

УДК 591.392

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ЧАСТИЧНОГО УДАЛЕНИЯ ЦИТОПЛАЗМЫ БЛАСТОМЕРОВ В РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ВЬЮНА *Misgurnus fossilis* L.

© 2011 г. Е. Г. Ивашкин¹*, В. Г. Черданцев²

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

*E-mail: veliger@ya.ru

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет
119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

Поступила в редакцию 12.08.10 г.

Окончательный вариант получен 31.01.11 г.

Развитие зародышей вьюна успешно регулируется после удаления части цитоплазматического материала из одной клетки на стадиях 2-х или 4-х бластомеров или полного удаления одной или двух клеток на стадии 8–16-и бластомеров, причем регуляция складывается из двух фаз. С помощью цейтраферной съемки и морфометрического анализа показано, что в первой фазе происходит быстрое, в течение одного-двух клеточных циклов, и практически полное восстановление исходного соотношения объемов бластодиска и желточного мешка, а во второй фазе морфогенез модифицируется в соответствии с новыми особенностями строения зародыша, созданными операцией. Оставшаяся цитоплазма оперированного бластомера после нескольких этапов цитокинеза сливается с краевым желточным синцитием (перибластом), образующим на стадии бластулы заметное расширение на месте операции, которое становится местом формирования зародышевого щитка. По данным морфометрического анализа, восстановление относительного объема бластодермы у оперированных зародышей ведет к уменьшению величины активного натяжения границы раздела бластодермы и желтка и увеличению отношения поверхности бластодермы к ее объему в момент инициации эпиболии. В результате конвергенция клеток бластодермы к месту операции и оформление зародышевого щитка начинаются при меньшей степени эпиболии, чем в контроле.

Ключевые слова: эмбриогенез, костистые рыбы, вьюн, дробление, удаление бластомеров, регуляция, морфогенез, морфометрия.

Эволюционно устойчивой особенностью эмбриогенеза костистых рыб является ранняя сегрегация сначала желтка и цитоплазмы, а затем клеток, представляющих эмбриональную (бластодерма) и три экстраэмбриональных фракции — перидерму (клеточную оболочку), перибласт (желточный синцитий) и желточный мешок (Morgan, 1895; Oppenheimer, 1947; Игнатьева, 1979; Trinkaus, 1993). Сегрегация заходит так далеко, что клетки бластодермы не синтезируют собственных аминокислот, а получают их из желточного мешка путем активного транспорта. Из-за этого, в частности, изолированная от желтка бластодерма не может жить *in vitro* в солевом растворе без добавления питательной среды (Trinkaus, Drake, 1956).

Казалось бы, такой (меробластический) тип развития требует строгого соблюдения количественных пропорций эмбрионального и экстраэмбрионального материала, однако у костистых рыб соотношение объема цитоплазмы и желтка варьирует в чрезвычайно широких пределах. У лосося

объем бластодиска составляет 1/30, у хариуса — 1/25, сига — 1/8, ряпушки — 1/4, снетка — 1/3 объема желтка. Его увеличение всегда ведет к смещению формирования зародышевого кольца (ЗК) и закладки зародышевого щитка (ЗЩ) на более ранние стадии эпиболии — у лосося и форели ЗК и ЗЩ возникают, когда бластодерма покрывает 1/10–1/15 часть яйца, а у снетка — практически в момент завершения обрастания желтка (Мешков, Лебедева, 1977). При этом создается впечатление, что ответ на изменение соотношения объемов бластодиска и желтка детерминирован не только на генетическом, но и на эпигенетическом уровне, являясь следствием геометрии и механики самого морфогенеза (Черданцева, Черданцев, 1985; Черданцев, 2003).

На эту мысль, в частности, наводят опыты с удалением или, наоборот, инъекцией небольшого количества желтка в желточный мешок зародышей вьюна, так как уменьшение относительного объема желтка ускоряет, а увеличение замедляет эпибо-

лию (Корвин-Павловская и др., 1996, 2006; Слепцова и др., 2004). В этих опытах получается примерно такая же связь между уменьшением доли свободной от желтка цитоплазмы и сдвигом формирования ЗЩ на более ранние стадии эпиболии, какую мы наблюдаем на сравнительно-морфологическом уровне. Наконец, то же самое можно наблюдать, анализируя нормальную индивидуальную изменчивость морфогенеза вьюна (Неклюдова и др., 2007; Черданцев, неопубликованные наблюдения).

О том, что такая связь детерминирована на эпигенетическом уровне, можно говорить потому, что у костистых рыб эпиблия связана с пространственно-временным чередованием фаз утолщения и растяжения краевой зоны бластодермы. Задержка эпиболии в любой данной области делает ее центром конвергенции клеток, мигрирующих в краевую зону, что создает условия для формирования ЗЩ (Cherdantseva, Cherdantsev, 2006).

Это объясняет, каким образом (по крайней мере, в принципе) морфогенез бластодермы костистых рыб отвечает на уменьшение ее относительного объема, но вопрос, каким образом регулируется (и регулируется ли вообще) относительный объем цитоплазмы бластодиска до полной сегрегации эмбрионального и экстраэмбрионального материала, остается открытым. Начиная с классической работы Моргана (Morgan, 1895) на *Fundulus heteroclitus*, в многочисленных опытах было показано, что при удалении бластомеров на ранних стадиях дробления относительный объем бластодермы уменьшается, что, однако, мало препятствует формированию нормальных эмбриональных структур (Lewis, 1912; Hoadley, 1928; Nicholas, Oppenheimer, 1942; Oppenheimer, 1947). Единственным исключением являются опыты на золотой рыбке, в которых при удалении одного из первых двух бластомеров иногда развивались зародыши, лишенные осевых структур (Tung, Tung, 1944). У вьюна при удалении содержимого одного из первых двух бластомеров возможна полная регуляция развития (Корж, 1981).

Во всех этих опытах авторы фиксировали лишь их результат — наличие или отсутствие регуляции — почти не обращая внимания на то, какими путями он достигался. При отсутствии не только количественных данных, но и простых наблюдений за тем, что происходит непосредственно после операции, остается неясным, пытается ли зародыш восстановить исходный объем свободной от желтка цитоплазмы или же дальнейший морфогенез приспособляется к его новому, уменьшенному объему.

Ответ на этот вопрос является основной задачей этой работы. Первоначально мы предполагали, что при удалении цитоплазмы бластомеров относительный объем бластодермы уменьшится

очень сильно и регуляция будет состоять в изменении структуры морфогенетических движений клеток бластодермы применительно к новым условиям. Оказалось, однако, что регуляция является двухфазным процессом. В первой, относительно быстрой фазе, занимающей всего несколько первых циклов дробления, зародыш восстанавливает объем свободной от желтка цитоплазмы, близкий к ее исходному объему. Во второй, более медленной фазе, морфогенез адаптируется к изменению формы бластодермы, возникающему из-за перераспределения цитоплазмы между эмбриональной фракцией клеток и экстраэмбриональными фракциями зародыша. Двухфазный характер регуляции иллюстрирует общий принцип, согласно которому регуляция включает в себя не только возвращение на исходный путь развития, но и движение к одному и тому же результату разными путями (Черданцев, 2003).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Половые продукты самцов и самок вьюна *Misgurnus fossilis* L. получали с помощью стандартной методики (Костомарова, 1975). После оплодотворения развитие икры до необходимой стадии проходило в отстоянной прокипяченной воде при температуре от 18 до 21°C. Для проведения операций зародышей помещали в чашку Петри с 5 мл 1× раствора Гольтфретера. Экспериментальные манипуляции с зародышами проводили без их извлечения из желточной оболочки, ограничиваясь ее проколом над местом операции.

Цитоплазматический материал удаляли с помощью микроинъектора, имеющего в своей конструкции микровинт, регулирующий положение подпружиненного поршня, который, в свою очередь, ходит в заполненной водой шприце, согласно методике, описанной ранее (Слепцова и др., 1990б, 2004; Корвин-Павловская и др., 1996). Диаметр использованных в опыте микропипеток подбирали в соответствии с размером бластомеров, от 20 до 90 мкм.

Цитоплазму отсасывали до тех пор, пока бластомер не переставал выделяться над поверхностью желточной клетки. При этом допускалось удаление некоторого количества желтка. При операциях на стадиях 8-ми и 16-ти бластомеров клетки удаляли целиком, вместе с мембраной. Эксперименты проводили в следующих вариантах: удаление большей части цитоплазматического материала одной клетки на стадиях 2-х (серия 2) и 4-х бластомеров (серия 4), а также удаление одной краевой клетки на стадиях 8-ми (серия 8) и 16-и бластомеров (серия 16). Через 30 минут после операции зародышей переносили в отстоянную кипяченую воду.

Выживаемость в разных вариантах опыта (см. пояснения в тексте)

Вариант опыта	Всего зародышей	Кол-во зародышей, достигших стадии бластулы	Кол-во зародышей, достигших стадии личинки
2	175	117 (67%)	55 (31%)
4	225	191 (85%)	148 (66%)
8	70	61 (87%)	45 (64%)
16	35	32 (91%)	20 (57%)
контроль	244	234 (96%)	213 (87%)

Во всех экспериментальных сериях в качестве контроля использовали икру той же кладки, что и в соответствующем опыте.

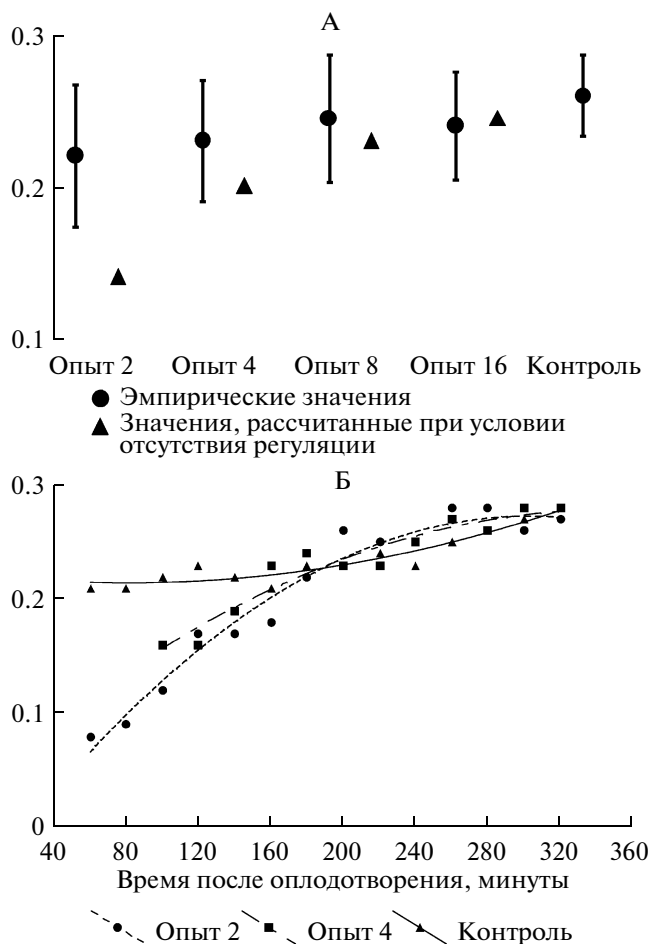


Рис. 1. Восстановление исходного соотношения объемов бластодиска и желтка в опытах с удалением цитоплазматического материала бластомеров: А – отношение объемов бластодермы и всего зародыша на стадии высокой бластулы в разных вариантах опыта (опыт 2, $n = 31$; опыт 4, $n = 37$; опыт 8, $n = 21$; опыт 16, $n = 24$; контроль, $n = 36$); Б – изменение относительных объемов бластодермы отдельных зародышей в вариантах опыта 2, 4 и контроле (на основе покадрового анализа цейтраферной съемки).

Операции и цейтраферную съемку проводили под стереомикроскопом МБС-10 и окулярной камерой SkopeTek DCM-130. Для последующей морфометрии зародыши фотографировали под стереомикроскопом Zeiss Stemi SV11 Apo. Изображения обрабатывали в программе Adobe Photoshop CS, а для морфометрического анализа использовали пакет программ Zeiss AxioVision. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ Statistica 6.0.

Расчет объемов бластодермы и желтка производили на основе измерения площадей оптических сагиттальных срезов зародышей. Под относительным объемом бластодермы понималось отношение ее сагиттальной площади к площади всего зародыша, а на более ранних стадиях развития, когда сегрегация цитоплазмы и желтка еще не закончена, – отношение сагиттальной площади свободной от желтка цитоплазмы бластомеров к площади всего зародыша.

Отношение площади бластодермы к ее объему оценивали на основе измерения периметра наружной поверхности бластодермы на сагиттальном оптическом срезе и ее площади.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Всего было проведено более 1500 микроопераций. Выживаемость зародышей зависела от стадии развития, на которой были произведена операция. Самой высокой была выживаемость в серии 4, а самой низкой – в серии 2 (табл. 1). Гибель зародышей на постгастрюляционных стадиях в серии 16 была несколько выше, чем в сериях 4 и 8.

На стадии высокой бластулы, когда у костистых рыб сегрегация бластодермы от экстраэмбриональных фракций (прежде всего, от перибласта) близка к завершению (Trinkaus, 1993), заметное уменьшение относительного объема бластодермы наблюдалось только в серии 2 (рис. 1А), и то, из-за очень большой изменчивости, оно было на грани статистической достоверности ($p = 0.043$).

Последовательное измерение относительного объема бластодермы у одних и тех же зародышей по данным цейтраферной видеосъемки (рис. 1Б) показывает, что в сериях 2 и 4 относительный объ-

ем цитоплазмы бластодиска возвращается близко к своей исходной величине в течение одного-двух циклов синхронных делений дробления. Из сравнения наклона индивидуальных траекторий в сериях 2 и 4 видно (см. рис. 1Б), что чем сильнее нарушено исходное отношение объемов цитоплазмы и желтка, тем быстрее оно восстанавливается.

В сериях 2 и 4, из-за того, что бластомеры глубоко утоплены в желток, практически невозможно удалить их целиком, вместе с клеточной мембраной, так как при этом повреждается не наружная мембрана данного бластомера, а наружный гелевый слой всего зародыша, что ведет к осмотическому шоку и быстрой, в течение нескольких минут, гибели. Только в тех случаях, когда поверхностная мембрана поврежденного бластомера затягивала нанесенное ей повреждение, он восстанавливал свой объем, всасывая в себя цитоплазму желточного мешка.

Потомки этого бластомера делились медленнее, чем потомки соседних, не затронутых операцией клеток (рис. 2А–2Г). В некоторых случаях замедление дробления также наблюдалось и у потомков клетки, прилегающей к поврежденному бластомеру.

Таким образом, выделяются две пары клеток, и потомки одной пары, не затронутой операцией, продолжают делиться в обычном ритме синхронных делений дробления, причем веретена пятого деления ориентируются не тангенциально, а по нормали к наружной поверхности, так что одна группа дочерних клеток формирует внутренний, а другая – наружный слой клеток бластодермы (см. рис. 2Г). Такая последовательность ориентации веретен воспроизводится в дроблении костистых рыб с большой точностью, так как выделение наружного и внутреннего слоя является первым шагом к сегрегации перидермы (клеточной оболочки) и собственно эмбриональных клеток (Черданцева, Черданцев, 1985; Trinkaus, 1993).

Бластомеры второй пары – оперированный, и тот, который теснее других с ним контактирует, – успевают за это время пройти всего один цикл дробления, образуя всего один слой клеток (см. рис. 2Г). В дальнейшем они уменьшаются в объеме и границы клеток становятся неразличимыми. На стадии высокой бластулы видно, что из материала этих бластомеров образуется краевой перибласт (желточный синцитий), отличающийся от нормального краевого перибласта только тем, что он вытянут вдоль меридиана желточного мешка (рис. 2Д). На стадии поздней бластулы он втягивается под край бластодермы (рис. 2Е) точно так же, как это делает нормальный перибласт при нормальном ходе развития (Trinkaus, 1993).

Один из часто наблюдавшихся вариантов образования дополнительного краевого перибласта в серии 2 представлен на рис. 2Ж–2М. Цитоплазма

поврежденного бластомера перестает дробиться, но остается живой и способной к активному сокращению своей поверхности (рис. 2Ж–2И). В результате она оказывается у края бластодермы (рис. 2К) и полностью сливается с нормальным краевым перибластом, а точка, в которой оказывается, соответствует точке окончательного замыкания окружности бластодермы (рис. 2Л–2М). Таким образом, вся бластодерма и часть перибласта возникают в этом случае из материала только одного из первых двух бластомеров, однако относительный объем бластодермы лишь немного ($p < 0.01$) меньше, чем у контрольных зародышей. Статистически достоверные различия абсолютных объемов желточного мешка и бластодермы вообще отсутствовали, так как эти величины варьировали сильнее, чем их отношение.

Непрерывное наблюдение за развитием после операции ($n = 8$) показало, что в 75% случаев место формирования дополнительного краевого перибласта совпадало с местом закладки зародышевого щитка (рис. 3А, 3Б).

При нормальном ходе развития геометрические центры системы бластодерма–перибласт и собственно бластодермы совпадают друг с другом и с анимальным полюсом яйца (Костомарова, 1975). У оперированных зародышей, из-за утолщения перибласта в оперированном секторе, его плоскость не совпадает с плоскостью бластодермы (рис. 3В). Угол отклонения главной оси симметрии бластодермы от главной оси симметрии краевого перибласта довольно значителен и равен $14.2 \pm 6.3^\circ$ ($n = 35$). Это означает, что в зоне утолщения краевого перибласта (как правило, это зона формирования зародышевого щитка) степень эпиболии меньше, чем на противоположном (вентральном) полюсе бластодермы.

Для анализа морфогенетических последствий удаления целых бластомеров мы объединили зародышей серий 8 и 16 с теми зародышами серии 4, у которых дробление оперированного бластомера полностью восстанавливалось. У всех таких зародышей, ввиду отсутствия дополнительного краевого перибласта, главные оси симметрии бластодермы и перибласта совпадали друг с другом, как при нормальном ходе развития. Мы анализировали их на стадии поздней бластулы, когда основным морфологическим критерием дорсо-вентральной полярности является различие величины краевого угла между наружной поверхностью краевой зоны бластодермы и поверхностью желточного мешка. На дорсальной стороне величина этого угла меньше, чем на вентральной стороне зародыша, что указывает на более высокую величину активного натяжения границы раздела бластодермы с желтком (Черданцева, Черданцев, 1985; Неклюдова и др., 2003; Cherdantseva, Cherdantsev, 2006).

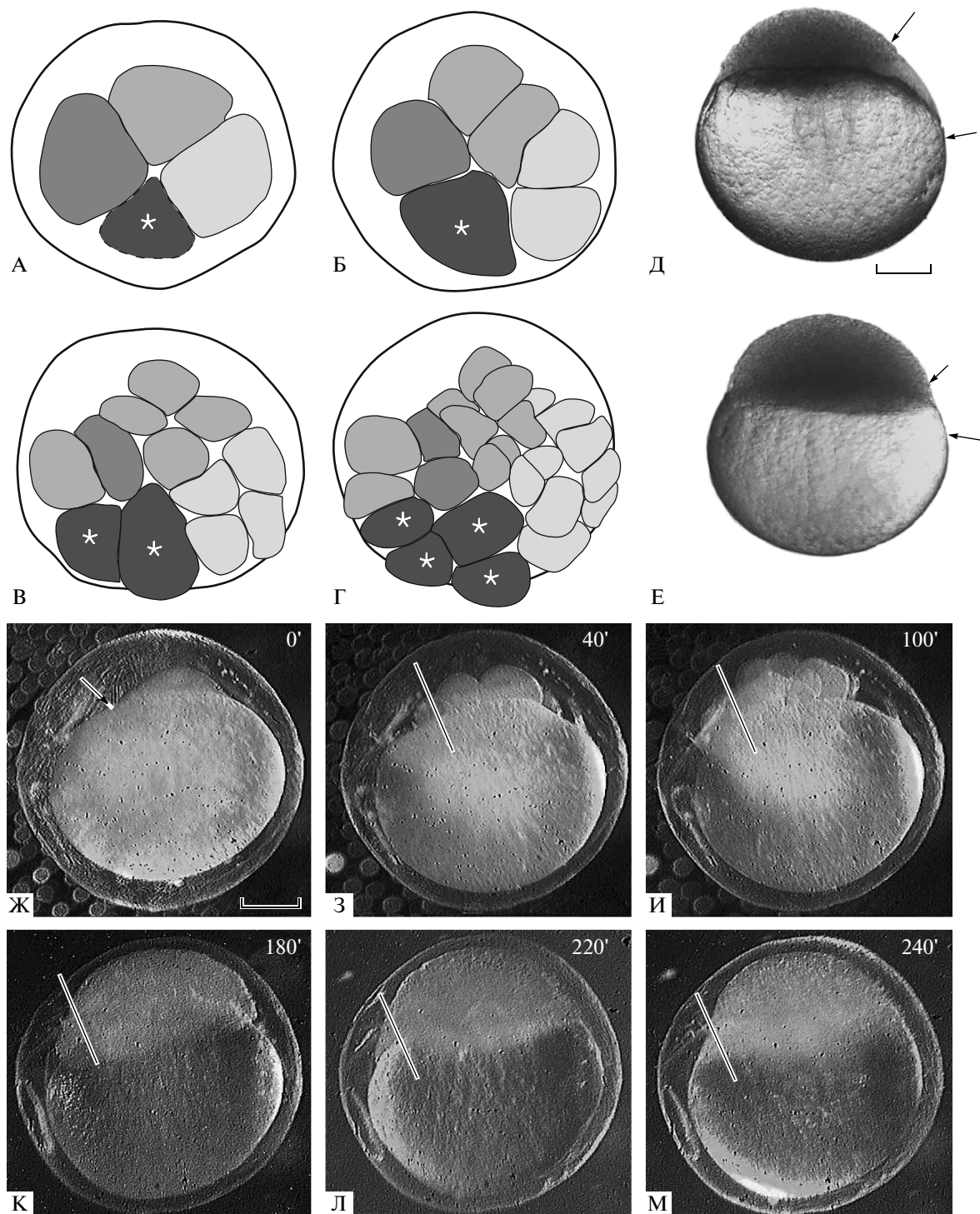


Рис. 2. Ранние последствия удаления цитоплазматического материала blastомеров: А–Г – прорисовка клеточных границ последовательных стадий дробления зародыша, оперированного на стадии 4-х blastомеров, вид с животного полюса. Видно отставание дробления blastомеров-потомков клеток, затронутых операцией. Оперированная клетка и ее потомки помечены звездочками; Д, Е – образование дополнительного краевого перибласта: Д – зародыш на стадии поздней blastулы, у которого ранее был удален цитоплазматический материал одного blastомера на стадии 2-х клеток; Е – нормальный зародыш. Стрелки – дополнительный перибласт и расширение перибласта на будущей дорсальной стороне; Ж–М – последовательные кадры центрифферной съемки зародыша, оперированного на стадии 2-х blastомеров. Время указано в минутах от момента операции. Стрелка – место операции, черта – потомки оперированной клетки, формирующие дополнительный перибласт. Масштабные планки на рисунке соответствуют 200 мкм.

В выделенной группе оперированных зародышей площадь контакта бластодермы с желточным мешком заметно больше (ср. рис. 4А, 4Б), а величина дорсального и вентрального краевого угла достоверно ($p < 0.01$) выше, чем у контрольных зародышей, причем на дорсальной стороне различия между опытом и контролем выражены сильнее (ср. рис. 4В, 4Г). Это означает, что у оперированных зародышей падает активное натяжение границы раздела бластодермы с желтком (возможно — активное натяжение перибласта, см. Черданцева, Черданцев, 1985).

Для этой же группы зародышей на сагиттальных оптических срезах мы измерили отношение периметра наружной поверхности бластодермы к ее площади, считая его показателем, характеризующим отношение площади поверхности бластодермы к ее объему. Небольшие, но все же статистически достоверные ($p < 0.01$) различия между опытом и контролем были получены для стадии 9, в момент инициации эпиболии, когда площадь поверхности раздела бластодермы с желтком начинает увеличиваться за счет ее изгиба (Неклюдова и др., 2003). Величина отношения периметра бластодермы к ее площади оказалась равной 0.029 ± 0.001 в контроле и 0.039 ± 0.002 в опыте — таким образом, в момент начала эпиболии отношение поверхности бластодермы к ее объему выше у оперированных зародышей.

По данным центрифальной съемки (см. рис. 2А–2Г), во всех экспериментальных сериях ЗЩ закладывался на более ранних этапах эпиболии. Из 36 зародышей, оперированных на стадии 4-х бластомеров, у 14 (39%) ЗЩ начинал оформляться тогда, когда окружность бластодермы находилась выше экваториальной плоскости зародыша (степень эпиболии меньше 40%). В контроле это было отмечено лишь для 6 из 20 зародышей (20%).

Как правило, более ранняя (относительно эпиболии) закладка ЗЩ была заметна на глаз (рис. 5А–5Г). Для количественной оценки соотношения хода эпиболии и формирования ЗЩ, мы выбрали коэффициент $E = (D - d)/H$, где D характеризует степень эпиболии бластодермы (расстояние от ее верхнего полюса до ее нижнего края), d — степень развития (меридиональную высоту) ЗЩ, H — абсолютный размер зародыша (рис. 5Д).

Различие величины этого коэффициента у оперированных зародышей серии 2 и контролем оказалось высоко достоверным ($p \ll 0.001$, $n = 20$). В опыте величина E было почти вдвое ниже (рис. 5Е), т.е. образование ЗЩ действительно начиналось при меньшей степени эпиболии бластодермы, чем у контрольных зародышей.

К этому следует добавить, что у оперированных зародышей ЗЩ очерчен гораздо более грубо и при его формировании наружная поверхность бластодермы гораздо сильнее изменяет (уменьшает) свою

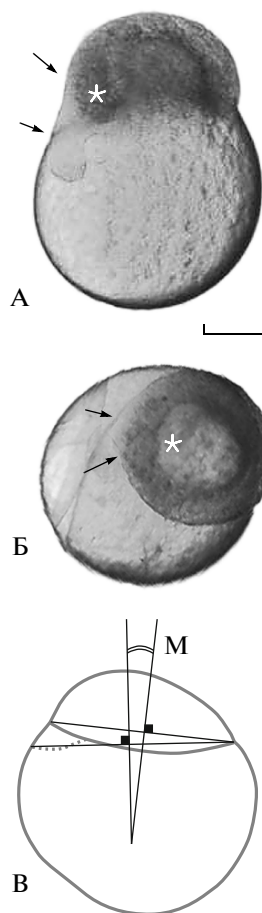


Рис. 3. Дополнительный перибласт: А–Б — дополнительный перибласт определяет место закладки ЗЩ. Зародыш, оперированный на стадии 2-х бластомеров, А — сагиттальный оптический срез, Б — вид с анимального полюса. Стрелки — дополнительный перибласт, звездочки — место образования ЗЩ. Масштабная планка на рисунке соответствует 200 мкм; В — схема измерения угла (М), на который поворачивается анимально-вегетативная ось при образовании дополнительного перибласта (пояснения в тексте).

кривизну, чем в контроле (ср. рис. 5В, 5Г). Это также говорит о “преждевременной” закладке ЗЩ.

ОБСУЖДЕНИЕ

То, что нормальный зародыш может развиваться, фактически, только из одного из первых двух бластомеров, как это происходило у нас в серии 2, само по себе не представляет ни особого интереса, ни, тем более, новизны. Во-первых, это уже было показано для выюна (Корж, 1981), а во-вторых, эквивалентность областей бластодермы костистых рыб и, как следствие, почти неограниченная способность развития к регуляции давно и хорошо известна (Morgan, 1895; Oppenheimer, 1979; Неклюдова и др., 2003).

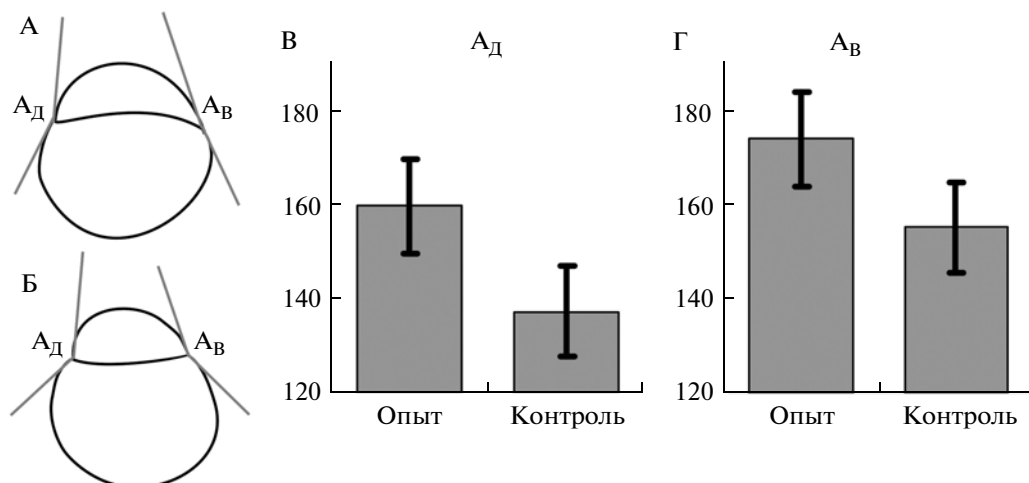


Рис. 4. Различия дорсальных и вентральных краевых углов на границе раздела бластодерма с желточным мешком: А–Б – схема измерений в опыте (А) и контроле (Б). А_д – краевой угол на дорсальной, А_в – на вентральной стороне зародыша, В, Г – различия средних значений дорсальных (В) и вентральных (Г) краевых углов в опыте 8 и контроле ($n = 20$).

Здесь можно только отметить, что регуляционная способность эмбриогенеза выюна, по-видимому, выше, чем у других изученных представителей костистых рыб, таких как *Fundulus* (Oppenheimer, 1979), *Carassius* (Tung, Tung, 1944), или *Brachidanio rerio* (Черданцева, Черданцев, 1985). Сравнение экспериментально-эмбриологических данных, полученных разными исследователями на разных объектах лишено смысла, но мы можем сравнить широту изменчивости нормального морфогенеза. Выюн является пока что единственным представителем костистых рыб, для которого показано, что многократное переопределение направления дорсо-вентральной оси зародыша входит в состав нормальной изменчивости его развития (Черданцева, Черданцев, 2007).

В этой работе мы пытались не просто констатировать возможность регуляции развития после удаления цитоплазмы бластомеров (серии 1, 4), или целых бластомеров (серии 8, 16), но и понять, каким, собственно, образом она происходит. Оказалось, что регуляция складывается из двух фаз: быстрой фазы, занимающей всего несколько циклов синхронных делений дробления, и медленной фазы, заканчивающейся уже во время гастрюляции.

Смысл и направление регуляций в этих двух фазах различны. В первой фазе зародыш стремится вернуть относительный объем бластодиска к его прежнему значению. Теоретически он может восстанавливаться за счет перехода в бластодиск цитоплазмы желточного мешка и за счет увеличения осмотического давления, причем эти возможности скорее дополнительные, чем альтернативные. Если бы давление внутри бластодермы и желточного мешка не менялось, то трудно было бы объяснить отсутствие статистически достоверных различий

между абсолютным объемом желточного мешка в контроле и опыте. Вопрос нуждается в дальнейшем исследовании, как и вообще вопрос о механизмах, регулирующих внутреннее давление и соотношение объема разнородных фракций цитоплазмы.

Впервые образование дополнительного перибласта было описано Е.М. Черданцевой (1983) в опытах с умеренным (порядка 10g) центрифугированием зародышей данио (*Brachidanio rerio*) во время раннего дробления. Один из краев бластодиска сильно растягивался в тангенциальной плоскости, цитотомия прекращалась и продолжались только деления ядер с образованием синцития, в котором желтка было больше, чем собственно в бластомерах. У края бластомера возникал вытянутый в меридиональном направлении язык “искусственного”, как он был назван в цитируемой работе, перибласта, который затем втягивался внутрь, и именно в этом месте развивался ЗЩ. Описанная последовательность событий до мелочей совпадает со сделанными в нашей работе наблюдениями и позволяет предположить, что именно увеличения отношения концентрации желтка к концентрации свободной от него цитоплазмы является основной причиной образования дополнительного перибласта. То же самое может относиться и к образованию краевого перибласта при нормальном ходе развития (Черданцева, Черданцев, 1985).

Вторая (медленная) фаза регуляции является, по сути дела, “регуляцией последствий регуляции”, так как морфогенез вынужден приспособляться к последствиям тех усилий, которые были затрачены на регуляцию в ее первой фазе. Здесь уже нельзя говорить о возвращении на исходный путь развития – напротив, новые морфологические особенности, возникающие в первой фазе

регуляции, служат для пространственно-временной разметки дальнейших морфогенетических движений.

В первую очередь это относится к образованию ЗЩ. При нормальном ходе развития он чаще всего образуется у того края бластодермы, форма которого в наибольшей степени отклоняется от сферической формы (Cherdantseva, Cherdantsev, 2006). В этой зоне возникают активные механические напряжения, избыток которых компенсируется стягиванием к ней (конвергенцией) клеток бластодермы. Скорость эпиболии одинакова для всей окружности бластодермы, анимально-вегетативная ось ориентирована перпендикулярно границе раздела бластодермы с желтком мешком, но соотношение активных и пассивных напряжений на противоположных полюсах бластодермы различно, что и определяет дорсо-вентральную полярность (подробнее см. Cherdantseva, Cherdantsev, 2006).

У тех оперированных зародышей, у которых в первой фазе регуляции образуется дополнительный краевой перибласт, поверхность раздела бластодермы с желтком еще до начала гастрюляции скошена по отношению к анимально-вегетативной оси (см. рис. 3В). Поскольку один из краев бластодермы находится на более высокой широте яйца, граница бластодермы не вписывается в единую окружность, и для минимизации геометрических различий ее кривизна на более высокой широте должна уменьшаться. Это, в свою очередь, становится причиной активной миграции клеток в эту зону, что, как и при нормальном ходе развития, ведет к образованию ЗЩ. Нельзя сказать, что утолщение краевого перибласта индуцирует образование ЗЩ в том смысле, в каком это слово обычно употребляется в эмбриологии. Оно просто создает различия кривизны, а значит – различия величины активного натяжения границы раздела бластодермы с желтком на ее противоположных полюсах. Движение клеток в сторону поверхности с повышенным активным натяжением увеличивает их локальную концентрацию, так что внутреннее давление под этой поверхностью возрастает, компенсируя избыток ее активного натяжения.

Судя по величине отношения периметра наружной поверхности бластодермы к ее площади на сагиттальных оптических срезах, в момент начала эпиболии оперированные зародыши имеют более высокое отношение площади бластодермы к ее объему. Это хорошо согласуется с ростом величины краевых углов на границе раздела бластодермы с желтком (ср. рис. 4А, 4Б), так как оба факта говорят о падении активного натяжения поверхности бластодермы во второй фазе регуляции.

Эпиболия всегда связана с увеличением площади поверхности, разделяющей бластодерму и желточный мешок (Trinka, 1993). Нормальная гео-

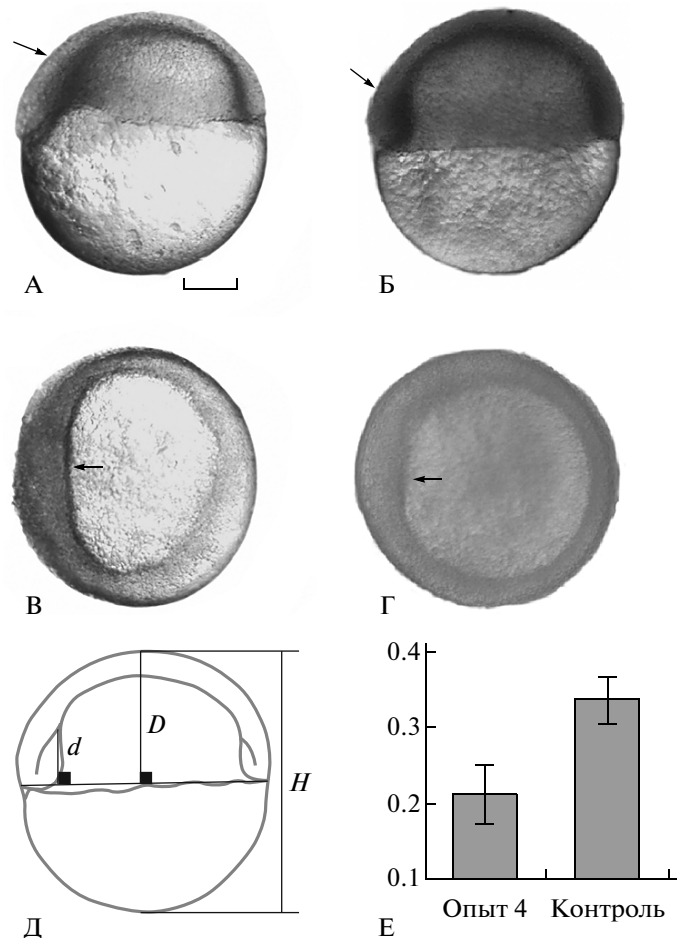


Рис. 5. Изменение связи между эпиболией и формированием ЗЩ после удаления цитоплазматического материала: А, В – зародыш после удаления содержимого одной клетки на стадии 4-х бластомеров, Б, Г – контроль; А, Б – сагиттальные оптические срезы, В, Г – вид с анимального полюса, стрелки – место закладки ЗЩ; Д – схема морфометрических измерений (пояснения в тексте), Е – различия величины коэффициента *E*, характеризующего соотношение темпов эпиболии и формирования ЗЩ у контрольных зародышей и зародышей, оперированных на стадии 4-х клеток ($n = 20$).

метрия системы бластодерма–желток позволяет этой поверхности увеличивать свою площадь, оставаясь плоской, так как краевые углы на границе раздела достаточно далеки от 180° . Иначе обстоит дело с оперированными зародышами, у которых лимит на увеличение площади поверхности раздела без изменения ее формы практически исчерпан. В опыте зародыши оказываются гораздо ближе к порогу, за которым дальнейший рост площади плоской поверхности раздела уже невозможен, и она, для того чтобы продолжать обрастание желтка, должна выгнуться в сторону наружной поверхности. В этой фазе эпиболии поверхность раздела может увеличивать свою площадь даже при неподвижности краевых точек этой поверхности. Та-

ким образом, в случаях, когда удаление бластомеров не ведет к изменению способа формирования перибласта, его основным последствием во второй фазе регуляции является преждевременный (по сравнению с обычным ходом эпиболии) изгиб поверхности раздела, геометрически отделяющий краевую зону бластодермы от ее центральной части (подробнее см. Неклюдова и др., 2003).

“Преждевременность” изгиба означает, что он происходит при меньшей разности натяжения наружной и внутренней поверхности бластодермы, величина которого определяет скорость радиальной интеркаляции клеток (Неклюдова и др., 2003). Радиальная интеркаляция является одной из причин формирования из клеток бластодермы полноценного эпителиального пласта, и именно этот процесс должен замедляться у оперированных зародышей, у которых, действительно, упаковка клеток на оптическом срезе бластодермы кажется более рыхлой.

Таким образом, настоящей причиной сдвига формирования ЗЩ на более раннюю стадию развития является замедление эпиболии, а точнее изменение относительного вклада в нее двух процессов – пассивного растяжения поверхности бластодермы и активного увеличения ее площади за счет радиальной интеркаляции клеток. В опыте вклад пассивного растяжения гораздо выше, что хорошо соответствует визуальному впечатлению, возникающему при сравнении формы наружной поверхности зародышей в опыте и контроле.

Полученные данные говорят о том, что давно описанная для костистых рыб эволюционно устойчивая связь между относительным объемом бластодермы и стадией эпиболии, на которой закладывается ЗЩ, является прямым и неизбежным следствием геометрии и механики эпиболии. Об этом говорит практически полный параллелизм между таксономическими различиями и различиями, которые можно вызвать путем экспериментального изменения (уменьшения) относительного объема бластодермы. В обоих случаях смещение формирования ЗЩ на более ранние этапы эпиболии объясняется ее задержкой из-за увеличения доли вклада в эпиболию пассивного растяжения поверхности бластодермы. В группах с меньшим относительным объемом бластодермы наблюдается такой же преждевременный изгиб поверхности раздела бластодермы с желтком, какой мы наблюдали у оперированных зародышей. Отбору не нужно заботиться о том, чтобы приспособить морфогенез к новым начальным условиям, поскольку все нужные изменения не выходят за пределы нормы реакции самого морфогенеза, которую, как мы видим, не следует отождествлять с генетической нормой реакции.

Авторы выражают сердечную признательность сотрудникам Биологического факультета МГУ

им. М.В. Ломоносова Елене Георгиевне Корвин-Павловской, Людмиле Алексеевне Слепцовой и Елене Михайловне Черданцевой за помощь и советы в работе. Работа была поддержана грантом РФФИ № 04-08-00057.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Игнатъева Г.М.* Ранний эмбриогенез рыб и амфибий. М.: Наука. 1979, 175 с.
- Корвин-Павловская Е.Г., Неклюдова И.В., Слепцова Л.А. и др.* Исследование регуляционных процессов в раннем развитии вьюна при уменьшении объема желтка зиготы // Вестн. Моск. Ун-та. 1996. Сер. 16, Биология. № 4. С. 32–36.
- Корвин-Павловская Е.Г., Неклюдова И.В., Белоусов Л.В.* Кинетика реакции поверхности желточной клетки на точечный прокол и механическую деформацию // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 2. С. 100–108.
- Корж В.П.* Микроинъекции макромолекул и митохондрий в яйцо вьюна // Онтогенез. 1981. Т. 12. № 2. С. 187–192.
- Костомарова А.А.* Вьюн // Проблемы биологии развития. Объекты биологии развития. М.: Наука. 1975. С. 308–323.
- Мешков М.М., Лебедева О.А.* Видовая специфика темпа индивидуального развития лососевидных рыб (Salmonoidei) // Эволюция темпов индивидуального развития животных. М.: Наука. 1977. С. 200–215.
- Неклюдова И.В., Корвин-Павловская Е.Г., Черданцев В.Г.* Дорсо-вентральные различия морфологических потенций бластодермы вьюна в опытах с эксплантацией ее фрагментов // Онтогенез. 2003. Т. 30. № 5. С. 353–361.
- Неклюдова И.В., Корвин-Павловская Е.Г., Черданцев В.Г.* Пространственно-временная динамика морфогенетических потенций бластодермы в раннем морфогенезе вьюна // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 5. С. 355–371.
- Слепцова Л.А., Дабагян Н.В., Бенимов А.О.* Рыбы. Вьюн // Пособие к большому практикуму по эмбриологии. Ч. 1. Под ред. Белоусова Л.В., Дабагян Н.В., Чунаевой М.З. М.: Изд-во МГУ. 1990. С. 5–34.
- Слепцова Л.А., Иванова Е.Е., Голиченков В.А.* Развитие икринок вьюна после экспериментального увеличения клеточной массы дорсальной и вентральной областей бластодерм // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 3. С. 1–8.
- Черданцев В.Г.* Морфогенез и эволюция. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2003. 360 с.
- Черданцева Е.М.* Опыты с центрифугированием оплодотворенных яиц *Brachidanio rerio* // Биол. авиакосм. мед. 1983. Т. 6. № 3. С. 21–25.
- Черданцева Е.М., Черданцев В.Г.* Детерминация дорсо-вентральной полярности у костистой рыбы *Brachidanio rerio* // Онтогенез. 1985. Т. 16. № 4. С. 270–280.
- Черданцева Е.М., Черданцев В.Г.* Этапы формирования дорсовентральной полярности в раннем морфогенезе костистых рыб // Клеточные, молекулярные и

- ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ МОРФОГЕНЕЗА. М.: КМК. 2007. С. 170–172.
- Cherdantseva E.M., Cherdantsev V.G.* Geometry and mechanics of teleost gastrulation and the formation of primary embryonic axes // *Int. J. Devel. Biol.* 2006. V. 50. P. 157–168.
- Hoadley L.* On the localization of developmental potencies in the embryo of *Fundulus heteroclitus* // *J. Exp. Zool.* 1928. V. 52. № 1. P. 7–44.
- Lewis W.H.* Experiments on localization in the eggs of a teleost fish (*Fundulus heteroclitus*) // *Anat. Rec.* 1912. V. 6. № 1. P. 1–6.
- Morgan T.H.* The formation of the fish embryo // *J. Morphol.* 1895. V. 10. № 2. P. 419–472.
- Nicholas J.S., Oppenheimer J.M.* Regulation and reconstitution in *Fundulus* // *J. Exp. Zool.* 1942. V. 90. № 1. P. 127–157.
- Oppenheimer J.M.* Organization of the teleost blastoderm // *Quart. Rev. Biol.* 1947. V. 22. № 2. P. 105–118.
- Oppenheimer J.M.* Fifty years of *Fundulus* // *Ibid.* 1979. V. 54. P. 385–395.
- Trinkaus J.P.* The yolk syncytial layer of *Fundulus*: Its origin and history and its significance for early development // *J. Exp. Zool.* 1993. V. 265. P. 258–274.
- Trinkaus J.P., Drake J.W.* Exogenous control of morphogenesis in isolated *Fundulus* blastoderms by nutrient chemical factors // *J. Exp. Zool.* 1956. V. 132. № 2. P. 311–347.
- Tung T.C., Tung W.F.W.* The development of egg fragments, isolated blastomeres and fused eggs // *Proc. Zool. Soc. L.* 1944. V. 114. P. 46–64.

Morphogenetic Consequences of Partial Removal of Blastomere Cytoplasm during Early Embryonic Development of the Loach, *Misgurnus fossilis* L.

E. G. Ivashkin^a and V. G. Cherdantsev^b

^a*Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*
e-mail: veliger@ya.ru

^b*Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

Abstract—The development of loach embryos is successfully regulated (normalized) after partial removal of the cytoplasm from one blastomere at the two- or four-cell stage or complete removal of one or two blastomeres at the stage of 8–16 cells. Using time-lapse video imaging and morphometric analysis, it has been shown that this regulation is a two-stage process. At the first stage, the ratio between the volumes of the blastodisk and yolk sac is rapidly (within one or two cell cycles) restored almost to the initial level; at the second stage, morphogenesis of the embryo is modified according to its new structural features acquired after the operation. After several rounds of cytokinesis, the cytoplasm remaining in the operated blastomere fuses with the marginal yolk syncytium (periblast), which at the blastula stage forms a distinct extension at the operation site. This extension marks the site of embryonic shield formation. The results of morphometric analysis show that restoration of the initial blastoderm volume in operated embryos leads to a reduction of active tension at the blastoderm–yolk boundary and an increase in the ratio of blastoderm surface to its volume at the moment of epiboly initiation. As a result, the convergence of blastoderm cells to the operation site and the embryonic shield formation begin at a lesser degree of epiboly, compared to the control.

Keywords: embryonic development, teleost fishes, loach, cleavage, blastomere removal, regulation, morphogenesis, morphometry.