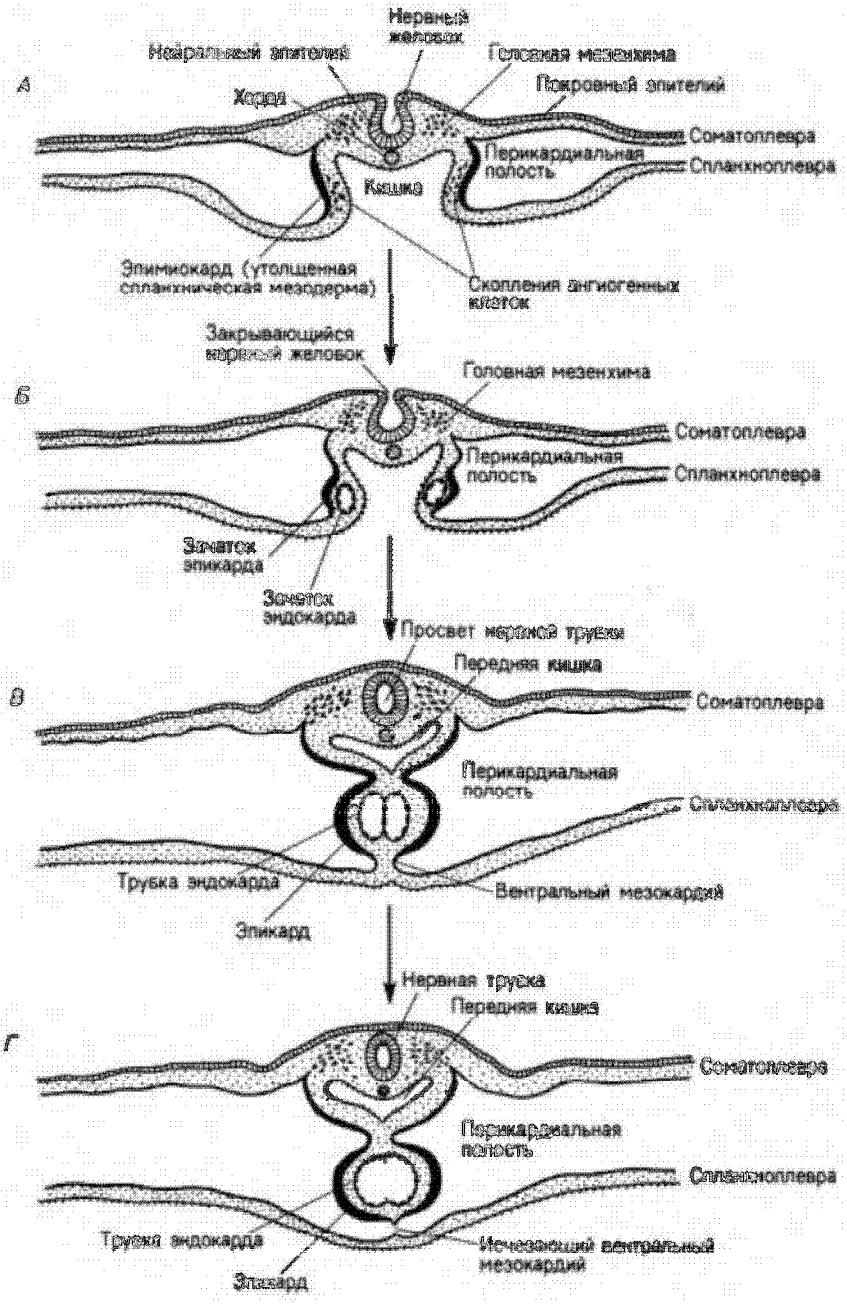


Рис. 6.19. Образование сердца. Схематическое изображение поперечных срезов через область на уровне образования сердца у куриного зародыша в возрасте: *А* — 25 ч; *Б* — 26 ч; *В* — 28 ч; *Г* — 29 ч. (По Carlson, 1981.)

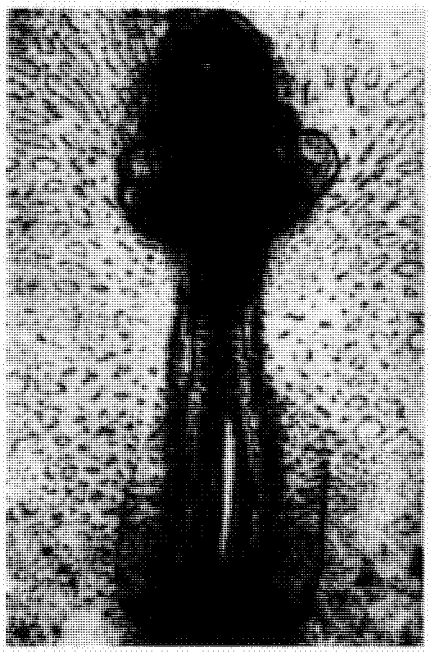


Рис. 6.20. Двойное сердце (cardia bifida) у куриного зародыша. Нарушение развития вызвано экспериментально предотвращением слияния двух зачатков сердца. (С любезного разрешения R. L. DeHaan.)

вторых, процесс дыхания осуществляется не в жабрах или легких, а во внезародышевых оболочках — хорионе или аллантоисе. Таким образом, главные кровеносные сосуды зародыша формируются для обслуживания этих внезародышевых оболочек.

Конструкция кровеносных сосудов помимо необходимости удовлетворять физиологические потребности зародыша диктуется также эволюцией вида. У млекопитающих кровеносные сосуды зародыша будут распространяться по желточному мешку, даже если он не содержит желтка. Кроме того, сосуд, по которому кровь покидает сердце, образует над передней кишкой петли, входящие в спинную аорту. Эти шесть петель — артериальные дуги — образуют арки над глоткой (рис. 6.22). У примитивных рыб эти дуги сохраняются и обеспечивают кровообращение в жабрах, где кровь насыщается кислородом. У взрослых

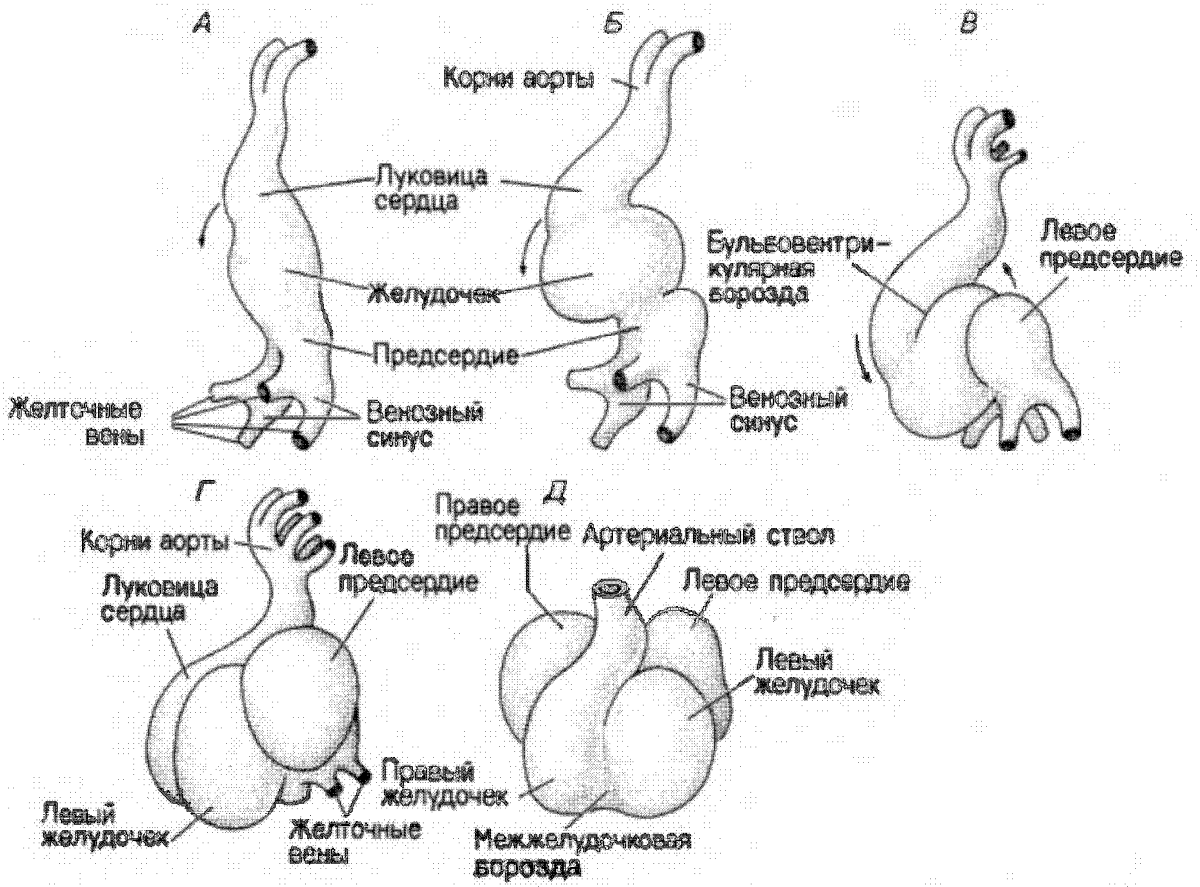


Рис. 6.21. Формирование отделов сердца из простой трубки в течение третьей недели зародышевого развития человека. *А — Г.* Изображение развивающегося сердца с левой стороны. *Д.* Вид спереди. Обратите внимание на то, что имеется два корня аорты, которые разветвляются, образуя дуги аорты (см. рис. 6.22). (По Langman, 1981.)

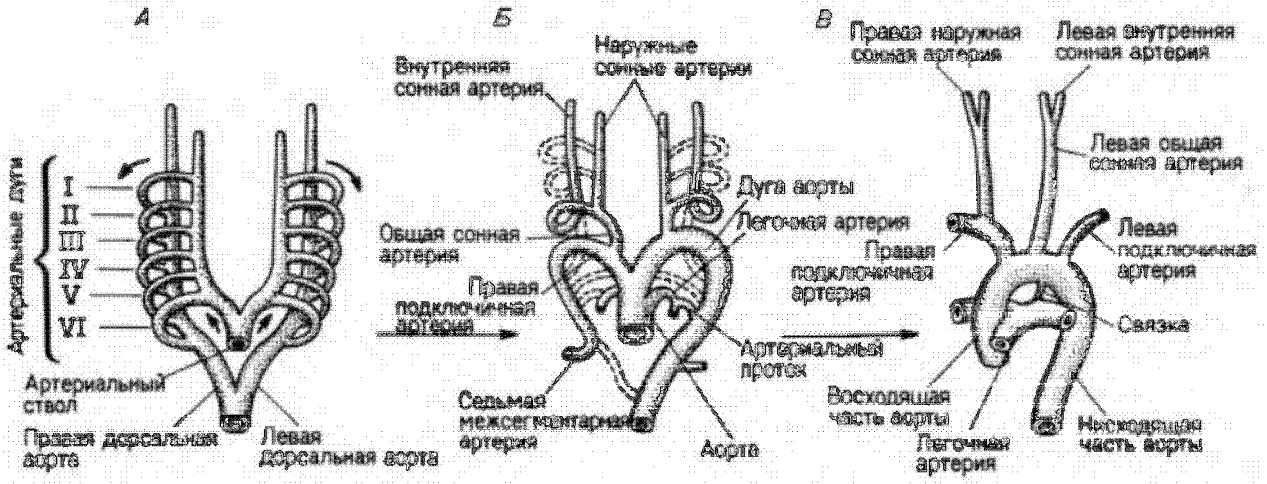


Рис. 6.22. Артериальные дуги у зародыша человека. *А.* Сначала артериальный ствол нагнетает кровь в аорту, которая разветвляется по обе стороны передней кишки. Шесть артериальных дуг получают кровь из вентральной аорты и направляют ее в дорсальную аорту. *Б.* Дуги начинают распадаться или видоизменяться; штриховыми линиями показаны дегенерирующие структуры. *В.* Сохранившиеся дуги изменились, и сформировалась артериальная система взрослого организма. (По Langman, 1981.)

птиц и млекопитающих, у которых этот процесс осуществляется в легких, такая система имеет мало смысла. И хотя у зародышей млекопитающих и птиц формируются все шесть пар артериальных дуг, затем система их упрощается, редуцируясь до единственной дуги. Следовательно, наше эмбриональное развитие отражает эволюцию, хотя физиология зародыша не требует такой структуры.

Главными кровеносными сосудами зародыша являются сосуды, получающие питательные вещества и приносящие их к телу зародыша, а также сосуды, транспортирующие кислород к органам, в которых происходит газообмен, и уносящие от них диоксид углерода. У позвоночных с большим количеством желтка в яйце желточные (пупочно-брыжеечные) вены формируются посредством агрегации спланхнических мезенхимных клеток в ангиогенных скоплениях (кровяных островках), расположенных в стенке желточного мешка (рис. 6.23). Эти клетки впервые обнаруживаются в area opaca на стадии, когда первичная полоска достигает максимальной длины (Pardanaud et al., 1987). Вскоре тяжи мезенхимных клеток изгибаются, образуя двустенные трубки, подобные двойной трубке сердца. Клетки внутренней стенки становятся плоскими эндотелиальными клетками, выстилающими сосуды, а клетки наружной — гладкомышечными клетками. Между слоями эндотелиальных и гладкомышечных клеток располагается базальная мембрана, содержащая коллаген, специфичный для кровеносных сосудов. Было высказано предположение (Murphy, Carlson, 1978), что эта базальная мембрана инициирует дифференцировку клеток разных типов в сосудах. Центральные клетки кровяных островков дифференцируются в зародышевые клетки крови. Кровяные островки по мере их роста сливаются и образуют сеть капилляров, впадающих в две желточные вены, приносящие питательные вещества и клетки крови к формирующемуся сердцу. Система кровообращения, функционирующая между зародышем и желтком, показана на рис. 6.24.

Капиллярные сплетения в системе кровообращения — те области в каждой ткани, где происходит газообмен и обмен питательными веществами,— могут возникать двумя различными путями. В некоторых органах сплетение капилляров возникает независимо от самой ткани (Auerbach et al., 1985). При этом образование капилляров не является результатом прогрессивного утонщения разветвлений главных кровеносных сосудов, растущих от сердца. Вероятнее, что мезодерма каждого из этих органов содержит клетки, называемые ангиобластами, которые преобразуются в капилляры. Эти органоспецифичные сплетения капилляров в конце концов соединяются с выростами главных сосудов. В других органах (а именно в зачатке конечности, в почках и в мозге) существующие кровеносные сосуды проникают между клетками, формирующими орган (Wilson, 1983). Полагают, что органообразующие области секретируют ангиогенные факторы, побуждающие эндотелиальные клетки к митозу и к миграции в эти области. Из мозга трехдневного куриного зародыша был выделен фактор, способствующий миграции эндотелиальных клеток в мозг из кровеносных сосудов, расположенных на поверхности мозга (Risau, 1986).

Зародыши млекопитающих получают пищу и кислород из плаценты. Таким образом, хотя зародыш млекопитающих имеет сосуды, аналогичные желточным венам, пища и кислород поступают в него преимущественно через пупочную вену, которая соединяет зародыш с плацентой (рис. 6.25). Эта вена переносит кровь, содержащую кислород и питательные вещества, обратно в зародыш и образуется из той вены, которая у птиц становится правой желточной веной. Пупочная артерия, несущая кровь с конечными продуктами обмена в плаценту, у куриного зародыша соответствует аллантоисной артерии. Она отходит от каудальной части аорты, проходит вдоль аллантоиса и впадает в плаценту.

У млекопитающих кровь после попадания ее в сердце зародыша перекачивается в дорсальном на-

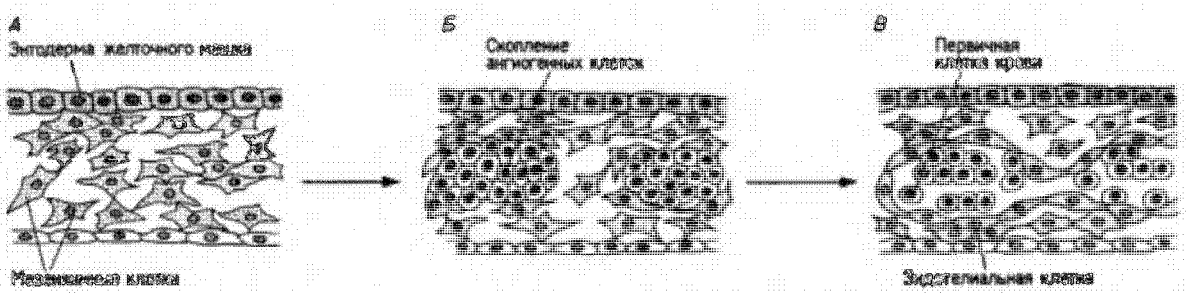


Рис. 6.23. Ангиогенез. Формирование кровеносных сосудов сначала происходит в стенке желточного мешка, где располагается недифференцированная мезенхима (*А*), в которой образуются плотные скопления ангиогенных клеток (*Б*). В центре этих скоплений формируются клетки крови, а на периферии развиваются эндотелиальные клетки кровеносных сосудов (*В*). (По Langman, 1981.)

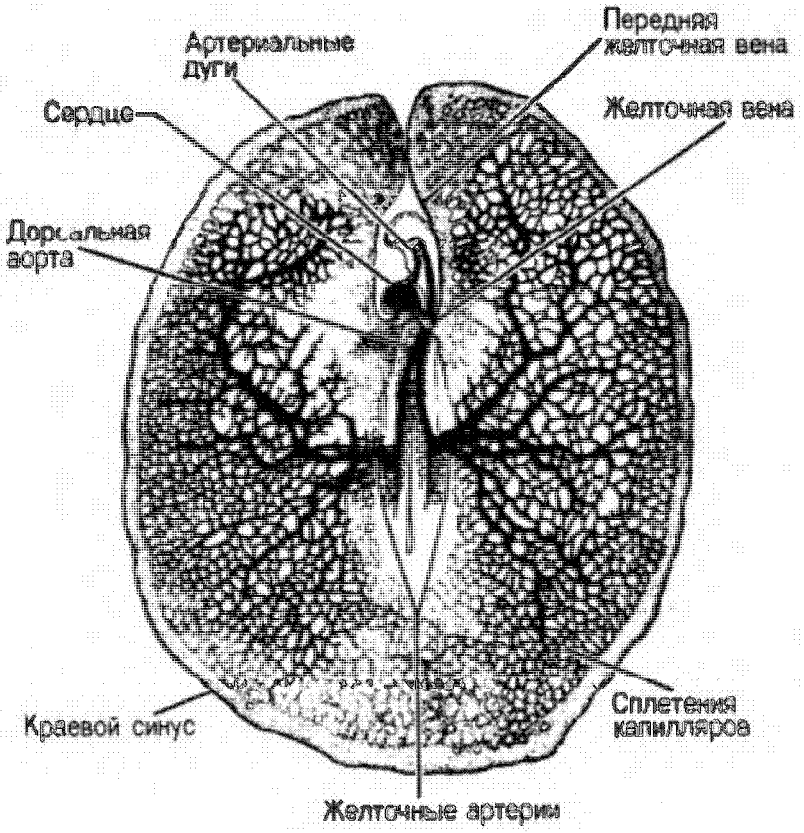


Рис. 6.24. Схема, иллюстрирующая желточную систему кровообращения у 44-часового куриного зародыша (вид с вентральной стороны). Артерии обозначены черным цветом, вены — точками. Краевой синус является наружной границей желточного кровообращения и местом образования клеток крови. (Из Carlson, 1981.)

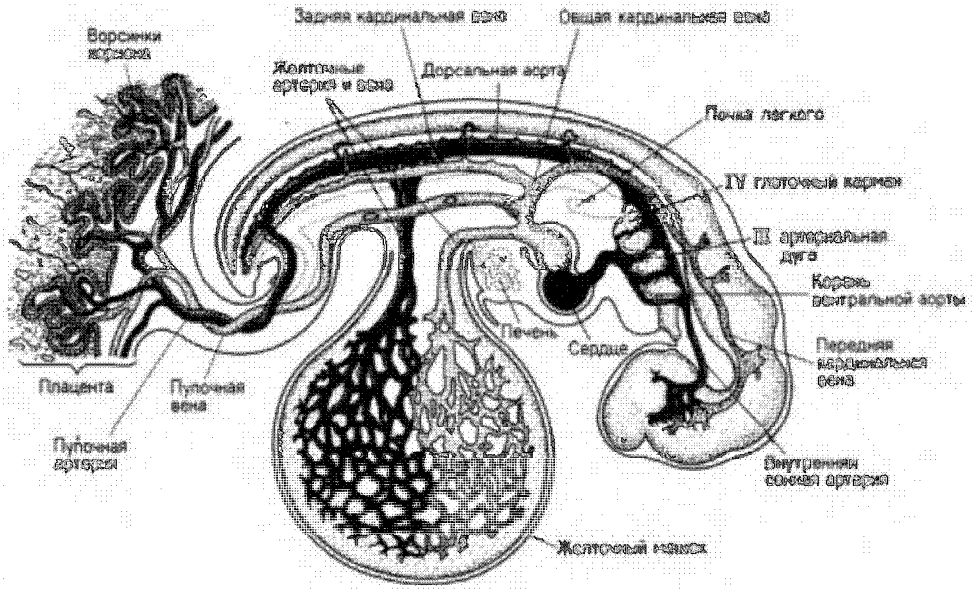


Рис. 6.25. Система кровообращения 4-недельного зародыша человека. Показана только правая сторона, хотя главные кровеносные сосуды на этой стадии парные, т.е. проходят на левой и правой стороне. Артерии обозначены черным цветом. (Из Carlson, 1981.)

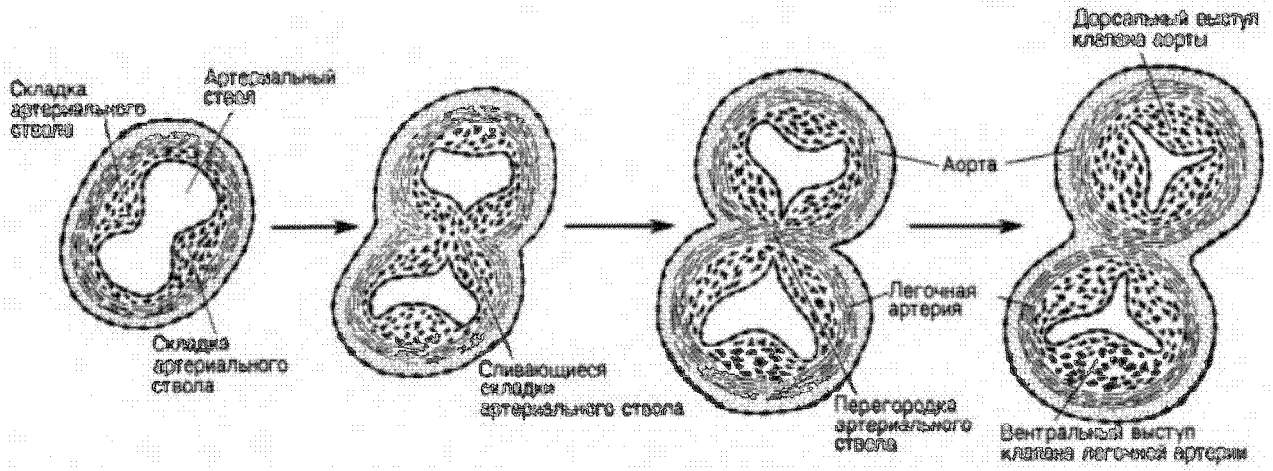


Рис. 6.26. Схемы, иллюстрирующие развитие артериального ствола в аорту и легочные артерии. (По Kramer, 1942.)

правлении по артериальным дугам, окружающим глотку. Четвертая левая дуга — единственная, достигающая аорты у млекопитающих. Четвертая правая дуга образует у них корень подключичной артерии. Третья пара артериальных дуг трансформируется в сонные артерии, снабжающие кровью головной мозг и голову. Из шестой пары дуг формируются легочные артерии, а первая, вторая и пятая пара дегенерируют. Таким образом, аорта и легочная артерия в течение значительного времени развития зародыша открываются в сердце одним общим отверстием. Затем в артериальном стволе образуется перегородка, и в результате он подразделяется на два разных сосуда (рис. 6.26). Только после того, как первый вдох новорожденного животного докажет, что его легкие готовы насыщать кровь кислородом, сердце начнет перекачивать кровь в легочную артерию.

Изменение направления потока крови у новорожденного млекопитающего

Ткани развивающегося плода так же нуждаются в кислороде и питательных веществах, как и ткани взрослого организма. Однако физиология плода чрезвычайно резко отличается от физиологии взрослого. Главное из этих отличий — отсутствие функционирующих легких и кишечника. Весь кислород и все питательные вещества должны поступать к плоду через плаценту. Это обстоятельство ставит перед нами два вопроса: первый — как плод получает кислород из материнской крови, и второй — каким образом меняется направление тока крови

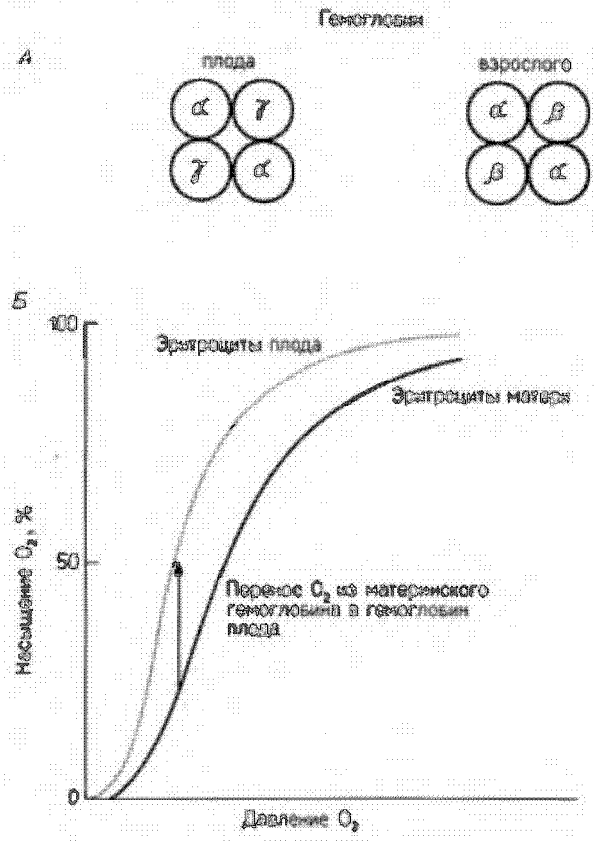


Рис. 6.27. Перенос кислорода от матери к плоду у человека. Субъединицы белка в молекулах гемоглобина взрослого организма и плода отличаются друг от друга (*А*). γ-Цепь гемоглобина плода связывает дифосфоглицерат менее интенсивно, чем β-цепь гемоглобина взрослого. Следовательно, гемоглобин плода может связывать кислород более эффективно, чем гемоглобин взрослого (*Б*). В плаценте, где давление кислорода невелико, происходит перенос кислорода из материнской крови (которая при таком низком давлении отдает кислород тканям) в кровь плода, которая еще может его захватывать. (*Б* — по Stryer, 1981.)

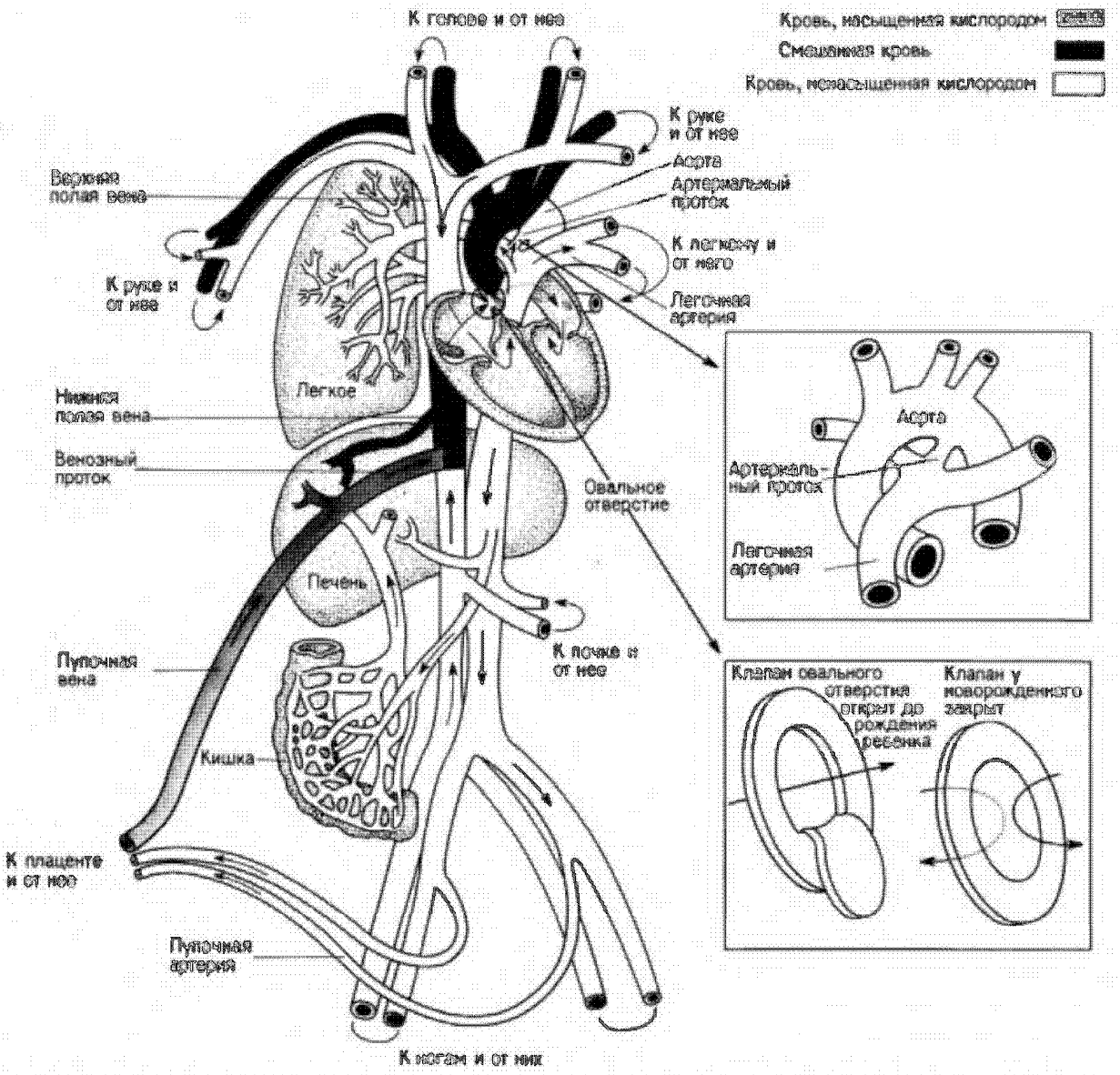


Рис. 6.28. Изменение тока крови при рождении. Заполнение легких воздухом вызывает в них увеличение давления крови и обусловливает изменение направления тока крови у новорожденного младенца. Артериальный проток сжимается, и сообщение аорты с легочными артериями прекращается; закрывается также овальное отверстие — проход между левым и правым предсердиями. Таким образом, легочное кровообращение отделяется от всей системы кровообращения. (По Baker, Allen, 1982.)

так, что она после перерезки пупочного канатика (когда становится необходимым легочное дыхание) начинает поступать в легкие?

В решении проблемы снабжения плода кислородом из материнской крови участвует гемоглобин плода (фетальный гемоглобин). Гемоглобин в эритроцитах плода несколько отличается от гемоглобина взрослого организма. Цепи гемоглобина плода имеют несколько иную последовательность аминокислот. Два из четырех пептидов в цепях гемоглобина плода и взрослого идентичны (α-цепи), но две β-цепи гемоглобина взрослого замещены у плода двумя γ-цепями (рис. 6.27,*А*). Нормальные β-цепи связывают естественный регулятор процесса, способствующий высвобождению кислорода,— дифосфоглицерат. Изоформы γ-цепи не обладают способностью связывать дифосфоглицерат и поэтому имеют более высокое сродство к кислороду.

В плаценте — среде с низким содержанием кислорода — он высвобождается из гемоглобина взрослого. В той же среде гемоглобин плода будет не отдавать, а, напротив, связывать кислород. Это небольшое различие в сродстве к кислороду обусловливает возможность переноса кислорода от матери к плоду (рис. 6.27,*Б*). Миоглобин мышц плода имеет еще более высокое сродство к кислороду, поэтому молекулы кислорода будут переходить из гемоглобина плода в его миоглобин, накапливаться в мышцах и использоваться ими. Гемоглобин плода не вреден для новорожденного, и замещение эритроцитов, содержащих этот гемоглобин, эритроцитами, содержащими гемоглобин взрослого, у человека завершается примерно через полгода после рождения ребенка.

Однако, когда плод уже не получает кислорода от матери, как перестраивается его кровообращение, для того чтобы он смог получать кислород из своих легких? Во время развития плода отверстие (**артериальный проток**) направляет ток крови из легочной артерии в аорту (и, следовательно, в плаценту). Поскольку кровь из легочной вены не возвращается в плод, развивающийся плод млекопитающих должен иметь какой-то иной способ получения крови, которую следует перекачать в левый желудочек. Это осуществляется с помощью **овального отверстия** в перегородке, разделяющей левое и правое предсердия. Кровь может поступить в правое предсердие, пройти через овальное отверстие в левое предсердие, а затем перейти в левый желудочек (рис. 6.28). После первого вдоха новорожденного кислород в крови вызывает сокращение мышц, которые окружают артериальный проток; в результате это отверстие закрывается. Как только возрастает давление крови в левой половине сердца, оно заставляет захлопнуться створку над овальным отверстием, и тем самым происходит разделение двух потоков крови: легочного и общего. Так, когда начинается дыхание, осуществляется переключение потока крови с плаценты на легкие.

Дополнительные сведения и гипотезы

Ангиогенез, индуцированный опухолью

У каждого человека за день происходит до 350 миллиардов митозов (Folkman, 1974). С каждым клеточным делением возрастает возможность того, что образовавшиеся в результате деления клетки станут злокачественными. В действительности же опухоли развиваются крайне редко. Фолкман предположил, что клетки, способные к формированию опухолей, появляются с определенной частотой, но подавляющее большинство их не может реализовать эту способность. Причина этого заключается в том, что для выживания солидной опухоли, как и любой быстро делящейся ткани, необходимы кислород и питательные вещества. Без снабжения кровью потенциальные опухоли либо погибнут, либо будут сохраняться в «дремлющем» (скрытом, латентном) состоянии. Такие «микроопухоли» остаются стабильной клеточной популяцией, в которой погибающие клетки замещаются новыми.

Решающим моментом для превращения этого узелка опухолевых клеток в быстрорастущую опухоль является васкуляризация. На рис. 6.29 показан экспоненциальный рост такой опухоли. Через две недели после васкуляризации первоначальный объем микроопухоли может увеличиться в 16 000 раз. Без снабжения кровью опухоль не растет (Folkman, 1974; Ausprunk, Folkman, 1977). Для того чтобы васкуляризация произошла, в микроопухоли образуются вещества, называемые опухолевыми факторами ангиогенеза. Один такой фактор — **ангиогенин** — был выделен из популяции опухолевых клеток человека; он оказался одноцепочечным белком с молекулярной массой примерно 14 400 дальтон (Fett et al., 1985). Опухолевые факторы ангиогенеза стимулируют митозы эндотелиальных клеток и формирование из этих клеток сосудов, направляющихся к опухоли. Это явление можно продемонстрировать, имплантировав кусочек опухолевой ткани между слоями роговицы кролика или мыши. Роговица не васкуляризована, но она окружена сосудистым ободком (**лимбом**). Опухолевая ткань индуцирует образование кровеносных сосудов, растущих по направлению к опухоли (рис. 6.30). Бóльшая часть других тканей взрослого организма не индуцирует формирования сосудов. (Исключение составляют стимулированные антигенами лимфоциты и макрофаги, секретирующие ангиогенные факторы, которые, вероятно, участвуют в заживлении раны.) Очищенный ангиогенин даже в дозе 3,5 пикомоля может индуцировать обширную васкуляризацию роговицы у кролика. Как только кровеносные сосуды вступают в опухоль, она начинает бурно расти и в конце концов разрушает глаз.

Было показано (Folkman et al., 1983), что некоторые природные вещества подавляют ангиогенез, индуцированный опухолью. Гепарин — сложный полисахарид, обнаруженный в матриксе многочисленных соединительнотканных образований — является мощным ингибитором ангиогенеза, особенно если он вводится вместе со стероидным гормоном кортизоном. У мышей с твердо установленными опухоля-

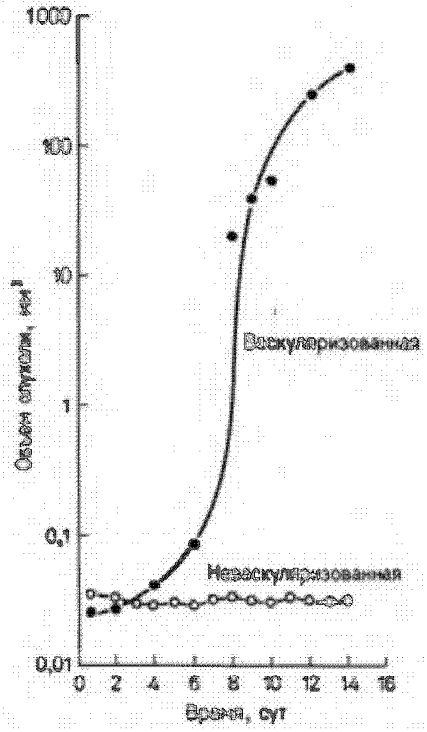


Рис. 6.29. Экспоненциальный рост опухоли после врастания в нее кровеносных сосудов и отсутствие роста в неваскуляризованной опухоли. Опухоли сферической формы были помещены в переднюю камеру глаза кролика; в некоторых опухолях произошла васкуляризация (путем врастания в них капилляров из наружной оболочки), тогда как другие остались неваскуляризованными. (По Folkman, 1974.)

ми, получающих инъекции гепарина и кортизона, эти опухоли заметно регрессируют (уменьшаются). Комбинация гепарина с кортизоном подавляет и нормальный ангиогенез у куриных зародышей.

Помимо того, что новообразованные кровеносные сосуды снабжают опухоли кислородом и питательными веществами, они также представляют собой путь, который облегчает миграцию опухолевых клеток к новым местам и тем самым формирование вторичных опухолей. Этот процесс называется **метастазированием**. В результате бо́льшая часть больных со злокачественными опухолями умирает не от исходной (первичной) опухоли, а от многочисленных вторичных опухолей, распространяющихся путем метастазирования. Чтобы попасть в кровеносный сосуд, опухолевая клетка должна лизировать (растворить) коллагеновый матрикс, окружающий новые капилляры. Полагают, что лизис осуществляется с помощью секреции протеолитического фермента, называемого **активатором плазминогена**. Этот фермент играет важную роль в имплантации бластоцисты в матку (см. гл. 3). Опухолевые клетки используют тот же самый фермент, чтобы проделать отверстие в коллагеновом матриксе, окружающем кровеносные сосуды. Синтез активатора плазминогена коррелирует со способностью опухоли метастазировать; было обнаружено, что антитела против этого фермента подавляют рост метастазов у человека (Ossowski, Reich, 1983). Попав на эндотелиальные клетки капилляров, метастазирующая опухолевая клетка может протянуться между ними и попасть в кровоток (Kramer, Nicolson, 1979). На рис. 6.31 по-

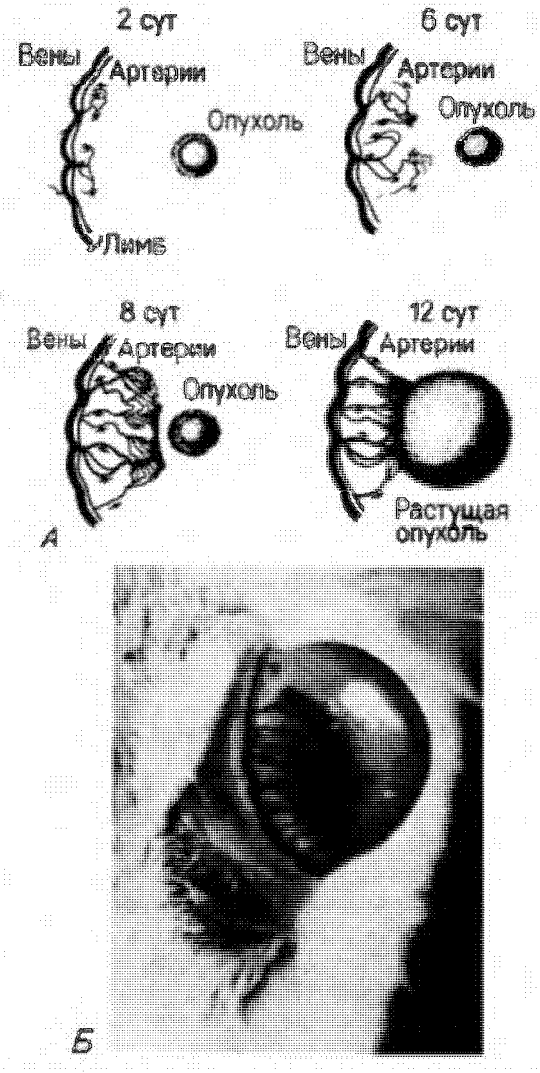


Рис. 6.30. Новый кровеносный сосуд, растущий к опухоли, имплантированной в роговицу глаза белой мыши. *А*. Последовательность событий, ведущих к васкуляризации злокачественной аденокарциномы молочной железы на сроках 2, 6, 8 и 12 сут. *Б*. Фотография живой роговицы белой мыши с новыми сосудами, врастающими в трансплантированную опухоль. (*А* — из Muthukkaruppan, Auerbach, 1979; *Б* — фотография с любезного разрешения R. Auerbach.)

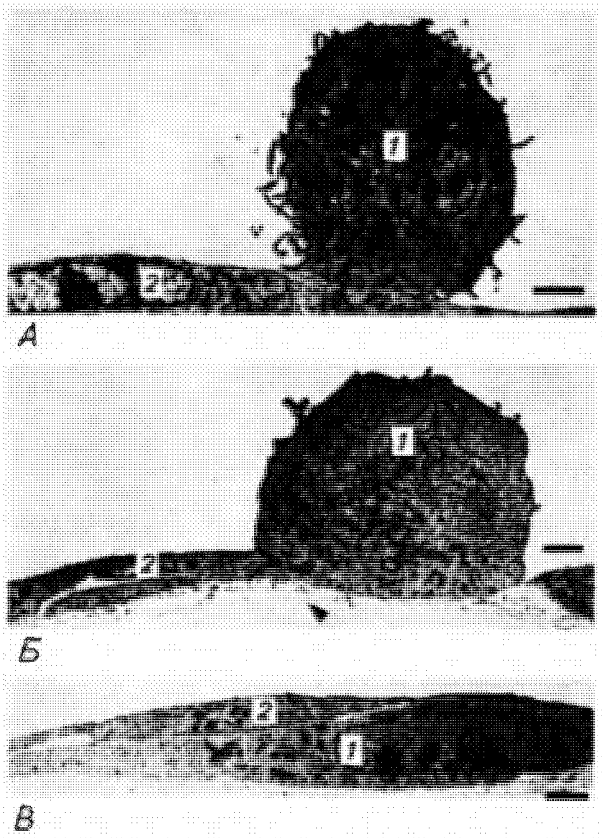


Рис. 6.31. Прикрепление (*А*), инвазия (*Б*) и миграция (*В*) опухолевых клеток меланомы (*1*) под эндотелиальной клеткой сосуда (*2*). Клетки злокачественной меланомы, помещенные на эндотелиальные клетки, растущие в культуре, фотографировали через 0,5, 1 и 3 ч. (Из Kramer, Nicolson, 1979; фотографии с любезного разрешения G. Nicolson.)

казано, как метастазирующая клетка злокачественной меланомы прокладывает себе путь внутрь сосуда между эндотелиальными клетками.

Для метастазирования необходимо, чтобы клетка была способна перемещаться от одного места к другому. Подобно эмбриональным клеткам, многие опухолевые клетки нуждаются в поверхности, по которой могут мигрировать, а некоторые из этих клеток движутся по внеклеточному матриксу, образованному клетками эндотелия кровеносных сосудов (Nicolson et al., 1981). Эта миграция, как и миграция многих эмбриональных клеток, по-видимому, осуществляется с помощью фибронектина. У мышей, которым инъецированы опухолевые клетки определенной линии меланомы, эти клетки специфически мигрируют в легкие, где и формируют вторичные опухоли (рис. 6.32). Если клетки меланомы предварительно инкубируют в среде, содержащей фибронектин или его участок, связывающийся с клетками (так чтобы клетка не могла связываться с собственным фибронектином хозяина), то около 90% инъецированных клеток не достигают легких (Humphries et al., 1986).

По способности быстро делиться, секретировать активатор плазминогена и ангиогенный фактор, а также по характеру миграции опухолевые клетки сходны с нормальными эмбриональными клетками. Нередко опухолевые клетки — это клетки взрослого организма, но вернувшиеся к эмбриональной стадии своего существования. Эти данные позволяли предложить новые подходы к терапии рака, включая введение агентов, которые предотвращают ангиогенез или действительно способствуют дифференцировке «эмбриональной» опухолевой клетки в нормальную «взрослую» клетку (Sachs, 1978; Jimenez, Yunis, 1987).

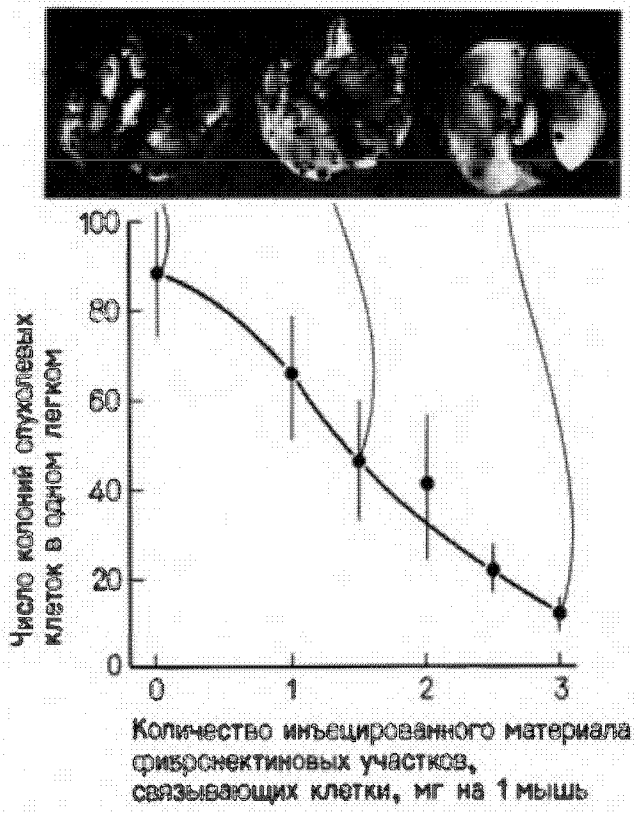


Рис. 6.32. Метастазирование злокачественной меланомы. Способность отдельных клеток метастазировать в легкие подавлена связывающими клетки фибронектиновыми участками. Клетки меланомы инъецировали мышам в хвостовую вену. Спустя 14 сут животных усыпляли с помощью эфира и подсчитывали число метастазов в легкое. Каждая точка на кривой — среднее для 8 мышей. (Из Humphries, 1986; фотографии с любезного разрешения K. M. Yamada.)

Развитие клеток крови

Полипотентные стволовые клетки и их микроокружение

Бо́льшая часть тканей позвоночных животных состоит из дифференцированных клеток, которые не делятся. Миобласты, например, образуют быстроделящуюся популяцию клеток до тех пор, пока не объединятся в мышечные трубочки. Однако некоторые ткани, такие, как эпидермис, кишечный эпителий и клетки крови, обладают особой «эмбриональной» клеточной популяцией. В соответствии с этим их клеточный состав постоянно меняется даже у взрослых животных. Это явление наиболее наглядно можно продемонстрировать на примере эритроцитов млекопитающих: эритроцит у них лишен ядра, и продолжительность его жизни в кровяном русле у человека равна всего лишь 120 сут. В норме у человека ежедневно погибает $3 \cdot 10^{11}$ эритроцитов, но они замещаются таким же количеством новых (Hay, 1966). Источником непрерывного формирования новых эритроцитов (так же как и клеток крови других типов) служат **кроветворные («формирующие кровь») стволовые клетки**.

Стволовые клетки представляют собой загадочный и еще мало понятный феномен. От них в буквальном смысле слова зависит вся наша жизнь. Стволовая клетка — это клетка, способная к интенсивной пролиферации; она дает начало таким же стволовым клеткам (самоподдержание) и более дифференцированному потомству (Siminovitch et al., 1963). Так, одна стволовая клетка может дать начало клону, содержащему миллионы дифференцированных клеток, а также небольшому числу стволовых клеток. Тем самым стволовые клетки обеспечивают непрерывную пролиферацию клеток-предшественников тканей на протяжении длительного времени. Кроветворные стволовые клетки млекопитающих мигрируют в костный мозг, где сохраняются в течение всей жизни животного. Стволовые клетки имеются и для таких непрерывно возобновляющихся тканей, как эпидермис, а также для возобновления числа сперматозоидов в семенниках. Некоторые стволовые клетки, например стволовые клетки скелетной мускулатуры, существуют, вероятно, в течение развития плода (Quinn et al., 1985). Представление о судьбе стволовой клетки дает рис. 6.33.

У млекопитающих и птиц имеется, по-видимому, общая **полипотентная кроветворная клетка**, которая может дать начало эритроцитам, гранулоцитам, макрофагам, тромбоцитам и иммунокомпетентным клеткам — лимфоцитам. Существование таких стволовых клеток было показано исследователями (Till, McCulloch, 1961), инъецировавшими клетки костного мозга облученным летальной дозой мышам той же генетической линии, что и доноры костного мозга. Некоторые из этих клеток образовали обособленные узелки (колонии) в селезенке хозяина (рис. 6.34). Результаты микроскопического исследования показали, что эти узелки содержат клетки-предшественники эритроцитов, гранулоцитов и тромбоцитов. Следовательно, единичная клетка из костного мозга способна формировать клетки крови многих различных типов. Ответственная за это клетка была названа **КОЕ-с** — *колониеобразующей единицей* в селезенке. В дальнейших исследованиях с использованием хромосомных маркеров было подтверждено, что различные типы клеток в пределах колонии формируются единичной КОЕ-с. В этих исследованиях клетки костного мозга облучали так, что выживали лишь немногие клетки; значительная часть их имела хромосомные аномалии, четко выявляемые при изучении с помощью светового микроскопа. Когда такие облученные клетки костного мозга инъецировали мыши, у которой собственные кроветворные клетки были разрушены, каждая клетка селезеночной колонии, будь то клетка-предшественник гранулоцита или эритроцита, имела ту же самую хромосомную аномалию (Becker et al., 1963). Важную часть концепции стволовой клетки составляет требование, в соответствии с которым стволовая клетка помимо

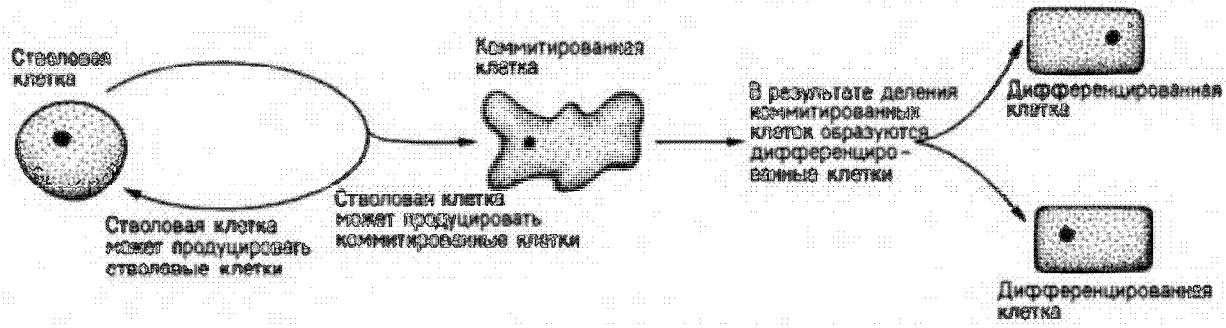


Рис. 6.33. Схема, иллюстрирующая динамику пролиферации и дифференцировки стволовой клетки.

Рис. 6.34. Изолированные колонии кроветворных клеток. Если облученной мыши инъецируют костный мозг, содержащий кроветворные стволовые клетки, то на поверхности селезенки этой мыши видны отдельные колонии кроветворных клеток. В селезенке справа таких колоний больше, чем в селезенке слева. (Из Till, 1981; фотография с любезного разрешения J. E. Till.)

образования дифференцированных клеточных типов должна воспроизводить также себе подобные стволовые клетки. Это обнаружено и в данном случае. Когда колонии клеток в селезенке, образовавшиеся из единственной клетки КОЕ-с, были ресуспендированы и инъецированы в другую мышь, у нее в селезенке возникли множественные колонии (Jurišková, Tkadlečeк, 1965; Humphries et al., 1979). Следовательно, мы убеждаемся в том, что единичная клетка костного мозга может формировать многочисленные разные типы клеток, а также и воспроизводить такие же, как она сама, клетки; другими словами, КОЕ-с является полипотентной стволовой кроветворной клеткой.

Из приведенных выше данных следует, что, хотя КОЕ-с может давать начало многим типам форменных элементов крови, она неспособна к образованию лимфоцитов. Этот вывод опирается на опыты, в которых было показано (Abramson et al., 1977), что КОЕ-с и лимфоциты происходят из стволовых клеток разных типов. Когда мышам, имеющим наследственный дефицит кроветворных клеток, вводили облученные клетки костного мозга, одинаковые хромосомные аномалии обнаруживались как в клетках из селезеночных колоний, так и в лимфоцитах, циркулирующих в крови. Результаты, полученные Абрамсон и ее коллегами, были подтверждены в опытах, когда мышам вместе с клетками костного мозга инъецировали определенные вирусы, которые случайным образом включались в различные участки ДНК клетки. Одни и те же гены вирусного происхождения были обнаружены в одинаковых областях генома и в лимфоцитах, и в клетках крови (Keller et al., 1985; Lemischka et al., 1986). На рис. 6.35 суммированы результаты нескольких исследований. Первой полипотентной кроветворной стволовой клеткой является КОЕ-м,л (колониеобразующая единица для миелоцитного и лимфоидного ряда). Эта клетка дает начало КОЕ-с (клетки крови) и КОЕ-л (лимфоциты). КОЕ-с и КОЕ-л также представляют собой полипотентные стволовые клетки, потому что их потомство может дифференцироваться в многочисленные клеточные типы. Однако непосредственное потомство КОЕ-с представляет собой *коммитированные* стволовые клетки. Каждая из них помимо воспроизведения себе подобных дает начало только одному типу клеток. Например БОЕ-э (бурстообразующие клетки эритроидного ряда) формируются из КОЕ-с и могут дать только один тип клеток в дополнение к себе подобным. Эта новая клетка называется КОЕ-э (колониеобразующая единица эритроидного ряда); она способна в ответ на действие гормона **эритропоэтина** образовывать первую четко определяемую дифференцированную клетку этого ряда — **проэритробласт**. Эритропоэтин является гликопротеином, который быстро индуцирует синтез глобиновой мРНК (Krantz, Goldwasser, 1965). Он синтезируется главным образом в почках, и на его синтез влияют окружающие условия. Если уровень насыщения крови кислородом снижается, увеличивается количество эритропоэтина, и это приводит к увеличению образования эритроцитов. Проэритробласт превращается в **эритробласт**, синтезирующий огромные количества гемоглобина. В конце концов эритробласт у млекопитающих выталкивает ядро и превращается в **ретикулоцит**. Ретикулоциты уже не могут синтезировать глобиновую мРНК, но способны еще транслировать имеющиеся в клетке мРНК. Конечная стадия дифференцировки проэритробласта — **эритроцит**. Он не делится и не синтезирует ни РНК, ни белок. Такая клетка покидает костный мозг, чтобы выполнить свою роль поставщика кислорода к тканям тела. Клетки КОЕ-л, по-видимому, развиваются сходным образом, а именно полипотентная стволовая клетка продуцирует другие стволовые клетки, каждая из которых коммитирована к дифференцировке определенного типа лимфоцитов. Так, имеются коммитированные стволовые клетки для тромбоцитов и коммитированные стволовые клетки для гранулоцитов и макрофагов.

Молекулы, влияющие на дифференцировку клеток крови, относятся к классу растворимых белков, называемых **гемопоэтическими факторами роста**, одним из которых является эритропоэтин. Некоторые

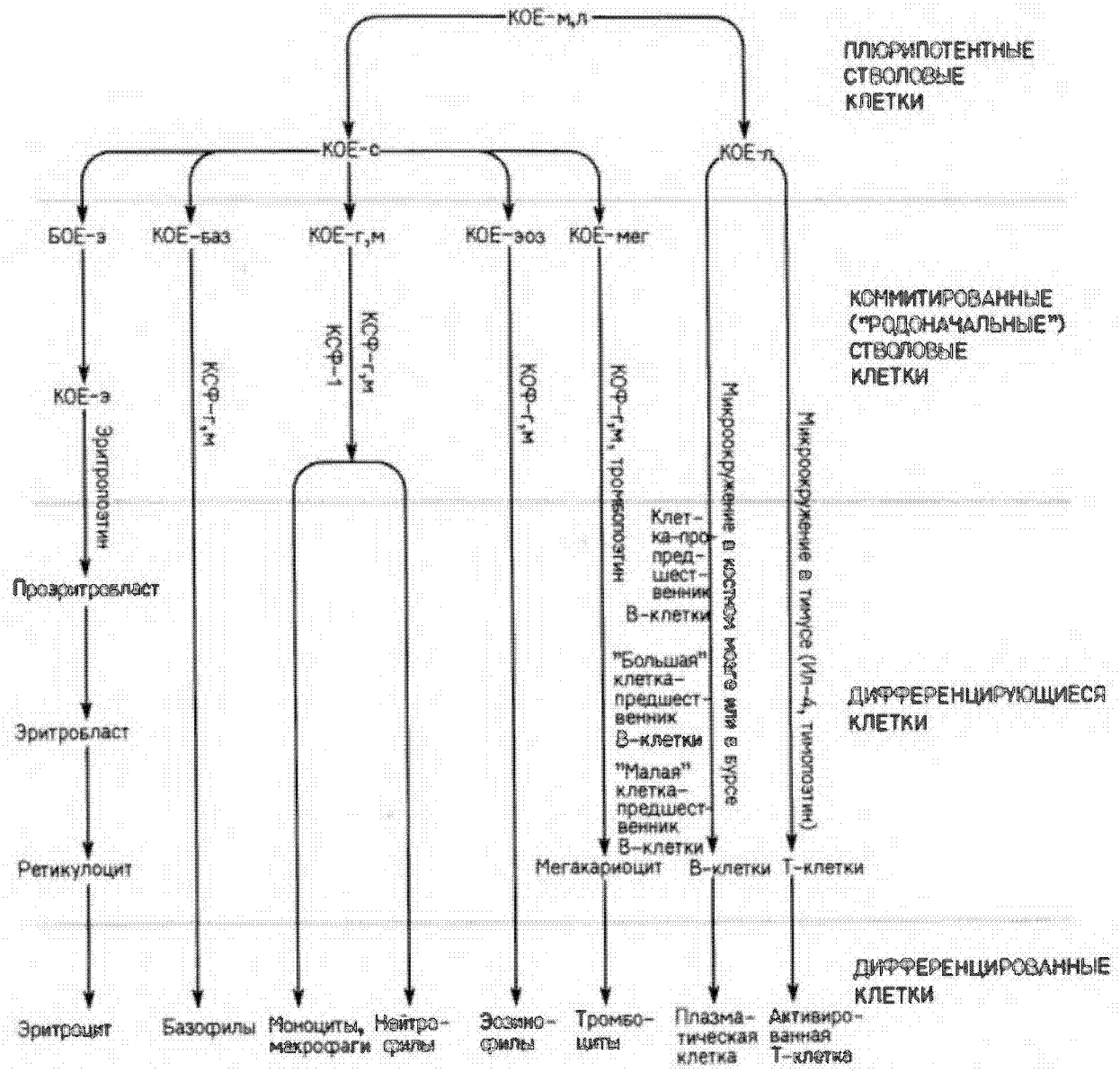


Рис. 6.35. Схема, иллюстрирующая происхождение форменных элементов крови и лимфы у млекопитающих. Факторы роста перечислены в табл. 6.1, за исключением ФР-В-клеток и ФД-В-клеток (соответственно факторов роста и дифференцировки В-клеток), которые обсуждаются в гл. 16. (По Quesenberry, Levitt, 1979; Whetton, Dexter, 1986; Muller-Sieburg et al., 1986; Clark, Kamen, 1987.) (В четвертой и пятой строках по вертикали вместо КОФ-г,м следует читать КСФ-г,м.)

из этих факторов стимулируют деление и созревание более примитивных стволовых клеток, тем самым увеличивая число форменных элементов крови всех типов. Другие факторы являются специфичными только для определенных клеточных линий. Способность клетки реагировать на эти факторы зависит от присутствия рецепторов для них на ее поверхности. Число таких рецепторов очень мало. На поверхности КОЕ-э имеется всего лишь около 700 рецепторов для эритропоэтина; большинство других кроветворных клеток характеризуется столь же низким числом рецепторов для факторов роста. (Исключение составляют рецепторы для колониестимулирующего фактора (КСФ-1), которых может быть в некоторых клетках-предшественниках до 73 000 на клетку.) Некоторые из известных гемопоэтических факторов роста и их клеточные мишени перечислены в табл. 6.1.

Таблица 6.1. Гемопоэтические факторы роста[1]

Факторы роста	Вид	Реагирующие клетки
Интерлейкин-3	Мышь	КОЕ-с, БОЕ-э КОЕ-г,м (клетка, образующая колонию гранулоцитов и макрофагов) КОЕ-эоз (клетка, образующая колонию эозинофилов) КОЕ-мег (клетка, образующая колонию мегакариоцитов) Клетки-предшественники эритроидного ряда Тучные клетки
Гемопоэтин-1	Мышь, человек	Малоэффективен сам по себе, но усиливает способность интерлейкина-3 стимулировать КОЕ-с
КСФ-г (фактор, стимулирующий образование колоний гранулоцитов)	Человек	Клетки-предшественники нейтрофилов
КСФ-1 (колониестимулирующий фактор-1)	Мышь, человек	Некоторые КОЕ-г,м клетки Предшественники макрофагов Зрелые макрофаги
Фактор, стимулирующий образование колоний гранулоцитов и макрофагов (КСФ-г,м)	Мышь	КОЕ-г,м КОЕ-эоз КОЕ-мег
Эритропоэтин	Мышь, человек	КОЕ-э
Интерлейкин-2	Мышь	Т-клетки, В-клетки
Интерлейкин-4	Мышь	Т-клетки, В-клетки
Полипоэтин	Человек	КОЕ-с КОЕ-г,м БОЕ-э
Бурсин	Курица	Клетки-предшественники В-клеток
Тимопоэтин	Курица, мышь	Клетки-предшественники Т-клеток

[1] Audhya et al. (1986); Clark, Kamen (1987); Palaszios et al. (1987); Stanley et al. (1986); Whetton, Dexter (1986).

По меньшей мере часть таких факторов синтезируется клетками стромы (фибробластами или другими элементами соединительной ткани) самого костного мозга. В строме селезенки находятся клетки, коммитированные преимущественно к развитию клеток эритроидного ряда. В костном мозге преобладают клетки, развивающиеся в гранулоциты. Было показано (Wolf, Trentin, 1968), что эти результаты обусловлены короткодистантными взаимодействиями. Исследователи помещали фрагменты костного мозга в селезенку мыши, а затем инъецировали ей стволовые клетки. Колонии клеток в селезенке были преимущественно эритроидными, тогда как в костном мозге — преимущественно гранулоцитарными. Клетки же в колонии, развившейся из стволовой клетки, которая оказалась у края фрагмента костного мозга, в части колонии, находившейся в селезенке, были главным образом эритроидными, а в части, находившейся в костном мозге,— преимущественно гранулоцитарными. Области детерминации КОЕ называют **гемопоэтическим индуцирующим микроокружением**.

Бесклеточная культуральная среда, в которой росли клетки стромы, может поддерживать рост лимфоцитов и клеток-предшественников лейкоцитов, пролиферация которых зависит от определенных факторов роста (Hunt et al., 1987; Whitlock et al., 1987). Кроме того, эти факторы могут действовать, связываясь с внеклеточным матриксом в специфических участках костного мозга. Было показано (Gordon et al., 1987), что колониестимулирующий фактор (КСФ-г,м) связывается с гликозаминогликанами стромы костного мозга. Таким способом факторы роста могут компартментализоваться, стимулируя стволовые клетки в одной области к дифференцировке в один клеточный тип, а стволовые клетки того же самого типа в другой области — к дифференцировке в клетки другого типа.

Локализация гемопоэза (кроветворения)

У взрослых особей большинства млекопитающих главным источником клеток крови является костный мозг. (У некоторых видов, например у мышей, в кроветворении принимает участие и селезенка.) Однако результаты многочисленных опытов показывают, что кроветворные стволовые клетки не образуются ни в костном мозге, ни в селезенке. Они мигрируют в эти органы из других областей зародыша. На самом деле кроветворные стволовые клетки, по-видимому, поступают в них *не из собственно зародыша*, а из желточного мешка. Когда Мур с сотрудниками удаляли желточный мешок у зародышей мыши на стадиях до образования сомитов, у этих зародышей не формировались клетки крови, а в культивируемых изолированных желточных мешках наблюдались эритропоэз и образование КОЕ-с. Было показано (Moore, Metcalfe, 1970), что максимальная активность КОЕ-с в желточном мешке наблюдается на 10-й день развития. В противо-

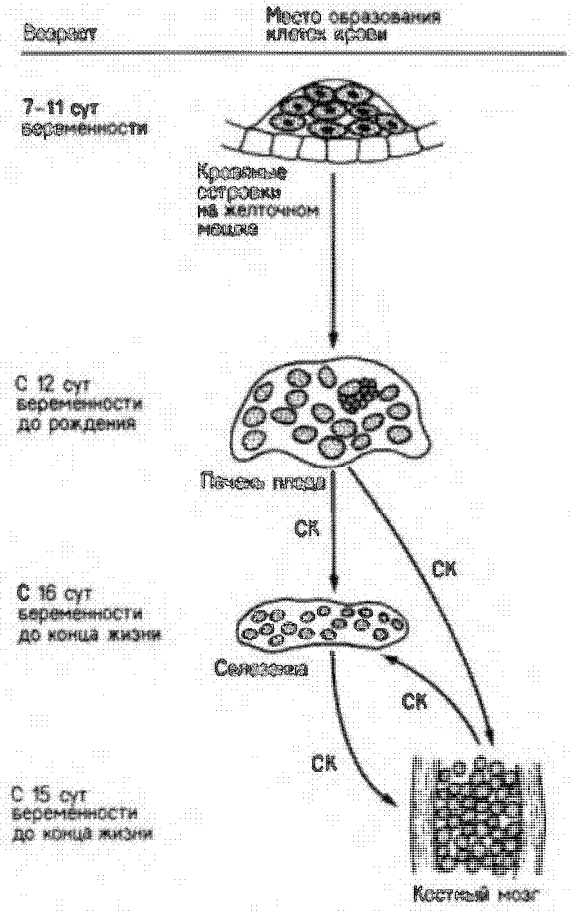


Рис. 6.36. Последовательность смены мест кроветворения у зародышей мыши. Стрелками показаны возможные пути миграции полипотентных кроветворных стволовых клеток (*СК*).

положность этому наличие стволовых клеток в печени зародыша начинает выявляться только после 11 сут. Эти исследователи утверждали, что стволовые клетки мигрируют из желточного мешка в печень зародыша, а затем в селезенку и костный мозг. Клетки желточного мешка зародыша также выполняют функции лимфоцитов до того, как начнет выявляться какая-либо активность стволовых клеток в собственно зародыше (Hofman, Globerson, 1973; Dahl et al., 1989). Таким образом, считается, что исходная полипотентная стволовая клетка образуется в пределах желточного мешка и мигрирует из него сначала в печень, а затем в кроветворные органы взрослой особи (рис. 6.36).

Современные данные подтверждают представление о том, что стволовые клетки в костном мозге взрослой особи происходят из потомков этих эмбриональных стволовых клеток. Ванг и др. (Wong et al., 1986) культивировали стволовые клетки из желточного мешка мыши и обнаружили, что некоторые из них дают начало эритроцитам, в которых синтезируется гемоглобин взрослого типа, а не эмбриональный. Напротив, результаты изучения формирования клеток крови у человека (Peschle et al., 1985) показали, что клетки печени 6-недельного зародыша совершенно так же, как клетки желточного мешка 5-недельного зародыша, синтезируют эмбриональные формы гемоглобина (рис. 6.37).

Однако другая группа исследователей (Rossant et al., 1986) утверждает, что миграция стволовых клеток может быть не столь простой, как полагали ранее. Для того чтобы определить идентичность клеточных клонов, эти исследователи использовали химерных мышей; оказалось, что большинство, если не все клоны кроветворных клеток в постнатальной печени, продуцировали только *одну* линию клеток.

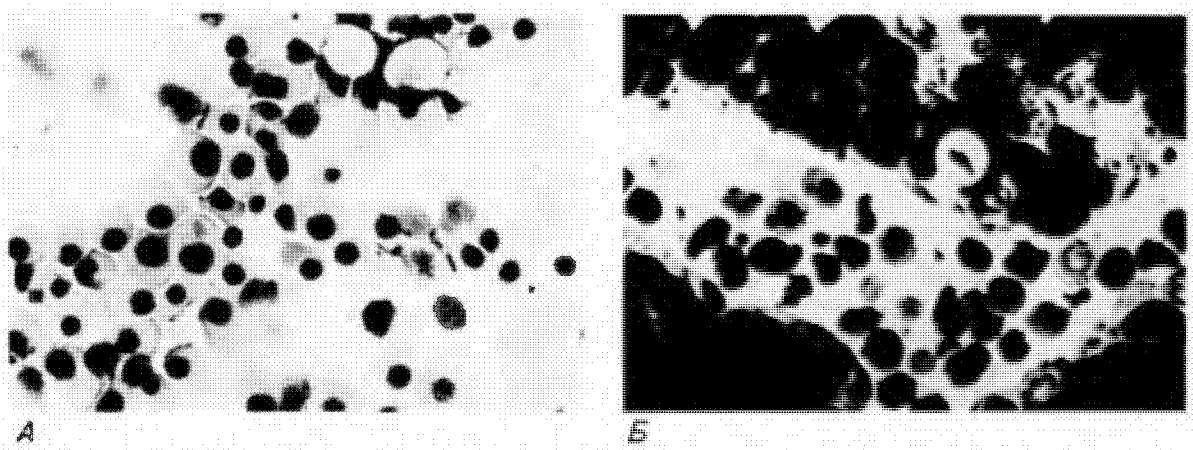


Рис. 6.37. Ранние клетки крови человека. *А*. Эритробласты из желточного мешка на сроке 5 нед после зачатия. *Б*. Срез печени 6-недельного зародыша человека; видны крупные красные кровяные клетки (мегалобласты). (Из Peschle et al., 1985; фотографии с любезного разрешения C. Peschle.)

Другими словами, данный клон был либо миелоидным, либо лимфоидным клоном. Этот результат свидетельствует либо о том, что стволовые клетки, которые мигрируют в печень из желточного мешка, являются коммитированными, а не полипотентными, либо о том, что за 17 дней, в течение которых стволовые клетки находились в печени, одна клеточная линия стала преобладающей (доминирующей). Дальнейшие исследования, по-видимому, позволят сделать выбор между этими двумя в равной степени увлекательными возможностями.

Полагают, что сходная ситуация наблюдается у зародышей птиц, но у них, видимо, имеются два разных источника кроветворных стволовых клеток. Первый, как и у зародышей млекопитающих, локализован в стенке желточного мешка. Эти клетки, однако, представляют собой временную популяцию. Главным источником стволовых клеток являются локальные островки, которые формируются в собственно зародыше. Это открытие было сделано в серии изящных опытов Дитерлен-Ливр, которая пересаживала бластодерму японского перепела на желточный мешок куриного зародыша (рис. 6.38). Клетки курицы легко отличить от клеток перепела, ядра которых значительно сильнее окрашиваются и поэтому служат постоянным маркером для различения клеток двух типов. Использование таких «химерных желточных мешков» показало (Dieterlen-Lievre, Martin, 1981), что стволовые клетки желточного мешка не поставляют клетки взрослому животному; настоящие стволовые клетки формируются в узелках мезодермы, которая выстилает брыжейки и главные кровеносные сосуды. До сих пор считают, что у млекопитающих желточный мешок является

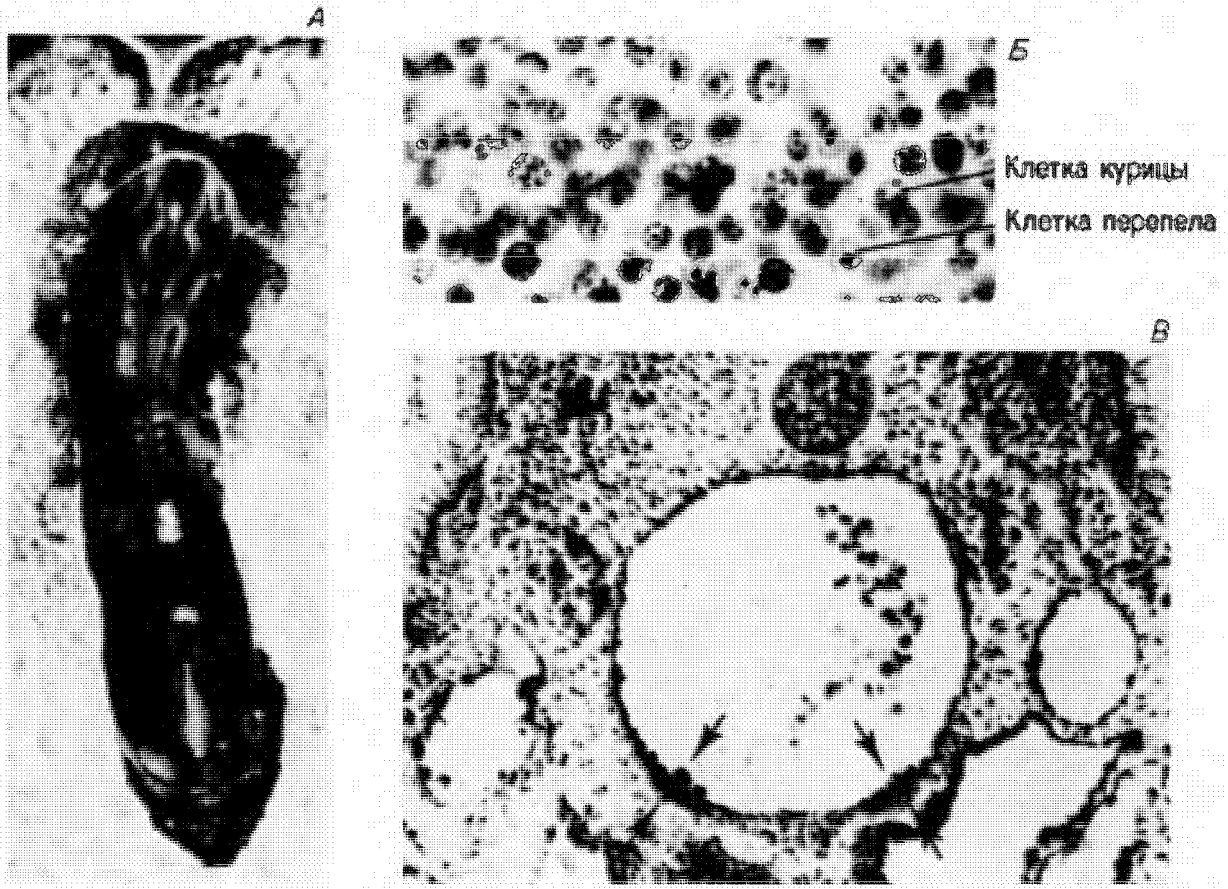


Рис. 6.38. Маркировка клеток крови посредством создания химер «курица — перепел». *А*. Фотография «химерного желточного мешка», т.е. бластодермы куриного зародыша, пересаженной на желточный мешок перепела. *Б*. Фотография, на которой видны клетки курицы и перепела в тимусе химерного животного, различающиеся по окраске ядер. Все лимфоидные клетки куриного происхождения, тогда как структурные клетки тимуса происходят из клеток бластодермы перепела. *Б*. Срез аорты трехдневного куриного зародыша; стрелками указаны клетки, которые дадут начало кроветворным стволовым клеткам. Если клетки из этой области взять у зародышей перепела и поместить на куриный зародыш, то кровь у куриного зародыша будет кровью перепела. (Из Martin et al., 1978; Dieterlen-Lievre, Martin, 1981; фотографии с любезного разрешения F. Dieterlen-Lievre.)

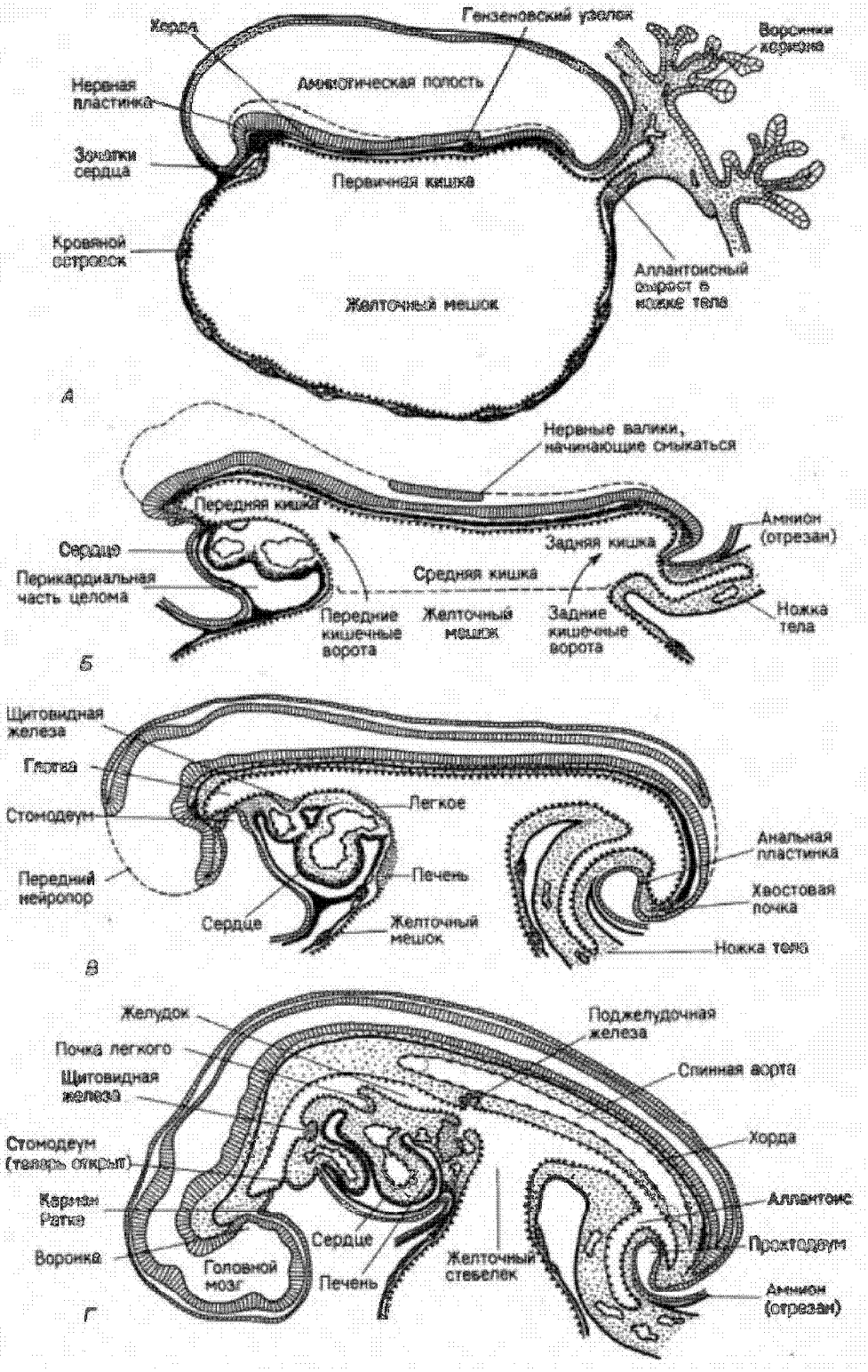


Рис. 6.39. Формирование пищеварительной системы у человека. Схематические изображения сагиттальных срезов зародышей в возрасте примерно: *А* — 16 сут; *Б* — 18 сут; *В* — 22 сут; *Г* — 28 сут. (Из Carlson, 1981.)

источником всех кроветворных стволовых клеток; однако результаты некоторых исследований (Kubai, Auerbach, 1983) показывают, что эти клетки-предшественники стволовых клеток желточного мешка сами могут происходить из стволовых клеток, которые находятся в выстилке брюшной полости.

ЭНТОДЕРМА

Из энтодермы развиваются органы пищеварения и связанные с ними железы, а также органы дыхания (рис. 6.39). По мере того как концы энтодермы загибаются в вентральном направлении и перемещаются к центру зародыша, формируются передняя кишка и задняя кишка, представляющие собой части будущей пищеварительной трубки. На месте будущего ротового отверстия образуется эктодермальное углубление — **стомодеум**, которое потом приходит в контакт со стенкой передней кишки. Область их объединения называется **ротовой пластинкой**. Эта пластинка позднее (у эмбриона человека в возрасте около 22 сут) разрывается, а стомодеум превращается в **ротовую полость**. Эктодермальный эпителий крыши ротовой полости образует выступ (карман Ратке), который растет навстречу нейральному выросту дна зачатка промежуточного мозга — воронке или инфундибулюму. Эти два эктодермальных зачатка взаимодействуют друг с другом и вместе образуют гипофиз. Из кармана Ратке развивается железистая часть гипофиза, а из воронки — его нервная часть. Таким образом, гипофиз имеет двойное происхождение, и эта двойственная природа гипофиза отражается на его функции во взрослом организме.

Энтодермальная часть пищеварительной трубки начинается в глотке. Здесь у зародыша млекопитающих образуются четыре **глоточных кармана**. Борозды между этими карманами иногда называют **жаберными щелями**, потому что они напоминают такие же структуры у зародышей рыб (рис. 6.40). Однако вместо того, чтобы дать начало жабрам, развитие глоточных карманов у млекопитающих изменилось в соответствии с наземной средой обитания. Первая пара глоточных карманов преобразуется в слуховые полости среднего уха и связанные с ними евстахиевы трубы. Из второй пары карманов развиваются стенки миндалин. Тимус образуется из третьей пары глоточных карманов. На более поздних стадиях развития эта железа будет обеспечивать дифференцировку лимфоцитов. Из этой же пары глоточных карманов происходят одна пара паращитовидных желез, а вторая их пара возникает из четвертой пары глоточных карманов. В дополнение к этим парным карманам между глоточными карманами второй пары на дне глотки формируется маленький центрально расположенный вырост (дивертикул). Этот энтодермально-мезенхимный дивертикул отпочковывается

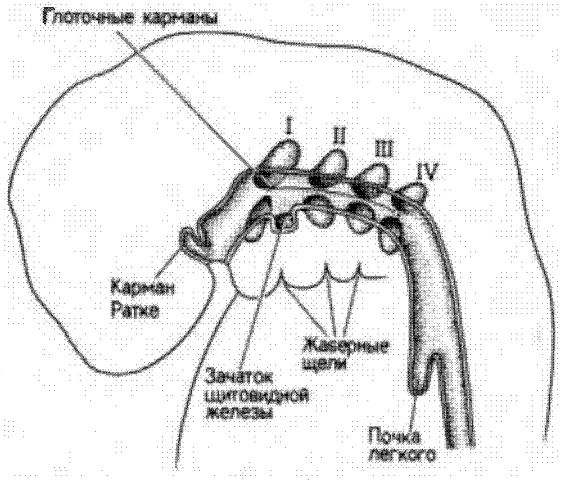


Рис. 6.40. Глоточные карманы и жаберные щели у 5-недельного зародыша человека. (По Carlson, 1981.)

от глотки и мигрирует в область шеи, где дифференцируется в щитовидную железу. Здесь же от стенки глотки отшнуровывается зачаток дыхательной трубки — ларинготрахеальная борозда.

Пищеварительная трубка и ее производные

Позади глотки пищеварительная трубка сужается, переходя в пищевод, за которым следуют желудок, тонкий кишечник и толстый кишечник. Энтодермальные клетки образуют только выстилку пищеварительной трубки и ее желез, тогда как мезодермальные мезенхимные клетки, которые окружают эту трубку, дифференцируются в мышцы, обеспечивающие перистальтику.

На рис. 6.41 видно, что желудок развивается подобно глотке, как расширенный участок трубки. Каудальнее формируется кишечник, и связь между ним и желточным мешком в конечном счете прерывается. На каудальном конце кишечника возникает углубление, в котором энтодерма встречается с лежащим над ней покровным эпителием. Тонкая **клоакальная мембрана** разделяет эти две ткани. Впоследствии она разрывается, и образуется отверстие, которое станет анальным.

Печень, поджелудочная железа и желчный пузырь

Энтодерма также образует выстилку трех дополнительных органов, которые развиваются непосредственно за желудком, каудальнее его. **Печеночный дивертикул** представляет собой энтодермальную трубку, которая простирается от передней кишки в окружающую мезенхиму. Мезенхима индуцирует

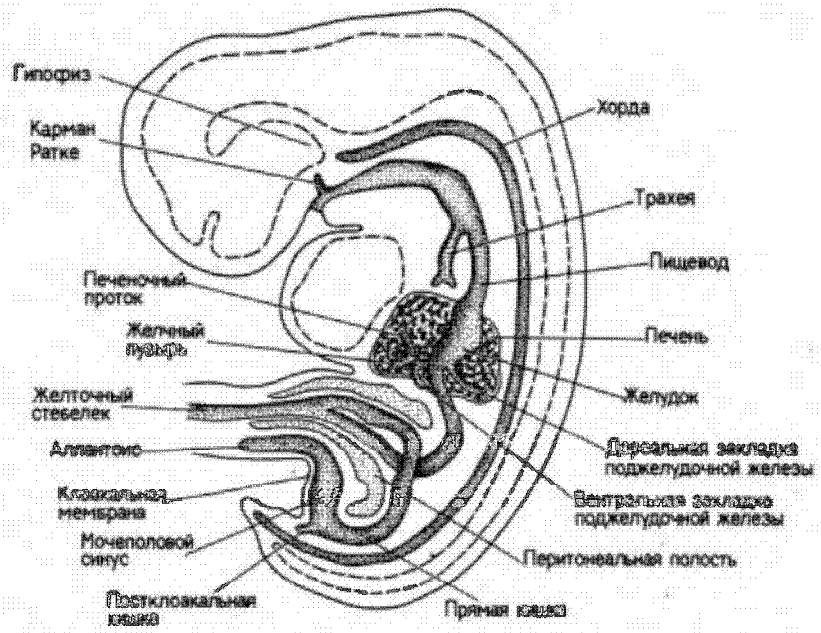


Рис. 6.41. Пищеварительная система 6-недельного зародыша человека. Область желудка в пищеварительной трубке начала расширяться; поджелудочная железа представлена двумя закладками, которые впоследствии сольются. (По Langman, 1981.)

энтодерму, которая в ответ на ее воздействие пролиферирует, ветвится и формирует железистый эпителий печени. Часть печеночного дивертикула (область, ближайшая к пищеварительной трубке) продолжает функционировать как дренажный проток печени, а из ответвления от этого протока образуется желчный пузырь (рис. 6.42).

Поджелудочная железа развивается в результате слияния четко выраженных дорсального и вентрального дивертикулов. Оба этих зачатка возникают из области энтодермы, расположенной непосредственно за желудком; по мере их роста они сближаются и в конце концов сливаются. У взрослого человека сохраняется только вентральный проток, несущий

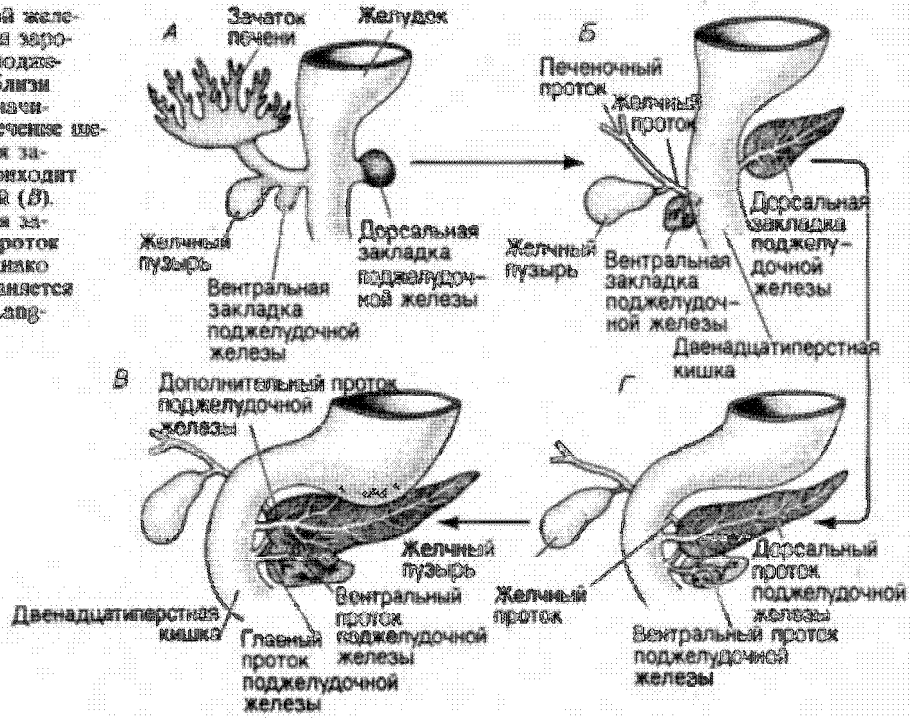


Рис. 6.42. Развитие поджелудочной железы у человека. На 30 сут развития зародыша (*А*) вентральная закладка поджелудочной железы расположена вблизи зачатка печени. К 35 сут железа начинает мигрировать назад. (*Б*). В течение шестой недели развития вентральная закладка поджелудочной железы приходит в контакт с дорсальной закладкой (*В*). У большинства людей дорсальная закладка железы утрачивает свой проток в двенадцатиперстную кишку. Однако примерно у 10% популяции сохраняется система двух протоков (*Г*). (По Langman, 1969.)

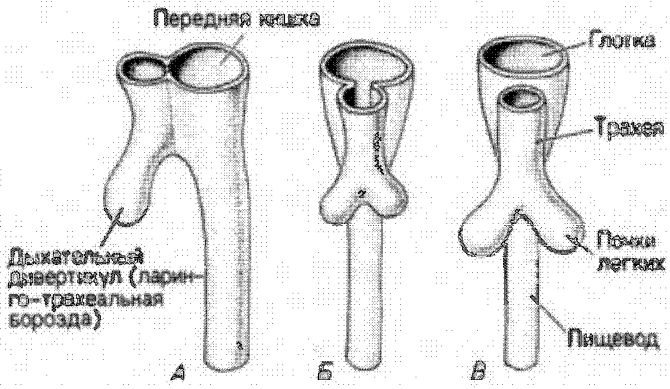


Рис. 6.43. Разделение передней кишки на пищевод и дыхательный дивертикул (трахею) в течение третьей и четвертой недель беременности у человека. *А*. Вид сбоку (конец третьей недели). *Б, В*. Вид с брюшной стороны (четвертая неделя беременности). (По Langman, 1969.)

пищеварительные ферменты в кишечник. У других видов (например, у собак) оба протока — дорсальный и вентральный — открываются в кишечник.

Дыхательная трубка

Легкие также являются производными пищеварительной трубки, хотя они совсем не участвуют в пищеварении. В центре задней области глотки между четвертой парой глоточных карманов появляется **ларинго-трахеальная борозда**, которая тянется по вентральной поверхности передней кишки (рис. 6.43). Эта борозда затем раздваивается на две главные ветви, которые образуют легкие. Ларинготрахеальная энтодерма становится выстилкой трахеи, двух бронхов и воздушных мешков (альвеол) легких. Как мы увидим в одной из последующих глав, ветвление этой энтодермальной трубки зависит от взаимодействий между разными типами мезодермальных клеток на ее пути.

Легкие являются эволюционным новшеством, и они последними из органов млекопитающих завершают свою дифференцировку. Легкие должны быть способны к поглощению кислорода с первым вдохом ребенка. Чтобы это осуществить, альвеолярные клетки секретируют в жидкость, омывающую легкие, поверхностноактивное вещество — **сурфактант**. Этот сурфактант, состоящий из фосфолипидов, таких, как сфингомиелин и лецитин, секретируется на поздних стадиях беременности, и необходимый физиологически полезный уровень их содержания достигается у человека обычно на 34-й неделе беременности. Эти вещества дают альвеолярным клеткам возможность соприкасаться не слипаясь. Дети, родившиеся преждевременно, часто испытывают затруднения в дыхании, и их приходится держать в респираторных камерах (где длительное время поддерживается искусственное дыхание) до тех пор, пока не созревают клетки, секретирующие сурфактант.

Дополнительные сведения и гипотезы

Тератокарцинома

Половая клетка млекопитающих или ранний бластомер содержит в себе всю информацию, необходимую для последующего развития. Что может случиться, если такая клетка станет злокачественной? В этом случае возникает **тератокарцинома**. Опухоли этого типа иногда спонтанно развиваются в яичнике или в семеннике. Образование тератокарцином можно вызвать экспериментально, имплантируя бластоцисту не в матку, а в иное место (например, внутрь соединительнотканной капсулы, окружающей почку). Независимо от того, возникла ли тератокарцинома спонтанно или в результате экспериментального вмешательства, она содержит популяцию недифференцированных стволовых клеток, которые по биохимическим свойствам и по способностям к развитию похожи на клетки внутренней клеточной массы (Graham, 1977). Эти стволовые клетки (называемые клетками эмбриональной карциномы) не только делятся, но могут также дифференцироваться в самые разнообразные ткани, в том числе в кишечный и дыхательный эпителий, мышечную, нервную, хрящевую и костную ткани (рис. 6.44). Образующиеся дифференцированные клетки больше не делятся и потому не являются злокачественными. Итак, эти опухоли могут дать начало самым разнообразным тканям, встречающимся в организме.

Эмбриональные карциномы можно переносить из одной мыши в другую, их клетки можно индуцировать к образованию эмбриоидных тел, инъецируя эти клетки в перитонеальную (брюшную) полость,

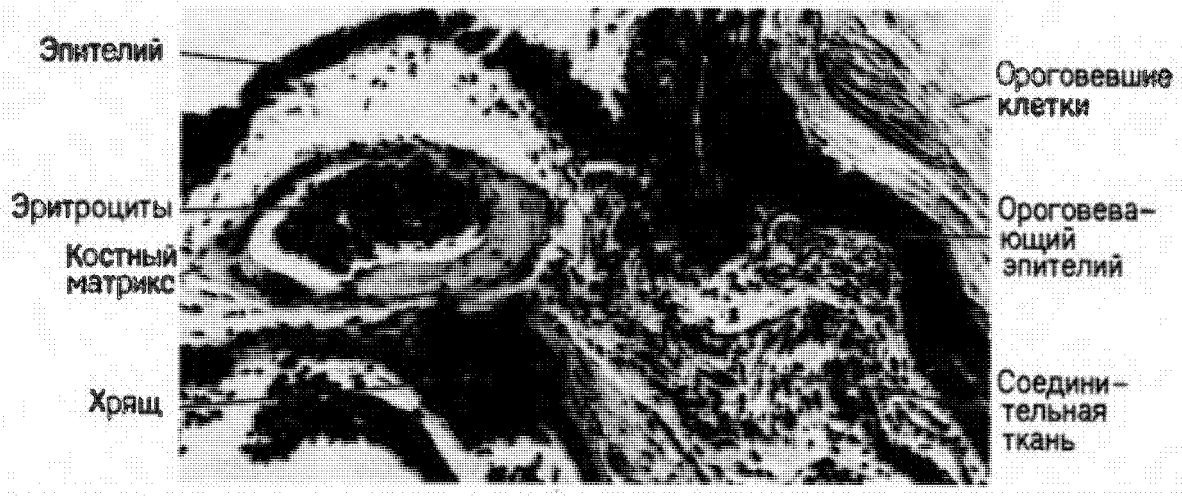


Рис. 6.44. Микрофотография среза карциномы. Видны дифференцированные клетки многих типов. (Из Gardner, 1982; фотография из C. Graham с любезного разрешения R. L. Gardner.)

где затем появляются аморфные скопления дифференцированных клеток (в том числе кроветворные колонии) в «энтодерме» (рис. 6.45). Было показано (Adamson et al., 1977), что эта «энтодерма» способна синтезировать α-фетопротеин, белок, обычно синтезируемый нормальными энтодермальными клетками млекопитающих. Следовательно, клетки эмбриональной карциномы имитируют раннее развитие млекопитающих, но развитие формируемой ими опухоли имеет случайный, неупорядоченный характер.

Эти опухоли, вероятно, происходят из половых клеток, однако по своим биохимическим, морфологическим и поверхностным свойствам образующие ее клетки напоминают бластомеры внутренней клеточной массы. Стюарт и Минц (Stewart, Mintz, 1981) получили мышь из клеток, часть которых происходила из стволовой клетки тератокарциномы! Стволовые клетки из тератокарциномы мышей линии агути культивировали в течение нескольких клеточных поколений и убедились, что они сохраняют хромосомный набор, характерный для родительской мыши. Затем изолированные стволовые клетки этого типа инъецировали в бластоцисты белых мышей. Бластоцисты переносили в матку приемной матери, которая родила живых мышат. Шкурки у некоторых мышат были двухцветными; это свидетельствовало о включении опухолевой клетки в развитие зародыша (рис. 6.46). Более того, когда химерную мышь спаривали с мышью, несущей соответствующий маркер, некоторые из рожденных ею мышат имели черты, характерные для фенотипа опухолевого «родителя». Злокачественная клетка эмбриональной карциномы образовала многие, если не все, типы нормальных соматических клеток и даже нормально функционирующие половые клетки! Если спаривали

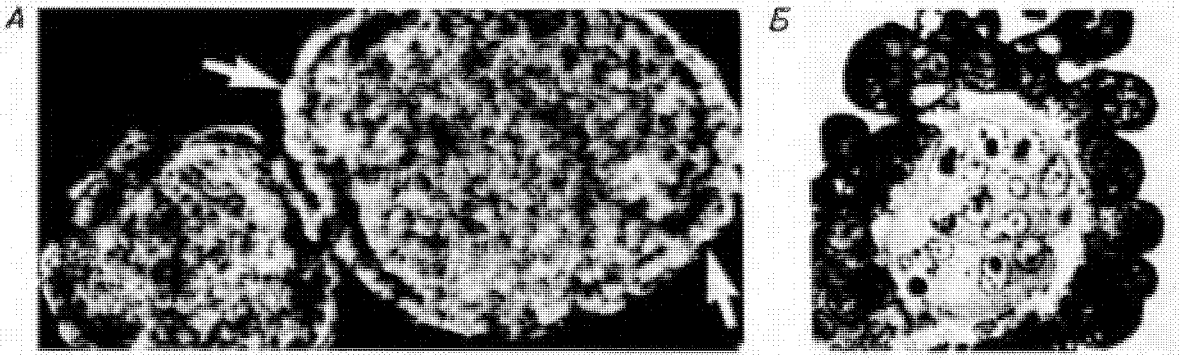


Рис. 6.45. Эмбриоидные тела. *А*. Живые эмбриоидные тела в культуре (фотографирование с помощью фазово-контрастного устройства). Стрелки указывают области, в которых можно видеть клетки двух разных типов (внутренние и наружные). *Б*. Срез такого эмбриоидного тела; препарат окрашен гематоксилином и эозином. Стволовые клетки (*в центре*) окружены клетками, очень напоминающими раннюю эмбриональную энтодерму. (Фотографии с любезного разрешения G. Martin.)

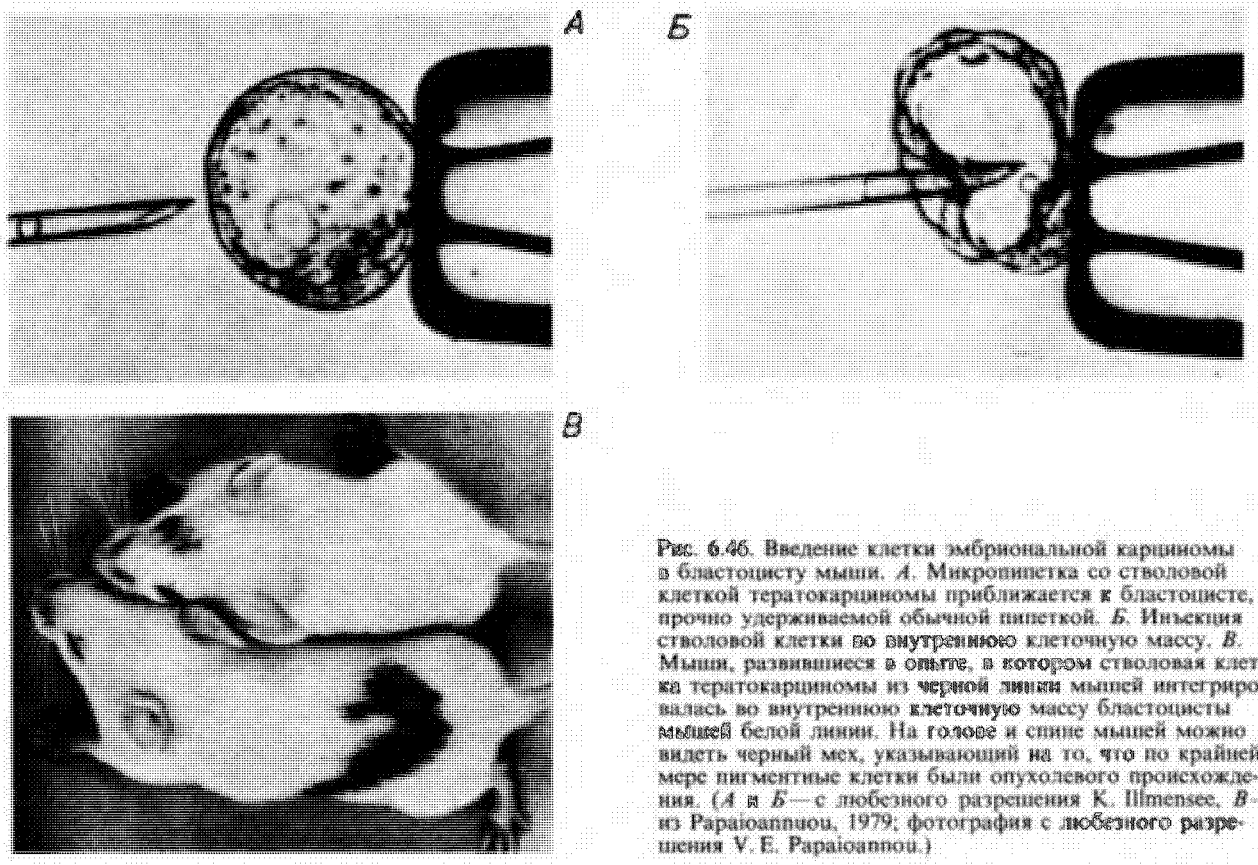


Рис. 6.46. Введение клетки эмбриональной карциномы в бластоцисту мыши. *А*. Микропипетка со стволовой клеткой тератокарциномы приближается к бластоцисте, прочно удерживаемой обычной пипеткой. *Б*. Инъекция стволовой клетки во внутреннюю клеточную массу. *В*. Мыши, развившиеся в опыте, в котором стволовая клетка тератокарциномы из черной линии мышей интегрировалась во внутреннюю клеточную массу бластоцисты мышей белой линии. На голове и спине мышей можно видеть черный мех, указывающий на то, что по крайней мере пигментные клетки были опухолевого происхождения. (*А* и *Б* — с любезного разрешения K. Illmensee, *В* — из Papaioannuou, 1979; фотография с любезного разрешения V. E. Papaioannou.)

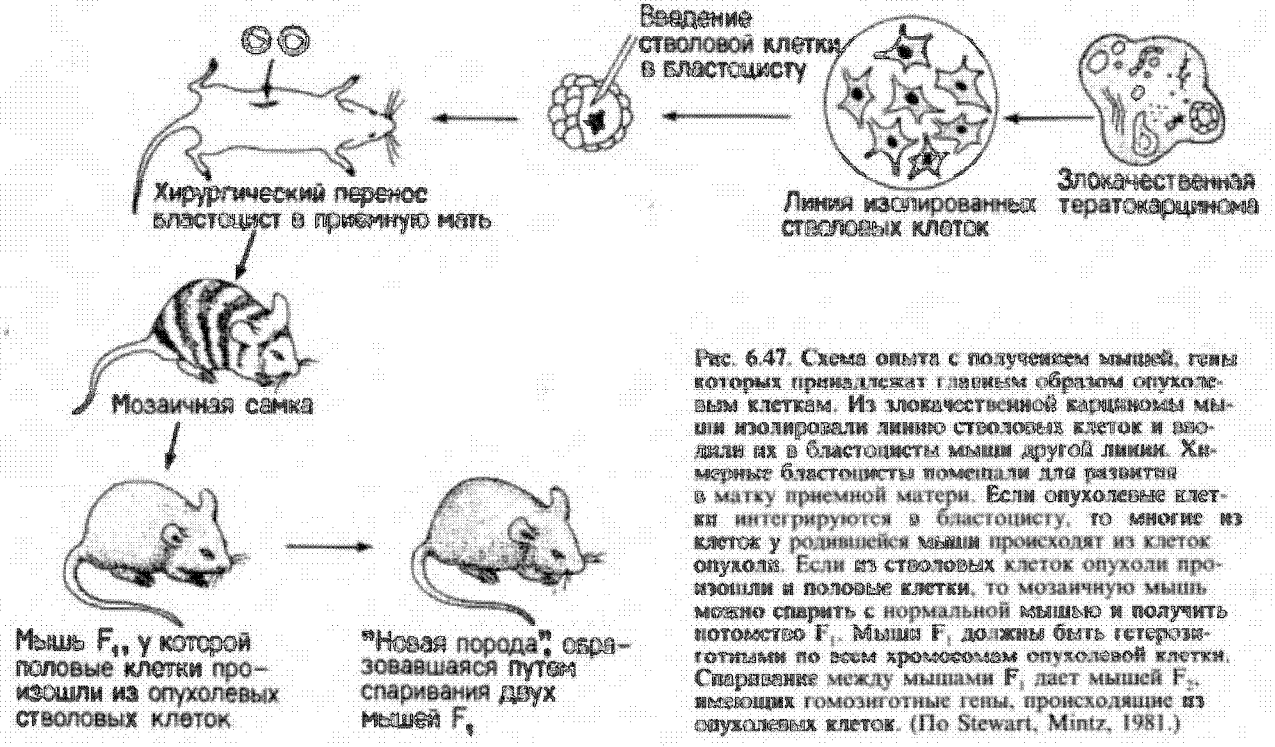


Рис. 6.47. Схема опыта с получением мышей, гены которых принадлежат главным образом опухолевым клеткам. Из злокачественной карциномы мыши изолировали линию стволовых клеток и вводили их в бластоцисты мыши другой линии. Химерные бластоцисты помещали для развития в матку приемной матери. Если опухолевые клетки интегрируются в бластоцисту, то многие из клеток у родившейся мыши происходят из клеток опухоли. Если из стволовых клеток опухоли произошли и половые клетки, то мозаичную мышь можно спарить с нормальной мышью и получить потомство F_1. Мыши F_1 должны быть гетерозиготными по всем хромосомам опухолевой клетки. Спаривание между мышами F_1 дает мышей F_2, имеющих гомозиготные гены, происходящие из опухолевых клеток. (По Stewart, Mintz, 1981.)

мышей, получивших опухолевую клетку от одного из родителей, то в потомстве оказывались мыши, гомозиготные по большому числу генов опухолевой клетки (рис. 6.47).

Поскольку культивирование ранних зародышей млекопитающих является трудной задачей, клетки эмбриональной карциномы дают исследователям уникальную возможность для анализа раннего развития млекопитающих. Кроме того, благодаря способности клеток эмбриональной карциномы мутировать в культуре при инъекции таких клеток в бластоцисты можно также создать мышей, мутантных почти по любому гену.

На этом мы завершим обзор основных черт развития животных и обратимся к механизмам, которые делают возможным это развитие. Во втором томе книги мы рассмотрим различные способы, с помощью которых осуществляется дифференцировка клеток, а третий том будет посвящен вопросам взаимодействия клеток между собой при формировании тканей и органов.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

Abramson S., Miller R. G., Phillips R. A. (1977). The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. J. Exp. Med. **145**, 1567—1579.

Adamson E., Evans M. J., Magrane G. G. (1977). Biochemical markers of the progress of differentiation in cloned teratocarcinoma cell lines. Eur. J. Biochem. **79**, 607—615.

Ash P. J., Loutit J. F., Townsend K. M. S. (1980). Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells. Nature **283**, 669—670.

Audhya T., Kroon D., Heavner G., Vicamontes G., Goldstein G. (1986). Tripeptide structure of bursin, a selective B cell-differentiating hormone of the bursa of Fabricius. Science **231**, 987—999.

Auerbach R., Alby L., Morrissey L., Tu M., Joseph J. (1985). Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. Microvasc. Res. **29**, 401—411.

Ausprunk D. H., Folkman J. (1977). Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvasc. Res. **14**, 53—65.

Bandman E. (1985). Continued expression of neonatal myosin heavy chain in adult dystrophic skeletal muscle. Science **127**, 780—782.

Baron R., Neff L., Louvard D., Courtoy P. J. (1985). Cell mediated extracellular acidification and bone resorption: Evidence for a low pH in resorbing lacuna and localization of a 100 kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. J. Cell Biol. **101**, 2210—2222.

Baron R., Neff L., Roy C., Boisvert A., Caplan M. (1986). Evidence for a high and specific concentration of (Na^+, K^+) ATPase in the plasma membrane of the osteoclast. Cell **46**, 311—320.

Becker A. J., McCulloch E. A., Till J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen cells derived from transplanted mouse marrow cells. Nature **197**, 452—454.

Blair H. C., Kahn A. J., Crouch E. C., Jeffrey J. J., Teitelbaum S. L. (1986). Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. J. Cell Biol. **102**, 1164—1172.

Bloom W., Fawcett D. W. (1975). Textbook of Histology, 10th Ed. Saunders, Philadelphia.

Bonner P. H., Hauschka S. D. (1974). Clonal analysis of vertebrate myogenesis. I. Early developmental events in the chick limb. Dev. Biol. **37**, 317—328.

Brighton C. T. (1984). The growth plate. Orthoped. Clin. N. A. **15**, 571—594.

Brighton C. T., Hunt R. M. (1974). Mitochondrial calcium and its role in calcification. Clin. Orthop. **100**, 406—416.

Buckley P. A., Konigsberg I. R. (1974). Myogenic fusion and the postmitotic gap. Dev. Biol. **37**, 193—212.

Caplan A. I., Fiszman M. Y., Eppenberger H. M. (1983). Molecules and cell isoforms during development. Science **221**, 923—927.

Carlson B. M. (1981). Patten's Foundations of Embryology. McGraw-Hill, New York.

Cheney C. M., Lash J. W. (1984). An increase in cell—cell adhesion in the chick segmental plate results in meristic pattern. J. Embryol. Exp. Morphol. **79**, 1—10.

Chevallier A., Kieny M., Mauger A., Sengel P. (1977). Developmental fate of the somitic mesoderm in the chick embryo. In: D. A. Ede, J. R. Hinchliffe and M. Balls (eds.), Vertebrate Limb and Somite Morphogenesis. Cambridge University Press, Cambridge, PP. 421—432.

Clark S. C., Kamen R. (1987). The human hematopoietic colony stimulating factors. Science **236**, 1229—1237.

Dahl C. A., Kahan B. W., Auerbach R. (1980). Studies with mouse embryonic yolk sac cells: An approach to understanding the patterns of ontogeny of cell-mediated immune functions. In: J. D. Horton (ed.), Development and Differentiation of Vertebrate Lymphocytes, Elsevier North-Holland, Amsterdam, pp. 241—253.

Daubas P., Caput D., Buckingham M., Gros F. (1981). A comparison between the synthesis of the contractile proteins and the accumulation of their translatable mRNAs during calf myoblast differentiation. Dev. Biol. **84**, 133—143.

David J. D., See W. M., Higginbotham C. A. (1981). Fusion of chick embryo skeletal myoblasts: Role of calcium influx preceding membrane union. Dev. Biol. **82**, 297—307.

DeHaan R. (1959). *Cardia bifida* and the development of pacemaker function in the early chicken heart. Dev. Biol. **1**, 586—602.

DeHaan R. L. (1967). Regulation of spontaneous activity and growth of embryonic chick heart cells in tissue culture. Dev. Biol. **16**, 216—249.

Dereszewski G., Howell D. S. (1978). The role of matrix vesicles in calcification. Trends Biochem. Sci. **4**, 151—153.

Devlin R. B., Emerson C. P., Jr. (1978). Coordinate regulation of contractile protein synthesis during myoblast differentiation. Cell **13**, 599—611.

Devlin R. B., Emerson C. P., Jr. (1979). Coordinate accumulation of contractile protein mRNAs during myoblast differentiation. Dev. Biol. **69**, 202—216.

Dieterlen-Lievre F., Martin C. (1981). Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. Dev. Biol. **88**, 180—191.

Fett J. W., Strydom D. J., Lubb R. R., Alderman E. M., Bethune J. L., Riordan J. F., Vallee B. L. (1985). Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenin protein from human carcinoma cells. Biochem. **24**, 5480—5486.

Folkman J. (1974). Tumor angiogenesis. Adv. Cancer Res. **19**, 331—358.

Folkman J., Langer R., Linhardt R. J., Haudenschild C., Taylor S. (1983). Angiogenesis inhibition and tumor regression caused heparin or heparin fragment in the presence of cortisone. Science **221**, 719—725.

Gardner R. L. (1982). Manipulation of development. In: C. R. Austin and R. V. Short (eds.), Embryonic and Fetal Development, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 159—180.

Gordon M. Y., Riley G. P., Watt S. M., Greaves M. F. (1987). Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. Nature **326**, 403—405.

Graham C. F. (1977). Teratocarcinoma cells and normal mouse embryogenesis. In: M. I. Sherman (ed.), Concepts in Mammalian Embryogenesis. MIT Press, Cambridge, Mass., pp. 315—394.

Gräper L. (1907). Untersuchungen über die Herzbildung der Vögel. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **24**, 375—410.

Harary I., Farley V. (1963). In vitro studies on single beating rat heart cells. II. Intercellular communication. Exp. Cell Res. **29**, 466—474.

Hay E. (1966). Regeneration. Holt, Rinehart &Winston, New York.

Hofman F., Graberson A. (1973). Graft-versus-host response induced in vitro by mouse yolk sac cells. Eur. J. Immunol. **3**, 179—181.

Humphries M. J., Oldern K., Yamada K. M. (1986). A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis in murine melanoma cells. Science **233**, 467—470.

Humphries R. K., Jacky P. B., Dill F. J., Eaves A. C., Eaves C. J. (1979). CFUs in individual erythroid colonies derived in vitro from adult mature mouse marrow. Nature **279**, 718—720.

Hunt P., Robertson D., Weiss D., Rennick D., Lee F., Witte O. N. (1987). A single bone marrow stromal cell type supports the in vitro growth of early lymphoid and myeloid cells. Cell **48**, 997—1007.

Jimenez J. J., Yunis A. A. (1987). Tumor cell rejection through terminal cell differentiation. Science **238**, 1278—1280.

Jockusch M., Jockusch B. M. (1980). Structural organization of the Z-line protein, α-actinin, in developing skeletal muscle cells. Dev. Biol. **75**, 231—238.

Jurišková V., Tkadleček L. (1965). Character of primary and secondary colonies of haematopoiesis in the spleen of irradiated mice. Nature **206**, 951—952.

Kahn A. J., Simmons D. J. (1975). Investigation of cell lineage in bone using a chimaera of chick and quail embryonic tissue. Nature **258**, 325—327.

Kalderon N., Gilula N. B. (1979). Membrane events involved in myoblast fusion. J. Cell Biol. **81**, 411—425.

Kaufman S. J., Foster R. F. (1985). Remodeling of the myoblast membrane accompanies development. Dev. Biol. **110**, 1—14.

Keller G., Paige C., Gilboa E., Wagner E. F. (1985). Expression of a foreing gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent hematopoietic precursors. Nature **318**, 149—154.

Knudsen K. A. (1985). The calcium-dependent myoblast adhesion that precedes cell fusion is mediated by glycoproteins. J. Cell Biol. **101**, 891—897.

Konigsberg I. R. (1963). Clonal analysis of myogenesis. Science **140**, 1273—1284.

Kramer R. H., Nicolson G. L. (1979). Interaction of tumor cells with vascular endothelial cell monolayers: A model for metastatic invasion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 5704—5708.

Kramer T. C. (1942). The partitioning of the truncus and conus and the formation of the membranous portion of the interventricular septum in the human heart. Am. J. Anat. **71**, 343—370.

Krantz S. B., Goldwasser E. (1965). On the mechanism of erythropoietin induced differentiation. II. The effect on RNA synthesis. Biochim. Biophys. Acta **103**, 325—332.

Kubai L., Auerbach R. (1983). A new source of embryonic lymphocytes in the mouse. Nature **301**, 154—156.

Langer R., Conn H., Vacantai J., Haudenschild C., Folkman J. (1980). Control of tumor growth in animals by infusion of an angiogenesis inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 4331—4335.

Langman J. (1969). Medical Embryology. 3rd Ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Langman J. (1981). Medical Embryology. 4th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Lash J. W., Seitz A. W., Cheney C. M., Ostrovsky D. (1984). On the role of fibronectin during the compaction stage of somitogenesis in the chick embryo. J. Exp. Zool. **232**, 197—206.

Lash J. W., Yamada K. M. (1986). The adhesion recognition signal of fibronectin: A possible trigger mechanism for compaction during somitogenesis. In: R. Bellairs, D. H. Ede, J. W. Lash (eds.), Somites in Developing Embryos. Plenum, New York, pp. 201—208.

Lemischka I. R., Raulet D. H., Mulligan R. C. (1986). Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. Cell **45**, 917—927.

Linask K. K., Lash J. W. (1986). Precardiac cell migration: Fibronectin localization at mesoderm—endoderm interface during directional movement. Dev. Biol. **114**, 87—101.

Lipton B. H., Jacobson A. G. (1974). Analysis of normal somite development. Dev. Biol. **38**, 73—90.

Lough J., Bischoff R. (1977). Differentiation of creatine phosphokinase during myogenesis: Quantitative fractionation of isozymes. Dev. Biol. **57**, 330—344.

Martin C., Beaupain D., Dieterlen—Lievre F. (1978). Developmental relationships between vitelline and intraembryonic haemopoiesis studied in avian yolk sac chimeras. Cell Differ. **7**, 115—130.

Meier S. (1979). Development of the chick mesoblast: Formation of the embryonic axis and the establishment of the metameric pattern. Dev. Biol. **73**, 25—45.

Mintz B., Baker W. W. (1967). Normal mammalian muscle differentiation and gene control of isocitrate dehydrogenase synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **58**, 592—598.

Moore M. A. S., Matcalfe D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: Yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. Br. J. Haematol. **18**, 279—296.

Muller-Sieburg C. E., Whitlock C. A., Weissman I. L. (1986). Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: A committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1^{lo} hematopoietic stem cell. Cell **44**, 653—662.

Murphy M. E., Carlson E. C. (1978). Ultrastructural study of developing extracellular matrix in vitelline blood vessels of the early chick embryo. Am. J. Anat. **151**, 345—375.

Muthukkaruppan V. R., Auerbach R. (1979). Angiogenesis in the mouse cornea. Science **205**, 1416—1418.

Nameroff M., Munar E. (1976). Inhibition of cellular differentiation by phospholipase C. II. Separation of fusion and recognition among myogenic cells. Dev. Biol. **49**, 288—293.

Nicolson G. L., Irimura T., Gonzalez R., Ruoslahti E. (1981). The role of fibronectin in adhesion of metastatic melanoma cells to endothelial cells and their basal lamina. Exp. Cell Res. **135**, 461—465.

O'Neill M. C., Stockdale F. E. (1972). Differentiation without cell division in cultured skeletal muscle. Dev. Biol. **29**, 410—418.

Ossowski L., Reich E. (1983). Antibodies to plasminogen activator inhibit tumor metastasis. Cell **35**, 611—619.

Ostrovsky D., Cheney C. M., Seitz A. W., Lash J. W. (1984). Fibronectin distribution during somitogenesis in the chick embryo. Cell Differ. **13**, 217—223.

Packard D. S., Meier S. (1983). An experimental study of somitomeric organization of the avian vegetal plate. Dev. Biol. **97**, 191—202.

Palacios R., Sideras P., von Boehmer H. (1987). Recombinant interleukin 4/BSF-1 promotes growth and differentiation of intrathymic T cell precursors from fetal mice in vitro. EMBO J. **6**, 91—95.

Papahadjopoulos D. (1978). Calcium-induced phase changes and fusion in natural and model membranes. In: G. Poste and G.C. Nicolson (eds.), Membrane Fusion. Elsevier North-Holland, New York, pp. 766—790.

Papaioannou V. (1979). Interactions between mouse embryos and teratocarcinomas. In: N. LeDouarin (ed.), Cell Lineage, Stem Cells, and Cell Determination. Elsevier North-Holland, New York, pp. 141—155.

Pardanaud L., Altmann C., Kitos P., Dieterlen-Lievre F., Buck C. (1987). Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. Development **100**, 339—349.

Patten B.M. (1951). Early Embryology of the Chick, 4th Ed. McGraw-Hill, New York.

Peschle C. and twelve others. (1985). Haemoglobin switching in human embryos: Asynchrony of zeta to alpha and epsilon to gamma switches in primitive and definitive erythropoietic lineage. Nature **313**, 235—238.

Przybylski R.J., Chlebowski J.S. (1972). DNA synthesis, mitosis, and fusion of myocardial cells. J. Morphol. **137**, 417—432.

Quesenberry P., Levitt L. (1979). Hematopoietic stem cells. N. Engl. J. Med. **301**, 755—760.

Quinn L.S., Holtzer H., Nameroff M. (1985). Generation of chick skeletal muscle cells in groups of 16 from stem cells. Nature 313, 692—694.

Risau W. (1986). Developing brain produces an angiogenesis factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 3855—3859.

Rossant J., Vijh K.M., Grossi C.E., Cooper M.D. (1986). Clonal origin of haematopoietic colonies in the postnatal mouse liver. Nature **319**, 507—511.

Rugh R. (1951). The Frog: Its Reproduction and Development. Blakiston, Philadelphia.

Russell E.S. (1979). Hereditary anemias of the mouse: A review for geneticists. Adv. Genet. **20**, 357—459.

Sachs L. (1978). Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukemias. Nature **274**, 535—539.

Shainberg A., Yagil G., Yaffe D. (1969). Control of myogenesis in vitro by Ca^{++} concentration in nutritional medium. Exp. Cell Res. **58**, 163—167.

Siminovitch L., McCulloch E.A., Till J.E. (1963). The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. J. Cell. Comp. Physiol. **62**, 327—336.

Stanley E.R., Bartocci A., Patinkin D., Rosendal M., Bradley T.R. (1986). Regulation of very primitive, multipotent hemopoietic cells by hemopoietintive, multipotent hemopoietic cells by hemopoietin-1. Cell **45**, 667—674.

Stewart T.A., Mintz B. (1981). Successive generations of mice produced from an established culture line of euploid teratocarcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 6314—6318.

Stryer L. (1981). Biochemistry, 2nd Ed., Freeman, San Francisco.

Sutherland W.M., Konigsberg I.R. (1983). CPK accumulation in fusion-blocked quail myocytes. Dev. Biol. **99**, 287—297.

Till J.E. (1981). Cellular diversity in the blood—forming system. Am. Sci. **69**, 522—527.

Till J.E., McCulloch E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Rad. Res. **14**, 213—222.

Tuan R. (1987). Mechanisms and regulation of calcium transport by the chick embryonic chorioallantoic membrane. J. Exp. Zool. [Suppl] **1**, 1—13.

Tuan R.S., Lynch M.H. (1983). Effect of experimentally induced calcium deficiency on the developmental expression of collagen types in chick embryonic skeleton. Dev. Biol. **100**, 374—386.

Wakelam M.J.O. (1985). The fusion of myoblasts. Biochem. J. **228**, 1—12.

Whalen R.G., Schwartz K., Bouveret P., Sell S.M., Gros F. (1979). Contractile protein isozymes in muscle development: Identification of an embryonic form of myosin heavy chain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 5197—5201.

Whetton A.D., Dexter T.M. (1986). Hemopoietic growth factors. Trends Biochem. Sci. **11**, 207—211.

Whitlock C.A., Tidmarsh G.F., Muller-Sieburg C., Weissman I.L. (1987). Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia-associated molecule. Cell **48**, 1009—1021.

Wilson D. (1983). The origin of the endothelium in the developing marginal vein of the chick wing bud. Cell Differ. **13**, 63—67.

Wolf N.S., Trentin J.J. (1968). Hemopoietic colony studies. V. Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells. J. Exp. Med. **127**, 205—214.

Womble M.D., Bonner P.H. (1980). Developmental fate of a distinct class of chick myoblasts transplantation of cloned cells into quail embryos. J. Embryol. Exp. Morphol. **58**, 119—130.

Wong P.M.C., Chung S.W., Chui D.H.K., Eaves J. (1986). Properties of the earliest clonogenic hemopoietic precursors to appear in the developing murine yolk sac. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 3851—3854.

Wuthier R.-E., Chin J.E., Hale J.E., Register T.C., Hale L.V., Ishikawa Y. (1985). Isolation and characterization of calcium-accumulating matrix vesicles from chondrocytes of chicken epiphyseal growth plate cartilage in primary culture. J. Biol. Chem. **260**, 15972—15979.

Yablonka Z., Yaffe D. (1977). Synthesis of myosin light chains and accumulation of mRNA coding for light chain-like polypeptides in differentiating muscle cultures. Differentiation **8**, 133—143.

Yaffe D., Feldman M. (1965). The formation of hybrid multinucleated muscle fibres from myoblasts of different genetic origin. Dev. Biol. **11**, 300—317.

Оглавление

Предисловие редакторов перевода . . . 5
Предисловие автора к русскому изданию . . . 7
Предисловие . . . 9

Часть I. Как происходит развитие

Глава 1. Введение в изучение развития животных. *Перевод А. С. Гинзбург* . . . 11

Введение . . . 11
Основные особенности развития . . . 12
Наше эукариотическое наследие . . . 12
Развитие одноклеточных эукариот . . . 16
Колониальные эукариоты: эволюция дифференцировки . . . 22

Дополнительные сведения и гипотезы . . . 26
Пол и смерть у Volvocales . . . 26
Особенности развития разных многоклеточных . . . 31
Цитированная литература . . . 33

Глава 2. Оплодотворение: возникновение нового организма. *Перевод А. С. Гинзбург* . . . 35

Введение . . . 35
Строение гамет . . . 35
Узнавание спермия и яйца: воздействие на расстоянии . . . 42
Узнавание спермия и яйца: контакт между гаметами . . . 45
Слияние гамет и предотвращение полиспермии . . . 50
Слияние генетического материала . . . 59

Дополнительные сведения и гипотезы . . . 61
Неравнозначность пронуклеусов у млекопитающих . . . 61
Активация метаболизма яйца . . . 63

Дополнительные сведения и гипотезы . . . 65
Биохимия активации яйца . . . 65
Цитированная литература . . . 69

Глава 3. Дробление: создание многоклеточности. *Перевод А. С. Гинзбург* . . . 74

Введение . . . 74
Пространственные закономерности дробления зародыша . . . 75
Радиальное голобластическое дробление . . . 76
Спиральное голобластическое дробление . . . 83
Дополнительные сведения и гипотезы . . . 85
Адаптация путем изменения процесса дробления зародыша . . . 85
Билатеральное голобластическое дробление . . . 87
Чередующееся (rotational) голобластическое дробление . . . 88

Дополнительные сведения и гипотезы . . . 91
Клеточная поверхность и механизм компактизации . . . 91

Дополнительные сведения и гипотезы . . . 95
Близнецы . . . 95
Меробластические типы дробления . . . 97
Механизмы дробления . . . 101
Инициация дробления . . . 101
Цитоскелетный механизм митоза . . . 102
Образование новых мембран . . . 106
Резюме . . . 106
Цитированная литература . . . 107

Глава 4. Гаструляция: перераспределение клеток. *Перевод Г. М. Игнатьевой* . . . 110

Введение: основные черты гаструляции . . . 110
Гаструляция у морского ежа . . . 111
Гаструляция у амфибий . . . 118
Гаструляция у птиц . . . 131
Гаструляция у млекопитающих . . . 136
Дополнительные сведения и гипотезы . . . 140
Функция хориона . . . 140
Цитированная литература . . . 142

Глава 5. Раннее развитие позвоночных. Производные эктодермы, их органо- и гистогенез. *Перевод Г. М. Игнатьевой* . . . 145

Основные черты развития позвоночных . . . 145
Нейруляция . . . 147
Нервная трубка и происхождение центральной нервной системы . . . 150
Дополнительные сведения и гипотезы . . . 159
Эволюция развития головного мозга . . . 159
Нервный гребень и его производные . . . 169
Эпидермис и его производные . . . 175
Дополнительные сведения и гипотезы . . . 178
Тератология . . . 178
Резюме . . . 182
Цитированная литература . . . 183

Глава 6. Раннее развитие позвоночных. Производные мезодермы и энтодермы, их органо- и гистогенез. *Перевод Г. М. Игнатьевой* 186
Введение 186
Мезодерма 186
Дорсальная мезодерма: дифференцировка сомитов 186
Мезодерма боковых пластинок 199
Дополнительные сведения и гипотезы 199
Изоформы 199
Формирование внезародышевых оболочек 200
Сердце и системы кровообращения . . . 201
Дополнительные сведения и гипотезы 209
Ангиогенез, индуцированный опухолью . . 209
Развитие клеток крови 212
Энтодерма 219
Пищеварительная трубка и ее производные 219
Дополнительные сведения и гипотезы 221
Тератокарцинома 221
Цитированная литература 224

Уважаемый читатель!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва,
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир»

Учебное издание

Скотт Ф. Гилберт

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

В 3-х томах
Том 1

Заведующая редакцией
канд. биол. наук М. Д. Гроздова
Научный консультант акад. Т. М. Турпаев
Ведущий редактор М. Б. Николаева
Редактор И. А. Ермакова
Художник А. Е. Волков
Художественные редакторы Н. М. Иванов, Л. М. Алешичева
Технический редактор И. И. Володина
Корректор В. И. Киселева

ИБ № 7423

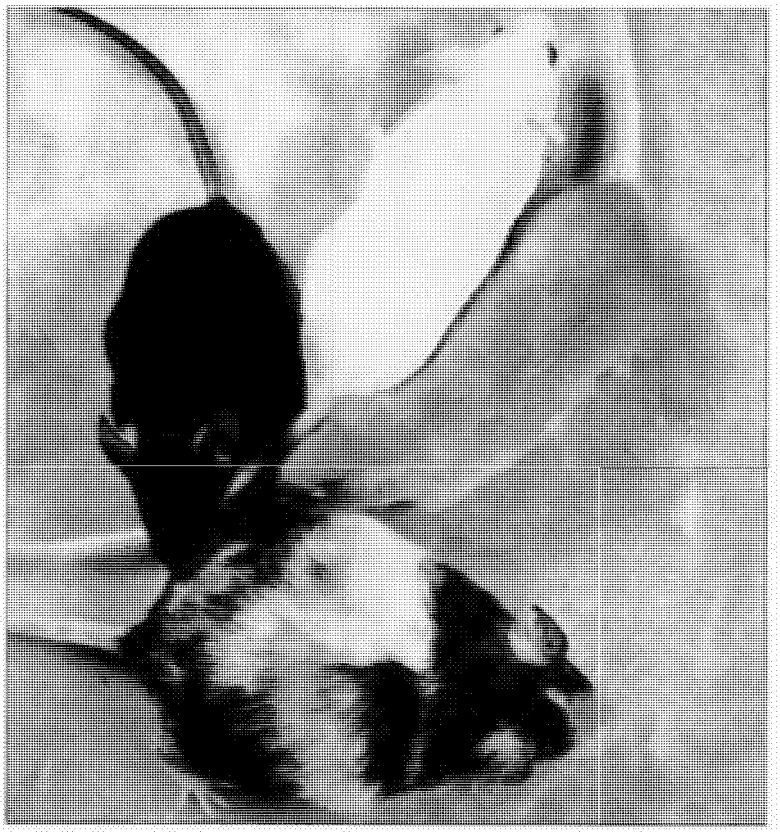
Сдано в набор 25.02.91. Подписано к печати 11.12.92. Формат 84 × 108 1/16. Бумага офсетная № 2. Печать офсетная. Гарнитура таймс. Объем 7,25 бум. л. Усл. печ. л. 24,36. Усл. кр.-отт. 26,89. Уч.-изд. л. 26,54. Изд. № 4/7636. Тираж 7000 экз. Зак. 204. С 264

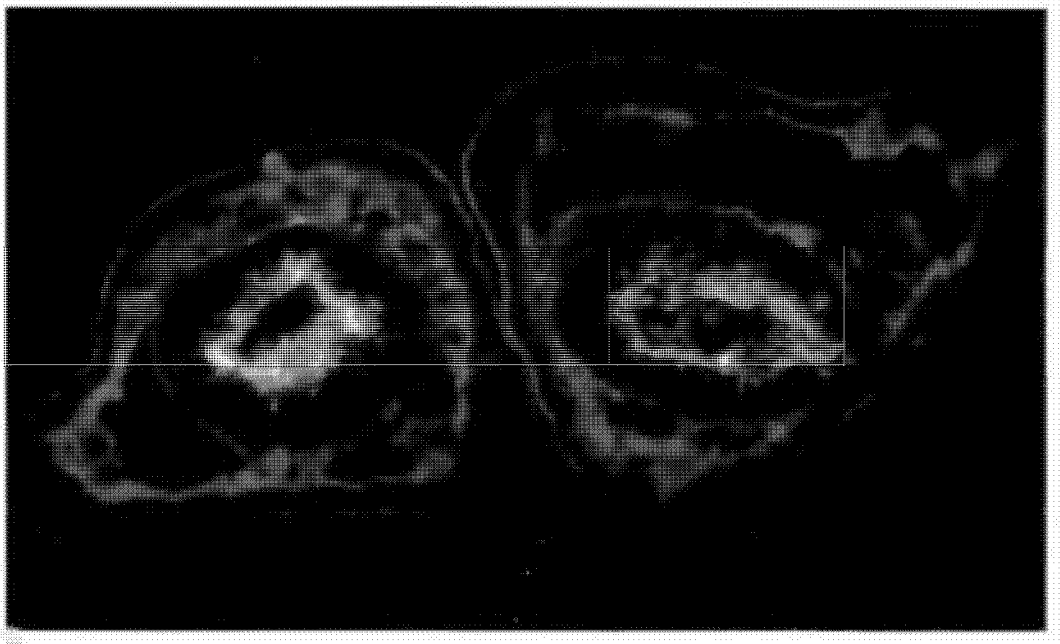
Издательство "Мир" Министерства печати и информации Российской Федерации. 129820, ГСП, Москва, 1-й Рижский пер., 2

Можайский полиграфический комбинат Министерства печати и информации Российской Федерации, 143200, г. Можайск, ул. Мира, 93.

Мыши, имеющие по шесть родителей

Эти разноцветные мыши были получены в результате смешивания клеток трех зародышей, находящихся на 4-клеточной стадии. Каждый из зародышей имел двух родителей: двух черных, двух белых или двух бурых. При этом трехголовых монстров не возникало, а образовывалась одна мышь (нормальных размеров), в развитие которой внесли вклад все три зародыша. У гибридной мыши развиваются половые клетки трех типов. Об этом свидетельствует тот факт, что от скрещивания химерной мыши с рецессивной (белой) мышью были получены белые, черные, бурые и пятнистые потомки (показанные на фотографии). Глава 3. (Фотография любезно предоставлена C. Markert и The Journal of Heredity.)





Тканеспецифические различия клеточных мембран

Не все клеточные мембраны одинаковы. Способность клеток изменять свое местоположение в зародыше является следствием изменений, происходящих на их поверхности. На фотографии виден белок (окрашенный в красный цвет с помощью флуоресцирующих моноклональных антител), локализующийся на поверхности только тех клеток, которые предназначены для образования скелетных игл личинки морского ежа. Другие компоненты клеточной поверхности (окрашены в зеленый цвет) обнаружены только в тех клетках, которые формируют кишку личинки. Фотография среза, перпендикулярного дорсо-вентральной оси личинки. Глава 4. (Фотография любезно предоставлена G. Wessel.)

1300

Я прекрасно помню то острое чувство удовлетворения и восторга, с которым я часами слушал фуги Баха... и мне часто приходило в голову, что наслаждение, получаемое от музыкальных произведений такого рода... созвучно с тем, что я получаю при изучении очень многих морфологических проблем: перед Вами проходит тема из произведения старого мастера, которая прослеживается во всех своих бесконечных вариациях, появляется вновь и вновь и напоминает о том, что в многообразии есть единство.

Томас Хаксли (1895)

Еще и еще, и еще,
Это вечное стремление Вселенной
рождать и рождать,
Вечно плодородное движение мира.
Из мрака выходят двое, они несхожи, но равны:
вечно материя, вечно рост, вечно явление пола,
Вечно ткань из различий и тождеств, вечно
зарождение жизни.

Уолт Уитмен (1855)