

УДК 591

СТАТИСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЫСТРЫХ МЕХАНОЗАВИСИМЫХ КЛЕТОЧНЫХ ДВИЖЕНИЙ В ДЕФОРМИРОВАННЫХ ЭКСПЛАНТАТАХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ

© 2011 г. Т. Г. Трошина, Н. С. Глаголева, Л. В. Белоусов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

E-mail: morphogenesis@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.03.2011 г.

Окончательный вариант получен 28.03.2011 г.

Используя кадры цейтраферной микрокиносъемки, проводили компьютерный анализ искусственно деформированных (растянутых или сжатых) двойных эксплантатов (сэндвичей) крыши бластоцеля (КБс) и супраластопоральной области (СБОс) ранней гаструлы шпорцевой лягушки. На контрольных и деформированных образцах в течение первых 14 мин после вырезания измеряли скорости и углы смещений нескольких сотен клеток друг относительно друга, а также относительно неподвижных точек и осей растяжения. Обнаружено, что деформации образцов приводят к быстрой переориентации и возрастанию скоростей движений обширных клеточных масс по направлениям растяжения или перпендикулярно направлениям сжатия. Кроме того, у растянутых КБс наблюдали возрастание скоростей взаимных клеточных смещений и конвергентное схождение клеток к осям растяжения. При сравнении различных угловых секторов отмечена достоверная положительная корреляция между средними скоростями клеточных движений и количеством клеток, движущихся внутри данного сектора. Это указывает на кооперативность механозависимых клеточных движений. В целом, полученные данные указывают на важную роль механических факторов в регуляции коллективных клеточных движений.

Ключевые слова: клеточные движения, механические напряжения, кооперативность, гаструла шпорцевой лягушки.

ВВЕДЕНИЕ

Первостепенное значение для эмбриональных морфогенезов позвоночных животных имеют так называемые коллективные движения клеток — согласованные двух- и трехмерные перемещения обширных клеточных масс. Наиболее ярким примером таких движений является так называемая конвергентная интеркаляция клеток, лежащая в основе формирования осевых органов позвоночных (Keller et al., 2000, 2008). Несмотря на исследования молекулярных основ этих движений (Wallingford et al., 2002; Tahinci, Symes, 2003), факторы, определяющие их пространственную организацию, остаются неясными. Участие хемотактических механизмов, в ряде случаев эффективных для векторизации отдельных клеток, в данном случае представляется маловероятным по крайней мере по следующим причинам: (1) при коллективных движениях отсутствуют неподвижные точки, к которым могли бы быть привязаны источники хемотакторов; (2) поскольку эти движения, как уже говорилось, более чем одномерны, хемотактическая схема их регуляции выглядела бы весьма громоздкой. С другой стороны, участие механических факторов в регуляции коллективных движений выглядит, по тем же основаниям, более вероятным

(Kornikova et al., 2009). Действительно, движение клеточных пластов, обладающих упругостью, будет неизбежно и регулярным образом изменять в них поля механических напряжений, что может влиять на последующие деформации пластов. При этом механические напряжения будут автоматически порождать двух- и трехмерные деформации типа Пуассоновых (растяжение вдоль и сжатие поперек действия силы).

Ранее (Belousov et al., 2000) было показано, что эмбриональные клетки могут двигаться вверх по направлению градиентов механических напряжений (тензотаксис). Данная работа развивает и уточняет эти данные, переводя их на количественную основу. В ней использована оригинальная компьютерная программа, позволившая анализировать быстрые реакции нескольких десятков клеток каждого образца на его деформацию внешней силой. При этом были исследованы образцы с различными презумптивными значениями и потенциалами к клеточной дифференцировке.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Изготовление экспериментальных образцов. На стадии 10 по Nieuwkoop & Faber (1956) изготавливали

сэндвичи (двойные эксплантаты, сращенные внутренними сторонами) из квадратных участков крыши бластоцеля (КБс) и из супрабластопоральной области (СБОс). Сэндвичи имели примерно 900 мкм в поперечнике. Сэндвичи помещали на агарозный субстрат и вводили в их противоположные края по одной (СБОс) или по две (КБс) стеклянные иглы толщиной 40–50 микрон. После этого иглу или пару игл с одной стороны сдвигали, растягивая или, напротив, сжимая сэндвич. СБОс растягивали или сжимали в направлении, поперечном переднезадней оси зародыша. КБс только растягивали, причем в произвольном относительно оси зародыша направлении (как показано Глаголевой с соавт. (2003), реакции КБс на растяжение не зависели от его направления). Растяжение проводили в два приема (подробности см. Velousov et al., 2000), после чего положение игл фиксировали. В результате растяжения расстояние между иглами увеличивалось на 110–130% для КБс и на 60–95% для СБОс. При сжатии СБОс их поперечник уменьшался на 5–10%. В качестве контролей брали сэндвичи, в которые иглы вводили, но оставляли неподвижными. Все операции проводили в растворе MMR (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.4).

Микрокиносъемка. Немедленно после прекращения деформации начинали цейтраферную микрокиносъемку опытных и контрольных образцов при фокусировке на поверхности сэндвичей (эпиктодерму). Использовали установку Digital Camera for microscope DCM130, съемка велась под бинокулярным микроскопом Olympus SZX16, частота кадров: 1 кадр в минуту, длительность непрерывной съемки 14 мин. Всего было заснято и обработано 8 контрольных и 8 растянутых КБс, 10 контрольных, 7 растянутых и 7 сжатых СБОс. На основе микрокиносъемки составляли карты движения избранных клеток, на которых откладывали векторы их движений за два последовательных временных периода: 0–5 мин и 5–14 мин после прекращения деформаций образцов.

Обработка изображений и типы измерений. Серии изображений обрабатывали с помощью программ на языке Python для Windows XP OS. Первичное прослеживание движения клеток осуществляли с использованием алгоритма rугamid Lucas-Kanade optical flow библиотеки компьютерного зрения OpenCV. Составляли векторные карты клеточных движений и измеряли следующие показатели:

1. Скорости и углы смещений некоторого произвольного набора клеток относительно другой клетки данного образца. Эти величины обозначали как взаимные смещения клеток ($V_{вз}$). Увеличение расстояний между клетками называли дивергенцией, а уменьшение расстояний – конвергенцией. Результаты для отдельных пар клеток

представляли в виде точек на круговых диаграммах (в пределах 0–180°), где линейная координата представляла собой $V_{вз}$ (μm/мин), а угловая – угол (градусы), под которым смещались клетки, причем дивергентные движения считались положительными, а конвергентные – отрицательными.

2. Векторы смещений клеток деформированных и контрольных образцов относительно неподвижных точек (скорости направленных движений – $V_{напр}$). Составляли векторные карты клеточных движений и представляли результаты в виде круговых диаграмм в диапазоне 0–360°, причем ось растяжения/сжатия образца соответствовала направлению 0–180° (0° был обращен к сдвигаемым иглам), тогда как направление 90–270° совпадало с передне-задней осью зародыша (270° – его задний полюс).

2. Показатели “массопереноса” клеток в пределах данного углового сектора, т.е. произведение количества N клеток, движущихся внутри сектора, на их средние скорости. Таким образом, массоперенос $M = N \times V_{напр}$. Его также представляли в круговых диаграммах. Особое внимание обращали на корреляции между N и $V_{напр}$.

Следующие показатели измеряли только на КБс:

3. Проекция $V_{напр}$ на перпендикуляры к оси растяжения образца или соответствующей ей оси контрольных образцов. Этот показатель оценивает конвергенцию клеток к оси образца.

4. Скорости движения клеток вдоль оси растяжения в зависимости от расстояния данной клетки до основания растягивающей иглы или до средней точки между двумя растягивающими иглами. Движение клетки в сторону источника растяжения считали положительным, удаление от него – отрицательным.

5. Зависимости абсолютных значений $V_{напр}$ от растяжения d образцов, принимая $d = (L_1 - L_0)/L_0$, где L_0 – исходное расстояние между иглами, а L_1 – окончательное расстояние между иглами того же образца. Их определяли отдельно для периодов 0–5 мин и 5–14 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Обзор векторных карт клеточных движений

Уже беглый взгляд на карты (рис. 1А–1Е) позволяет обнаружить качественные различия между механозависимыми движениями клеток КБс и СБОс. Тогда как в контрольных КБс все клетки малоподвижны (рис. 1А), в контрольных СБОс наблюдается их массовое смещение к заднему концу образца, т.е. в направлении нормальных гастрюляционных движений. Кроме того, обращает на себя внимание “обтекание” клетками одной из неподвижных игл (рис. 1В).

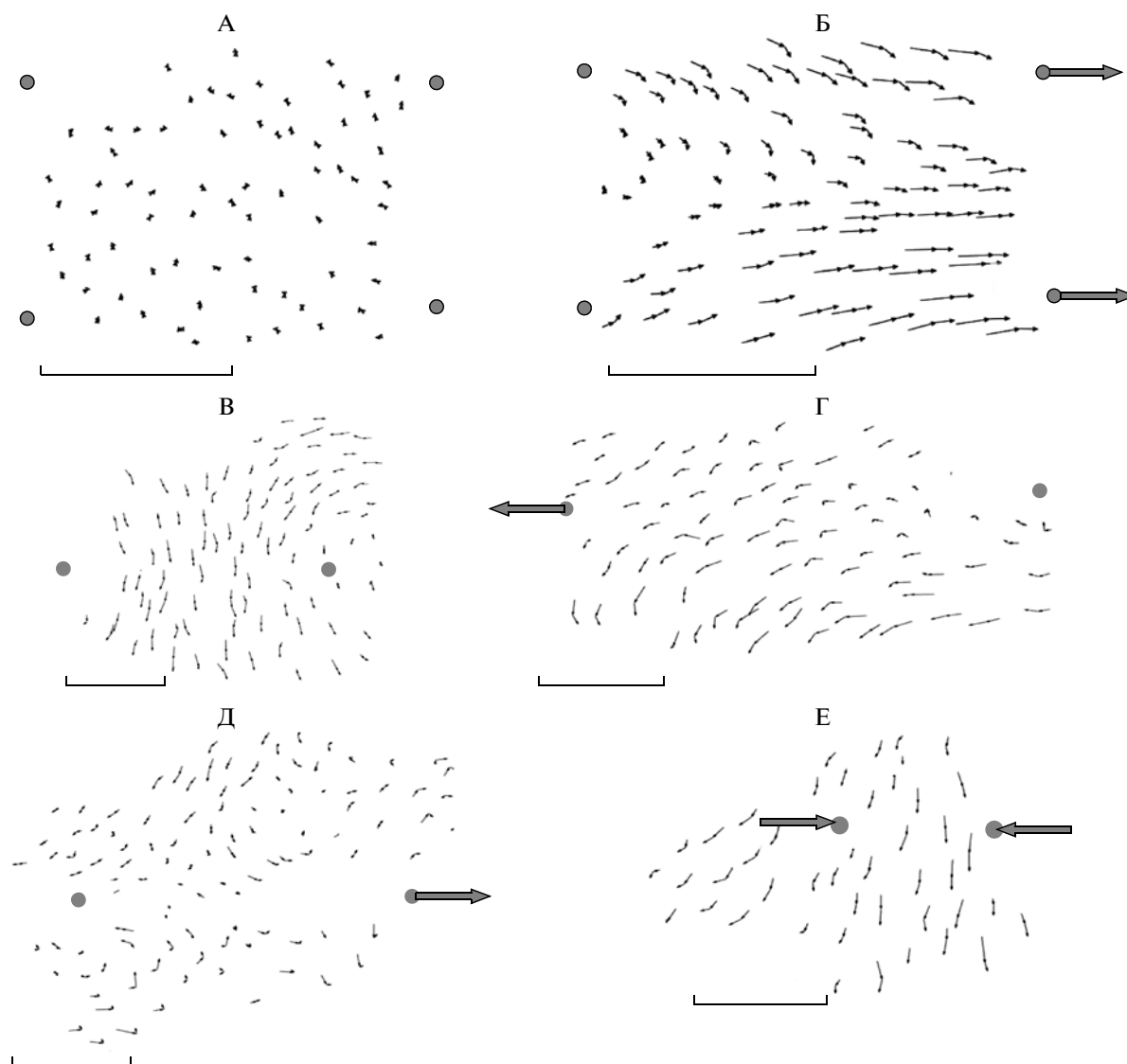


Рис. 1. Векторы движений клеток эпидермиса контрольных (А, В), растянутых (Б, Г, Д) и сжатого (Е) образца. А, Б: эксплантаты крыши бластоцеля (КБс). В–Е: эксплантаты супраластополярной области (СБО). Кружки обозначают иглы, стрелки – направления растяжения (Б, Г) или сжатия (Е). Масштабные линейки на А, Б – 500 μm ; на В–Е – 250 μm . На В–Е передне-заднее относительно оси зародыша направление – сверху вниз.

На растянутых образцах эти различия более отчетливы. В КБс четко выделяются два клеточных потока: один – к источнику растягивающей силы, другой – перпендикулярный к первому потоку и направленный в его сторону (рис. 1Б). Между тем, в растянутых СБОс либо сохраняется, хотя и в ослабленной форме, тенденция движения к заднему полюсу (рис. 1Г), либо возникают сложные вихри (рис. 1Д). В сжатых образцах почти все клетки двигались к заднему полюсу перпендикулярно направлению сжатия (рис. 1Е).

2. Взаимные смещения клеток (табл. 1)

Как видно из табл. 1, в контрольных КБс средние значения скоростей дивергентных и конвергентных взаимных смещений клеток приблизи-

тельно равны между собой и существенно ниже средних скоростей соответственных смещений во всех остальных группах образцов. Растяжение КБс повышало средние $V_{\text{вз}}$ более чем вдвое и уменьшало средние углы между ними, т.е. делало клеточные движения более параллельными (табл. 1; ср. рис. 2А и 2Б). Последнее наблюдалось и в сжатых образцах СБОс (рис. 2Д). С другой стороны, в растянутых СБОс существенно возрастал процент клеток, расходящихся под углами, большими 60° (ср. рис. 2В и 2Г). Во всех типах образцов средние скорости дивергентных смещений были выше, чем у конвергентных, т.е. расстояния между клетками в основном возрастали, кроме того, во всех сериях, кроме растянутых КБс, выше была и доля расходящихся клеток.

Таблица 1. Средние скорости (μм/мин) и средние углы α дивергентных и конвергентных взаимных смещений клеток в разных группах образцов. В скобках – число измерений

	Дивергентные смещения		Конвергентные смещения	
	Ср. скорости	Ср. углы, °	Ср. скорости	Ср. углы, °
КБс контрольные	0.13 ± 0.11 (577)	21	0.12 ± 0.10 (476)	21
КБс растянутые	0.31 ± 0.24 (642)	10	0.25 ± 0.19 (709)	10
СБО контрольные	0.33 ± 0.28 (1416)	21	0.20 ± 0.22 (712)	15
СБО растянутые	0.32 ± 0.24 (882)	22	0.21 ± 0.25 (494)	20
СБО сжатые	0.33 ± 0.26 (804)	12.7	0.19 ± 0.22 (286)	14.5

Таблица 2. Средние скорости клеточных движений относительно неподвижных точек за первые 5 мин в растянутых и контрольных образцах внутри 20-градусных секторов, совпадающих с направлением растяжения и перпендикулярных им. Выделены значения скоростей внутри секторов, соответствующих направлениям растяжения

Границы секторов	СБОс растянутые	СБОс контроли	КБс растянутые	КБс контроли
350–10°	6.07 ± 3.14 (n = 48)	4.40 ± 2.27 (n = 13)	6.91 ± 3.28 (n = 184)	1.62 ± 1.16 (n = 24)
80–100°	2.07 ± 1.13 (n = 9)	1.80 ± 0.42 (n = 10)	2.11 ± 1.07 (n = 7)	0.70 ± 0.24 (n = 17)
170–190°	6.13 ± 3.13 (n = 67)	3.44 ± 1.22 (n = 28)	7.67 ± 3.30 (n = 17)	1.06 ± 0.62 (n = 15)
260–280°	1.71 ± 0.88 (n = 5)	4.05 ± 1.34 (n = 84)	4.58 ± 1.51 (n = 14)	1.72 ± 0.62 (n = 33)

3. Движения клеток относительно неподвижных точек

3.1. Угловые распределения V_{напр} для СБОс и КБс

Как видно из рис. 3, деформации образцов обоих типов приводили к быстрому и резкому перераспределению максимальных скоростей V_{напр} в направлениях растяжения или перпендикулярно

направлениям сжатия (ср. А, Б с В, Г, Е, Ж с З, И с К, Л). Разности по V_{напр} между секторами, близкими к осям растяжения, и перпендикулярными к ним секторами высоко достоверны (табл. 2). Между тем, в контрольных образцах разности V_{напр} между взаимно перпендикулярными секторами различались между собой недостоверно и были достоверно меньше таковых в растянутых или сжа-

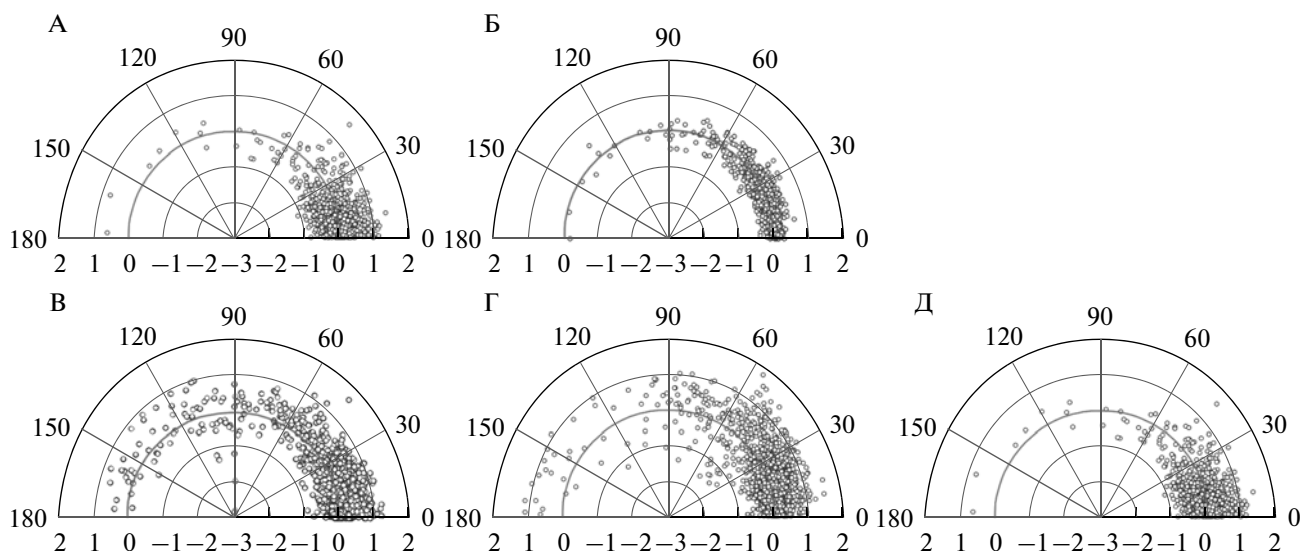


Рис. 2. Круговые диаграммы взаимных смещений клеток. А, Б: данные соответственно по контрольным и растянутым образцам КБс. В: растянутые, Г: контрольные, Д: сжатые образцы СБОс. Положительные радиальные координаты соответствуют дивергентным, отрицательные координаты – конвергентным взаимным смещениям клеток.

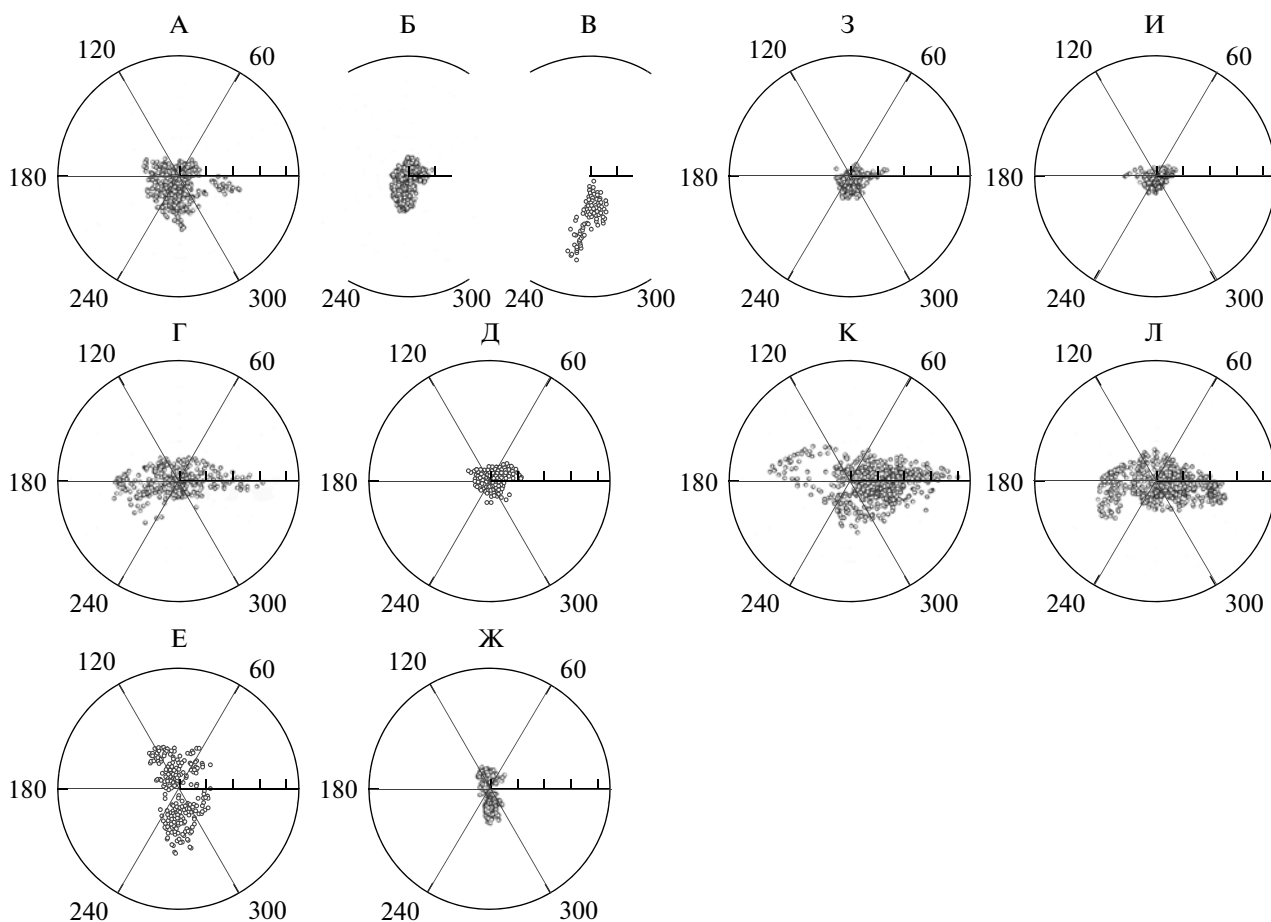


Рис. 3. Угловые диаграммы $V_{\text{напр}}$. Направление растяжения или сжатия горизонтальное, тянущие иглы справа. А, Б – контрольные, В – интактные, Г, Д – растянутые, Е, Ж – сжатые СБОс, З, И – контрольные, К, Л – растянутые КБс. Кадры А, Г, Е, З, К соответствуют периодам 0–5 мин, кадры Б, Д, Ж, И, Л – периодам 6–15 мин для образцов, представленных слева.

тых образцах. Проводили также оценку различий между контрольными и опытными СБОс, сравнивая разности Δ между $V_{\text{напр}}$ внутри суммы секторов ($0-20^\circ + 180-200^\circ$) (направления оси тяги) с $V_{\text{напр}}$ внутри сектора $260-300^\circ$ (характерное направление движений клеток контрольных СБОс к заднему полюсу). Получили

$$\Delta (\text{контрольные образцы}) = -85 \pm 402 (n = 29)$$

$$\Delta (\text{растянутые образцы}) = 229 \pm 508 (n = 20)$$

$$\Delta (\text{сжатые образцы}) = -158 \pm 318 (n = 21)$$

Различия между Δ контрольных и растянутых образцов, а также между Δ контрольных и сжатых образцов были высоко достоверны.

3.2. Зависимость $V_{\text{напр}}$ от степени растяжения образцов

Средние значения $V_{\text{напр}}$, измеренные на КБс, четко коррелировали с величиной растяжения образцов ($r = 0.78$ для периода 0–6 мин и $r = 0.57$ для

периода 6–15 мин). Однако наблюдался достаточно высокий порог реакции на растяжение: $V_{\text{напр}}$ достоверно возросло лишь при растяжении в два раза для периода 0–6 мин и при еще более сильном растяжении для последующего периода (рис. 4А, 4Б). Зависимости скоростей от растяжения лучше всего аппроксимировались не линейной или показательной, а степенной (параболической) функцией.

3.3. Угловые распределения массопереносов клеток

Угловые распределения массопереносов M в общем соответствуют угловым распределениям $V_{\text{напр}}$, однако имеются и некоторые различия (рис. 5). А именно, в КБс массоперенос в сторону сдвинутых игл (на рис. 3 направо) значительно превышает массоперенос в противоположную сторону, хотя различие между $V_{\text{напр}}$ по этим двум направлениям не существенно. В сжатых СБОс, в отличие от $V_{\text{напр}}$, резко преобладает массоперенос к

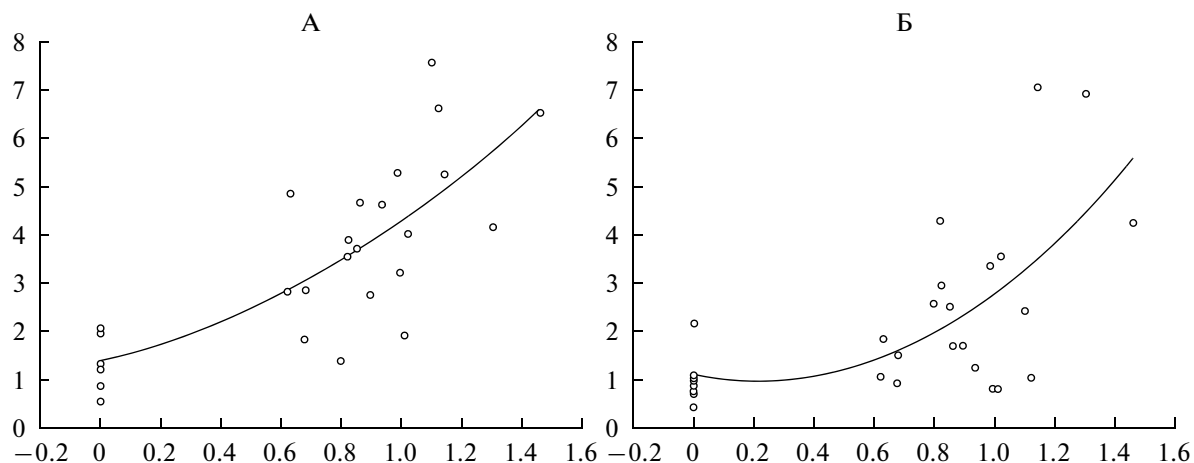


Рис. 4. Зависимости $V_{\text{напр}}$ от степени растяжения КБс за период 0–6 мин (А) и 6–15 мин (Б). Абсцисса: растяжение, %. Ордината: средние значения $V_{\text{напр}}$ для данного образца, $\mu\text{м}/\text{мин}$.

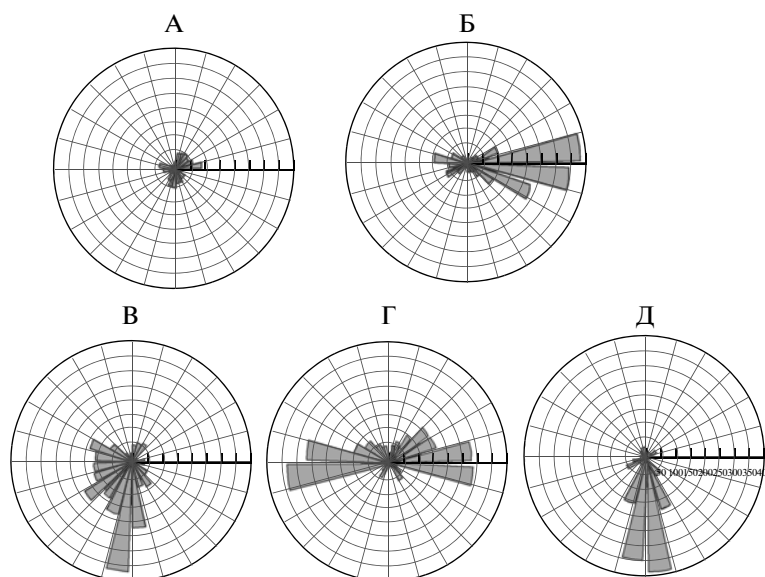


Рис. 5. Угловые диаграммы массопереносов клеток внутри секторов по 15° для периодов 0–15 мин после фиксации образцов. А: в контрольных, Б: в растянутых КБс; В: в контрольных, Г: в растянутых; Д: в сжатых СБОс. Масштаб диаграммы А в 3 раза крупнее, нежели Б, диаграммы Д в 2 раза крупнее, нежели В, Г. У диаграмм В, Г масштабы одинаковые.

заднему полюсу. Отметим, что по признаку массопереноса угловая поляризация в растянутых и сжатых образцах значительно превышает таковую по признаку средних скоростей. Например, если в растянутых образцах обоих типов $V_{\text{напр}}$ в направлении растяжения превышает таковую в перпендикулярном направлении в 3–3.5 раза (табл. 2), то по признаку массопереноса аналогичные отношения для СБОс составляют 6.8–7.7 раза, а для КБс превышают 33! Это обстоятельство связано с наличием достоверных корреляций между величинами N и $V_{\text{напр}}$, что не тривиально (см. Обсуждение). Если

брать для измерений узкие угловые секторы внутри областей с мощными клеточными потоками, то достоверные корреляции между величинами N и $V_{\text{напр}}$ обнаруживаются во всех типах образцов за исключением контрольных КБс (табл. 3).

Особенно наглядны эти корреляции на угловых развертках (рис. 6). Видно, что в областях с более редким расположением движущихся клеток их скорости существенно ниже, тогда как при переходе к областям с более густым расположением они постепенно возрастают.

Таблица 3. Корреляции $N/V_{\text{напр}}$ внутри 10-градусных угловых секторов, соответствующих угловым диапазонам доминирующих клеточных потоков. В измерения включены все образцы данных серий. Все корреляции достоверны

Типы образцов и угловые диапазоны	Коэффициенты корреляций $N/V_{\text{напр}}$
СБОс контроли, 240–300°	+0.84
СБОс растянутые, 0–60°	+0.83
СБОс сжатые, 240–300°	+0.87
КБс контроли, 0–200°	+0.58
КБс растянутые, 0–200°	+0.86

Таблица 4. Дивергенция и конвергенция клеток (средние скорости за 15 мин, $\mu\text{м}/\text{мин}$) в различных сериях СБОс

	Дивергенция	Конвергенция
СБОс контроль	22.9 ± 21.7 ($n=229$)	25.4 ± 21.0 ($n=234$)
СБОс растянутые	12.6 ± 9.1 ($n=171$)	13.2 ± 9.1 ($n=201$)
СБОс сжатые	35.4 ± 21.3 ($n=136$)	24.6 ± 17.8 ($n=151$)

4. Оценка конвергенции клеток к оси растяжения образцов

В растянутых КБс наблюдается высоко достоверная конвергенция клеток к оси растяжения (среднее расстояние, пройденное клетками в данном направлении, за 14 мин составляет $20.89 \pm$

$\pm 17.63 \mu\text{м}$; $n = 639$), тогда как в контрольных образцах соответственная величина недостоверно отличается от нулевой ($0.96 \pm -9.17 \mu\text{м}$; $n = 384$). Средняя скорость конвергенции в растянутых КБс составляет $1.4 \mu\text{м}/\text{мин}$. В растянутых образцах СБОс конвергенции к оси растяжения не наблюдается, однако скорость потока клеток, перпендикулярного оси растяжения, у них достоверно меньше (примерно вдвое), нежели в контрольных и особенно в сжатых эксплантатах. Кроме того, в сжатых образцах дивергенция (уход клеток от оси сжатия) достоверно превышает соответствующие величины в двух других сериях (табл. 4).

5. Зависимости скоростей смещений клеток КБс от их расстояний до средней точки между двумя растягивающими иглами (условно: до точки приложения силы)

В большинстве растянутых КБс (в противоположность контрольным образцам) наблюдали четкую обратную корреляцию между величиной сдвига данной клетки к точке приложения силы и расстоянием клетки до этой точки: чем меньше расстояние, тем больше сдвиг. Кроме того, наблюдали корреляцию между графиками сдвигов за оба временных периода (табл. 5). Вместе с тем, сдвиги за второй период были меньшими, чем за первый, и часто были сдвинуты в область отрицательных значений (клетки двигались прочь от точки приложения силы) (рис. 7).

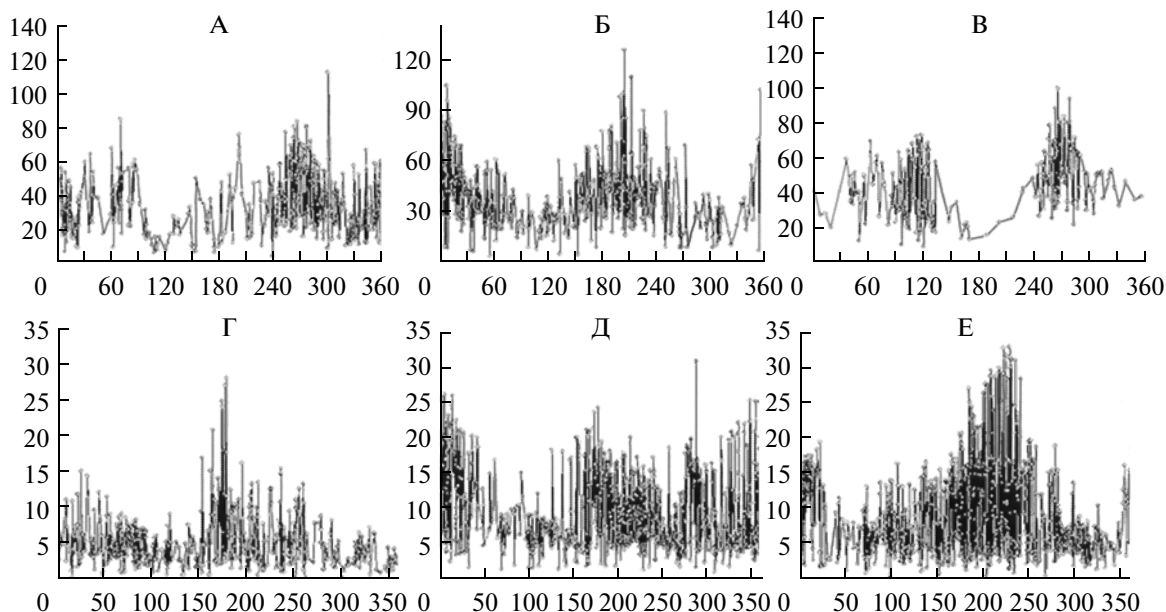


Рис. 6. Угловые развертки по полному набору образцов данных серий опытов, демонстрирующие массопереносы клеток. Абсциссы: углы в диапазоне 0–360°. Ординаты: $V_{\text{напр}}$. А: контрольные, Б: растянутые, В: сжатые СБОс, Г: контрольные, Д: растянутые в течение 5 мин, Е: растянутые в течение 16 мин КБс.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной результат данной работы, относящийся к образцам обоих типов, состоит в том, что сразу же после закрепления эксплантата эмбриональной ткани в растянутом состоянии клетки эпизектодермы начинают двигаться вдоль направления приложенной силы (или — при растяжении двумя иглами — вдоль равнодействующей этих сил) с достоверно более высокими скоростями, нежели во всех других направлениях. Кроме того, регистрируется практически линейная прямая корреляция между средней скоростью и количеством клеток, движущихся внутри некоторого углового сектора. Это соотношение не тривиально и заслуживает специального обсуждения. Чисто феноменологически оно выражается простой формулой

$$M = kN,$$

где M — средняя скорость клеток, N — их число. Поскольку по определению

$$M = \Sigma (V_{\text{напр}})/N,$$

где $\Sigma (V_{\text{напр}})$ — сумма скоростей всех клеток, движущихся внутри данного сектора,

$$\Sigma (V_{\text{напр}}) = kN^2.$$

Мы получаем, что сумма скоростей пропорциональна не количеству клеток (что было бы при независимых клеточных движениях), а квадрату их

Таблица 5. Коэффициенты корреляции между скоростями смещения клеток опытных и контрольных образцов за указанные периоды времени и их расстояниями до ближайшей точки приложения силы и между графиками скоростей смещения клеток одних и тех же образцов в последовательные периоды времени

	1–5 мин	6–15 мин	(1–5)/(6–15)
КБс растян (n = 8)	-0.67 ± 0.14	-0.74 ± 0.17	0.67 ± 0.42
КБс контр (n = 8)	0.17 ± 0.48	0.01 ± 0.65	0.34 ± 0.33

количества. Такая нелинейность свидетельствует о том, что движения клеток *кооперативны*: клетки, движущиеся под малыми углами, как бы “помогают” друг другу.

Кооперативность обеспечивает чрезвычайно мощные переносы клеточных масс в направлении растяжения (или в направлении, перпендикулярном сжатию) образцов: как уже говорилось выше, соотношения массопереносов в направлении растяжения к таковым в перпендикулярном направлении превышают аналогичные соотношения для

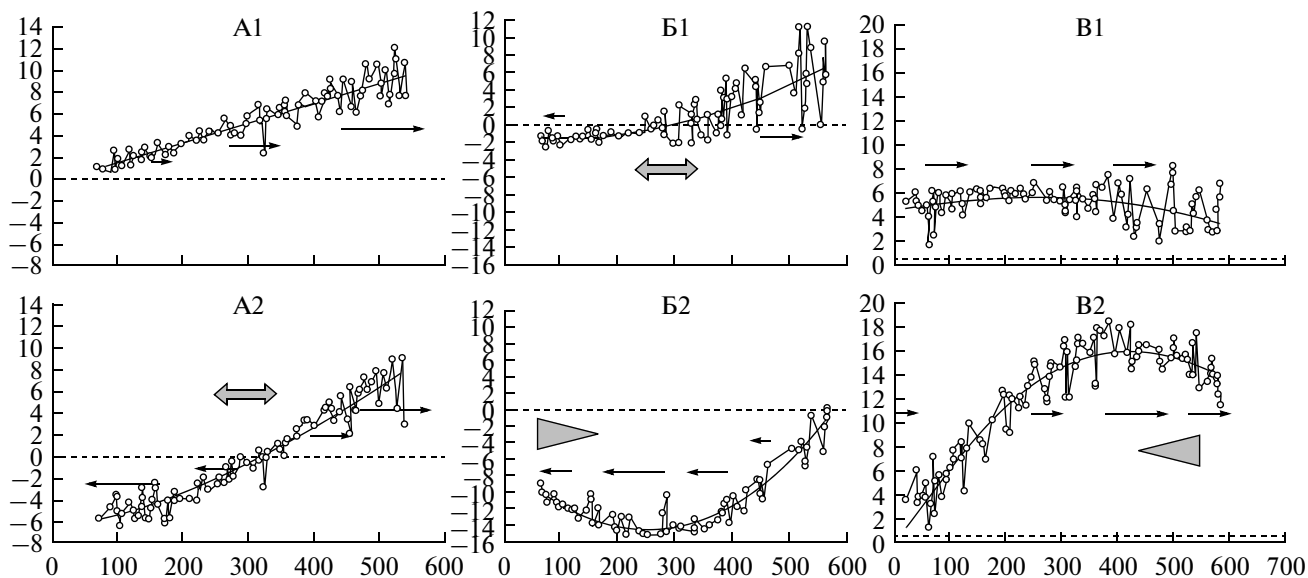


Рис. 7. Сдвиги клеток трех образцов КБс вдоль оси растяжения (ординаты) как функции их расстояний до точки приложения силы (расположена справа). Кадры А1–В1 относятся к периоду 1–5 мин, кадры А2–Е2 — для тех же образцов в период 6–15 мин. Горизонтальная линия соответствует нулевому сдвигу: значения выше этой линии (положительные) — сдвиги клеток к точке приложения силы, ниже линии (отрицательные) — сдвиги в обратную сторону. Односторонние стрелки показывают относительные величины смещений клеток, двусторонние стрелки на Б1 и А2 — зоны расхождения клеток в противоположных направлениях, треугольники на Б2, В2 указывают своими основаниями на зоны уплотнений клеточного расположения.

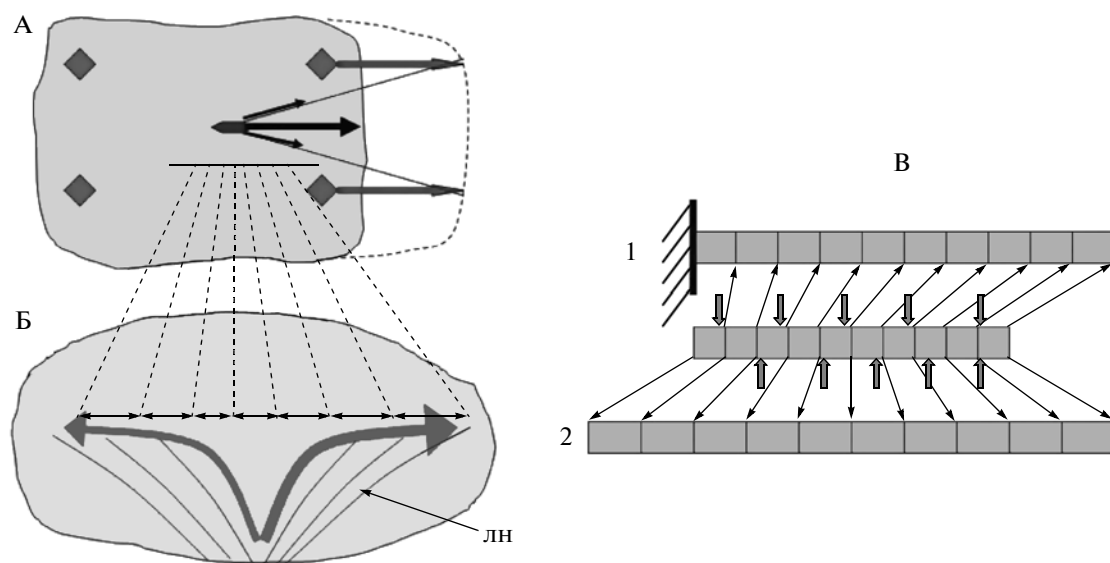


Рис. 8. Схема конвергентной интеркаляции в КБс, растянутом двумя иглами. А: схема растяжения, ромбы обозначают неподвижные иглы (слева) и сдвинутые (справа). Клетки смещаются под действием равнодействующей силы. Б: большие изогнутые стрелки – конвергенция клеток и встраивание их в осевой ряд. Двусторонние стрелки – растяжение осевого ряда клеток в результате встраивания; лн – линии натяжения. В: удлинение осевого ряда в результате встраивания при наличии жесткой опоры справа (1) и в отсутствии такой опоры (2).

контрольных образцов СБОс в 7 раз, а для КБс – в 33 раза. Из приведенных выше данных следует, что длина образцов в направлении их растяжения возрастает не более, чем в 2.5 раза (обычно – в 1.5–2 раза), и значит в отсутствие массопереносов примерно во столько же раз должна уменьшиться клеточная плотность в этом направлении. Мы видим, что при самых грубых оценках массопереносы существенно перекрывают это уменьшение, то есть заметно повышают клеточную плотность в направлении растяжения по сравнению с исходной.

Дальнейшее уточнение этой оценки проведем на образцах КБс, у которых реакции на растяжение вообще более сильные и определенные, нежели у СБОс (рис. 8).

Как уже говорилось, у КБс регистрируется достоверная конвергенция клеток к оси растяжения. Конвергенция, несомненно, является одной из основных компонент реакции на растяжение и в большой степени ответственна за массопереносы вдоль оси тяги (рис. 8Б). Последние создают поля натяжений (рис. 8Б, лн), вовлекающие в конвергенцию новый клеточный материал. Рассмотрим связь конвергенции с растяжением образца вдоль оси его растяжения. Как уже говорилось, между скоростью V смещения данной клетки вдоль оси растяжения и ее расстоянием L до точки приложения силы существует достоверная обратная корреляция, которая в большинстве случаев близка к

линейной (рис. 7, А1, А2), хотя наблюдаются и существенные отклонения (рис. 7, Б2, В2), а также движение прочь от ближайшего источника силы (рис. 7, часть графика А2, Б2). Как можно согласовать эти соотношения с процессом конвергенции клеток к осевой линии?

Прежде всего заметим, что обратная пропорциональность между значениями V и L вовсе не означает, что клетки активно мигрируют к ближайшему источнику силы – такому предположению противоречат упоминавшиеся выше движения клеток от источника. Напротив, все описанные типы движений клеток относительно источников силы можно объяснить, если принять, что плотно упакованные клетки осевого ряда расталкиваются благодаря конвергентной интеркаляции более латеральных клеток в этот ряд. Тогда, если на конце ряда, удаленном от источника силы, имеется жесткая точка опоры, весь ряд будет смещаться в сторону источника силы, что проявится в линейной корреляции в положительной области, то есть все клетки будут двигаться в сторону ближайшего источника (рис. 7, А1, рис. 8, В1). Если такой опоры нет, возможно смещение как в сторону ближайшего источника, так и от него (рис. 7, А2, Б1, двусторонние стрелки; рис. 8, Б2), причем нулевой точкой будет та, где конвергентная интеркаляция начинается и/или протекает более интенсивно. Приблизительно постоянные значения V вдоль L

(рис. 6, В1) указывают на то, что встраивание клеток произошло только в крайне левом участке ряда. Более сложные, нелинейные зависимости V от L отражают неоднородные распределения интенсивностей встраивания, в результате чего могут возникнуть зоны более плотного клеточного расположения (рис. 6, Б2, В2, треугольники). Следует обратить внимание также на более локальные неравномерности по V (например, правые части графиков Б1 и В1), которые тоже могут приводить к неоднородной плотности клеточного расположения.

Дадим следующую грубую оценку растяжения осевого ряда клеток под действием конвергентной интеркаляции. Принимая площадь клетки равной $10 \times 10 \mu\text{m}$, получаем, что при скорости конвергенции $\approx 20 \mu\text{m}/14$ мин в каждом месте ряда, где конвергенция происходит, за этот период времени встраивается несколько более одной клетки. Если (что следует из приведенных данных) в большинстве случаев конвергентная интеркаляция происходит по всей длине ряда, то последний за этот период времени удлинится более, чем вдвое, т.е. примерно настолько, насколько был растянут образец под действием внешней силы. Мы видим, что интенсивность конвергентной интеркаляции по порядку величин достаточна, чтобы восстановить исходные значения клеточной плотности.

Другие важные особенности реакции КБс на растяжение таковы: (1) более чем двукратное повышение $V_{\text{вз}}$, т.е. ускорение не только направленных клеточных движений, но и ненаправленного “перемешивания” клеток; (2) нелинейное (параболическое) возрастание $V_{\text{напр}}$. Возможно, что обе реакции взаимосвязаны, указывая на существенные изменения нормы реакций ткани под действием внешней силы.

Обращаясь теперь к СБОс, нетрудно видеть, что основные механозависимые реакции (возрастание скоростей клеточных смещений, массоперенос по направлению тяги) хотя и присутствуют, но выражены существенно слабее, нежели в КБс. В частности, отсутствует конвергенция клеток к оси растяжения. Мы это объясняем тем, что в противоположность КБс, которые сами по себе лишены определенных кинетических тенденций, СБОс обладают выраженными и весьма устойчивыми тенденциями к движению клеток в передне-заднем направлении и их конвергенции к исходной продольной оси образцов (а не к оси их растяжения). Поперечное растяжение ослабляет эти тенденции, но очевидно не достаточно, чтобы заменить их на прямо противоположные. Ослабление выражается

в том, что в растянутых образцах передне-задний клеточный поток достоверно (вдвое) замедляется (табл. 5).

В противоположность КБс, растяжение СБОс не приводит к возрастанию $V_{\text{вз}}$. Это можно связать с тем, что уже в контрольных образцах данная величина равна таковой для растянутых КБс. Таким образом, высокий “коэффициент перемешивания” клеток для образцов СБО является конститутивным, тогда как в образцах КБ он индуцируется растяжением. Можно думать, что это связано с более широкими морфогенетическими и дифференцировочными потенциями СБОс, требующими клеточных перегруппировок.

В целом можно сделать вывод, что реакции эмбриональных тканей на деформации не сводятся к движениям отдельных клеток вдоль линий растяжения (или перпендикулярно сжатию), а представляют собой коллективные процессы, вовлекающие в себя практически все клетки образцов и проявляющие признаки кооперативности (нелинейности).

Работа поддержана грантом РФФИ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Глаголева Н.С., Белоусов Л.В., Штейн А.А., Лучинская Н.Н. Количественное исследование региональных и стадийспецифичных реакций эмбриональных тканей шпорцевой лягушки на механическую нагрузку // Онтогенез. 2003. Т. 34. С. 292–300.
- Belousov L.V., Louchinskaia N.N., Stein A.A. Tension-dependent collective cell movements in the early gastrula ectoderm of *Xenopus laevis* embryos // Dev. Genes. Evol. 2000. V. 210. P. 92–104.
- Keller R.L., Davidson A., Edlund T., Elul M., Shook D., Skoglund P. Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2000. V. 355. P. 897–922.
- Kornikova E.S., Korvin-Pavlovskaya E.G., Belousov L.V. Relocations of cell convergence sites and formation of pharyngula-like shapes in mechanically relaxed *Xenopus* embryos // Development, Genes and Evolution. 2009. V. 219. P. 1–10.
- Keller R., Shook D., Skoglund P. The forces that shape embryos: physical aspects of convergent extension by cell intercalation // Phys Biol. 2008. Apr 10. 5(1). P. 015007.
- Nieuwkoop P.D., Faber J. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North-Holland Publ. 1956.
- Wallingford J.B., Fraser S.E., Harland R.M. Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development // Dev. Cell. 2002. 2(6). P. 695–706.
- Tahinci E., Symes K. Distinct functions of Rho and Rac are required for convergent extension during *Xenopus* gastrulation // Dev. Biol. 2003. № 15. V. 259(2). P. 318–35.

Statistical Study of Rapid Mechanodependent Cell Movements in Deformed Explants of African Clawed Frog *Xenopus laevis* Embryonic Tissues

T. G. Troshina, N. S. Glagoleva, and L. V. Belousov

Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
e-mail: morphogenesis@yandex.ru

Abstract—Computer analysis of artificially deformed (stretched or compressed) double explants (sandwiches) of the blastocoel roof (BRs) and suprablastoporal region (SBRs) of African clawed frog *Xenopus laevis* early gastrula has been performed using frames of time-lapse microfilming. During the first 14 min after cutting off, the velocities and displacement angles of several hundreds of cells relative to one another, as well as to fixed points and the extension axis, were measured in the control and deformed samples. It has been found that the deformation of samples leads to a rapid reorientation of large cell masses and increase in the velocities of movements along the extension axes or perpendicularly to the compression axes. In addition, an increase in the velocities of mutual cell displacements in the stretched BRs and cell convergence to the extension axes have been observed. Comparison of different angular sectors demonstrates a statistically significant positive correlation between the mean velocities of cell movements and the number of cells moving within an individual sector. This suggests cooperativity of mechanodependent cell movements. In general, these results demonstrate an important role of mechanical factors in regulation of collective cell movements.

Keywords: cell movements, mechanical tensions, cooperativity, *Xenopus laevis* gastrula