



С.Т.НУРТАЗИН
Э.Б.ВСЕВОЛОДОВ

БИОЛОГИЯ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

учебник для вузов

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ

Глава 1. История эмбриологии

Глава 2. Краткий обзор методов биологии развития

Глава 3. Периодизация онтогенеза у позвоночных.

Глава 4. Влияние внешней среды на онтогенез

Глава 5. Предзародышевое развитие. Гаметогенез.

Глава 6. Половые циклы.

Глава 7. Оплодотворение.

Глава 8. Дробление и образование бластулы.

Глава 9. Общая характеристика процессов дробления у некоторых представителей хордовых.

Глава 10. Гастрюляция.

Глава 11. Общая характеристика процесса гастрюляции у некоторых позвоночных.

Глава 12. Нейруляция и образование сомитов.

Глава 13. Взаимодействие зародыша со средой и с материнским организмом.

Глава 14. Теоретическая база общей биологии развития

Глава 15. Процессы, лежащие в основе эмбриогенеза животных

15.1. Цитофизиологические основы морфогенеза

15.1.1. Клеточное деление: митоз и мейоз

15.1.2 Клеточная миграция

15.1.3. Клеточная адгезия и слияние клеток

15.1.4.Апоптоз

15.1.5. Трансдукция: передача информации между клетками и внутри клеток. Понятие о трансдукционных цепочках. Реакционно-диффузионная модель Тьюринга.

15.2. Цитофизиологические основы клеточной дифференцировки и эпигенетической наследственности клетки. Специфическая роль генома в развитии.

15.2.1.Общие представления о молекулярнобиологической основе функционирования генов.

15.2.2. Цитофизиологическая основа функционирования генов.

15.2.3. Специфичная для онтогенеза Metazoa роль генов

15.2.4. Хокс-гены(Нох- гены) как пример специализированных генов управления морфогенезом

15.2.5.Общее представление о генетике развития.

15.3. Гистологические и макроморфологические аспекты морфогенеза

15.3.1. Рост зародыша и деление клеток.

15.3.2. Перемещения эмбриональных зачатков в ходе развития.

15.3.3. Дифференцировка зачатков органов.

Глава 16. Классическая экспериментальная эмбриология, или “механика развития”. Макроанатомические аспекты.

16.1. Проблема генерирования позиционной информации

16.2. Опыты Г.Шнемана и “первичный организатор” и рождение понятий экспериментальной эмбриологии.

16.2 “Первичный организатор” и рождение основных понятий экспериментальной эмбриологии.

16.3. Теоретическое значение опытов Шнемана и основные понятия экспериментальной эмбриологии («механики развития»).

16.4. Другие примеры индукционных воздействий.

16.5. Общие представления о молекулярной природе компетенции, индукции и детерминации.

16.6. Принцип двойного обеспечения индукции и эволюция индукционных механизмов. Специфичность индукционных механизмов.

Глава 17. Примеры экспериментального анализа некоторых органогенезов современными методами.

17.1. Развитие конечностей

17.2. Развитие глаза.

17.3. Развитие органов, связанных с полом

Глава 18. Биотехнологические и биомедицинские аспекты биологии индивидуального развития

В В Е Д Е Н И Е

Современная биология развития - это синтетическая наука, интегрирующая данные эмбриологии, зоологии, теории эволюции, генетики, физиологии, биохимии, молекулярной биологии и клеточной биологии. В самом широком понимании - это наука о круге явлений, составляющих онтогенез, или индивидуальное развитие (предзародышевое развитие, или гаметогенез, зародышевое развитие, постэмбриональное развитие, в том числе личиночное, старение, регенерация и соматический эмбриогенез), организмов. В таком широком понимании она не может быть четко отграничена от таких наук, как зоология и ботаника, и некоторые ее главы составляют неотъемлемую часть этих наук и изучаются в составе курсов зоологии и ботаники. Все разделы биологии индивидуального развития тесно связаны с проблемами общей биологии.

Основанием для выделения биологии развития в более узком смысле в отдельную общебиологическую дисциплину послужило своеобразие процессов, протекающих в ходе превращения отдельных клеток или их групп в целостный, дифференцированный на органы и ткани организм. Наиболее сложный характер эти процессы имеют у многоклеточных животных, которые и являются главным объектом этой науки.

Общепризнанно, что ключевую позицию в комплексе наук, составляющих биологию развития, занимает эмбриология. Именно в эмбриональном периоде происходят наиболее значительные формообразовательные процессы, в результате которых одноклеточная зигота превращается в сложный, дифференцированный на системы органов и тканей многоклеточный организм. В зависимости от задач и методов исследования различают эмбриологию общую, сравнительную, экспериментальную и экологическую.

Для удобства обзора содержания биологии развития можно выделить следующие ее составные части.

- Морфологическое и биологическое описание хода формирования организмов, их жизненного цикла и среды обитания. Этот раздел, составляющий фундамент всей биологии развития, как мы уже говорили, является, в первую очередь, предметом зоологии и ботаники.

- Сравнительная эмбриология, изучающая общие и различные для разных видов черты в протекании морфогенетического процесса превращения единственной клетки - зиготы (или групп клеток) в многоклеточный дифференцированный на органы и ткани многоклеточный организм. Эта глава также близка к зоологии по методическим подходам, составляя органическую часть сравнительной морфологии животных.

- Цитофизиологические и гистофизиологические основы процессов формообразования (дифференцировки и пространственного обособления органов из первоначально единой закладки). Этот раздел биологии развития граничит, скорее, с цитофизиологией и гистофизиологией, т.е. с общебиологическими науками о клетке и тканях.

- Потоки информации в эмбрионе, обуславливающие каждый акт морфогенеза (“механика развития”, трансдукционные связи закладок органов). Анализ непосредственных причин срабатывания тех или иных механизмов развития в определенном месте эмбриона и в определенное время, в результате чего возникает правильно устроенный организм с определенными органами на определенных местах. Этот раздел биологии развития представляется наиболее специфичным и по-настоящему сформировался только в 20 веке.

- Генетика развития - анализ механизма действия генов, обеспечивающих осуществление отдельных актов развития. Этот раздел начинался как раздел генетики об изменчивости формирующихся признаков (в значительной степени наследственных уродств), но постепенно обогащался данными биохимии, иммунологии и, наконец, молекулярной генетики, которая занимает в нем в настоящее время доминирующее положение.

Современная биология развития является теоретической и методической базой многих разделов быстро прогрессирующей биотехнологии, связанных с медициной и животноводством, и одновременно крупным потребителем ее достижений при проведении фундаментальных и прикладных исследований.

Как и многие другие биологические науки, биология развития может быть подразделена на общую и частную. Общая биология развития анализирует закономерности, единые для всех органов и видов организмов. Частная биология развития сосредоточивает внимание на механизмах развития отдельных органов и тканей, а также на видовых особенностях онтогенеза.

Важным и достаточно древним разделом эмбриологии является тератология, занимающаяся изучением нарушений развития и возникновением различных аномалий. Известно, что в развитых странах врожденные аномалии вышли на одно из первых мест среди десяти основных причин смертности. 5% всех новорожденных появляются на свет с теми или иными дефектами. Список тератогенов - факторов, обуславливающих дефекты развития, непрерывно пополняется. Следует подчеркнуть, что действие токсических для организма веществ особенно сказывается в эмбриональном периоде онтогенеза. По данным ВОЗ около 2% новорожденных появляются на свет с пороками развития из-за воздействия тератогенов. В связи с этим, проводятся дорогостоящие исследования по выявлению и устранению факторов, вызывающих врожденные аномалии.

Общественная ценность любой фундаментальной науки, в конечном счете, определяется её вкладом в практику. Прикладное значение биологии развития в целом, и эмбриологии в частности, связано, прежде всего, с разработкой методов искусственного размножения, консервации гамет и ранних зародышей, а также, возможно, стволовых клеток, трансплантации эмбрионов, клонирования особо ценных животных, а также с изучением нормального и злокачественного роста, регенерации органов и тканей, проблем старения клеток и тканевых систем. С эмбриологией связаны вопросы физиологии и патологии беременности, а тем самым — ряд вопросов акушерской клиники (гигиена беременности, профилактика мертворождаемости, борьба с внутриутробной асфиксией, с по-

роками развития и т. д.). Широкое применение имеют данные эмбриологии в животноводческой практике. Рациональная технология инкубации яиц домашних птиц, рыборазведение также основаны на данных эмбриологии. Практически важно изучение жизненного цикла полезных и вредных насекомых (домашняя пчела, тутовый и дубовые шелкопряды, саранча и др.). Данные по онтогенезу животных-переносчиков возбудителей эпидемических заболеваний (малярийный комар, клещи, грызуны и др.) необходимы для правильной организации борьбы с паразитами и животными.

Одной из важнейших задач будущего является создание методов коррективки наследственных нарушений и аномалий развития.

В настоящем учебнике дан материал по прогенезу, эмбриогенезу и основным стадиям постнатального развития животных. Хотим подчеркнуть, что несмотря на то, что современная эмбриология является синтетической наукой, в которой важное место занимают данные биохимии, генетики, молекулярной биологии, цитологии, физиологии, прежде всего, необходимо четко представлять себе морфологическую картину формообразовательных процессов, лежащих в основе зародышевого развития, а уже затем переходить к пониманию клеточных и молекулярных механизмов, определяющих эмбриогенез.

Кроме того, важно не только прочитать текстовый материал данной книги, но и самым серьезным образом разобраться в соответствующих рисунках и схемах, без чего сложно понять и полноценно запомнить материал, но, чего, к сожалению, обычно не делают!

Г Л А В А П Е Р В А Я

КРАТКИЙ ИСТОРИЧЕСКИЙ ОЧЕРК РАЗВИТИЯ ЭМБРИОЛОГИИ

Краткий обзор истории эмбриологии. Представления об эмбриональном развитии в античные времена. Эмбриология в средние века. Преформизм и эпигенез. Работы К.Ф.Вольфа и К.М.Бэра. Развитие эмбриологии в XIX веке. Влияние дарвинизма на эмбриологию. Сравнительно-эволюционное направление (А.С. Ковалевский, Э. Геккель, И.И. Мечников). Исторические корни экспериментальной эмбриологии, ее современные задачи. Основные направления и задачи современной описательной, экспериментальной, сравнительной и теоретической биологии индивидуального развития. Ее связь с цитологией, генетикой и молекулярной биологией. Прикладное значение биологии индивидуального развития.

Эмбриология, как основа биологии индивидуального развития, является одной из самых старых биологических наук. Проблемы зарождения растений, животных и человека всегда вызывали интерес у самых разных людей. Пожалуй, ни в одной из отраслей биологии не было столько мистицизма, загадочности, домыслов и спекуляций, как в эмбриологии.

Первые знания об эмбриональном развитии животных связаны, и это естественно, с центрами древней цивилизации - Египтом, Вавилоном, Ассирией, Грецией, Римской империей, Индией и Китаем. Эти эмбриологические исследования до 5 в. до н. э. в значительной мере отражали религиозно-философские учения.

Согласно древнеиндийским (за несколько веков до нашей эры) представлениям развитие зародыша начинается с соединения мужского воспроизводительного вещества (понятие, соответствующее понятию семени), которое берет начало от всех членов тела (в 19 веке мысль о связи семени со всеми членами тела была повторена в знаменитой теории "пангенезиса" Ч. Дарвина) с женским воспроизводительным веществом, которое, по-видимому, идентифицировалось с менструальной кровью. Полагали, что пол плода зависит от соотносительного количества "семени" и "крови" при зачатии. В целом, эти представления были весьма материалистичны. В индийских медицинских сочинениях VI-I вв. до нашей эры проводилась мысль о наличии у живых существ неизменных наследственных качеств, которыми объяснялось сходство детей с родителями.

Особый интерес представляют теоретико-философские воззрения и практические сведения по эмбриональному развитию животных в античной Греции. Так, философ-натуралист Эмпедокл (ок. 490-430 гг. до н.э.) считал, что зародыш образуется в результате смешения мужского семени с женским, причем, пол зародыша зависит от температуры, при которой он развивается (!). Демокрит (460-370 гг. до н.э.) выдвинул теорию о выделении семени не мозгом, как считалось в то время, а всем телом, т.е., допускал наличие в семени частиц от всех органов и частей тела. Величайший врач античного мира Гиппократ (ок.

460-377 гг. до н.э.) поддерживал идею о происхождении семени из всех частей тела и полагал, что у родителей, получивших какое-либо повреждение, дети могут родиться как вполне здоровыми, так и унаследовать болезнь родителей. Плод образуется в результате смешения мужского и женского семени. Вокруг плода образуется оболочка и формируется пуповина, через которую он дышит. Все части зародыша образуются одновременно, то-есть, в зародыше имеются уже все органы, которые при последующем развитии просто увеличиваются в размерах. Это представление Гиппократ в принципе совпадает с общепринятой в XVII-XVIII веках теорией **преформизма**, согласно которой любой зародыш - это миниатюрная копия взрослого организма и в процессе развития он просто растет без дифференциации. Но по Гиппократу в самом начале развития все-таки идет образование органов.

Большой интерес представляют взгляды на развитие животных одного из величайших мыслителей древности Аристотеля (384-328 гг. до н.э.), в творчестве которого вопросы биологии занимали важное место.

Согласно представлениям Аристотеля зародыш образуется из смешения семени самца с выделениями самки и именно последние образуют материю, т.е. возможность возникновения зародыша, но реализация этой возможности происходит только при воздействии на материю формы, происходящей из семени самца. В семени, таким образом, заложен принцип развития (душа), объясняющий целесообразность строения и жизнедеятельности организма.

В знаменитом трактате "О возникновении животных" Аристотель обобщил данные по эмбриологии животных и человека. Им были подробно описаны половые различия у животных, различные способы размножения у яйцекладущих и живородящих животных и, особо, размножение у человека. Аристотель наблюдал за сроками спаривания у животных, писал о половом размножении и самопроизвольном зарождении, о постройке гнезд, откладке яиц, об особенностях развития рыб и птиц, о течке и беременности. В развитии куриного эмбриона он описал все детали, которые только можно видеть без специальной окраски невооруженным глазом. Им были рассмотрены также вопросы, связанные с происхождением пола, наследованием признаков, возникновением уродств, многоплодия и с формированием признаков в процессе постэмбрионального развития.

Об уровне практических знаний Аристотеля можно судить по тому, что среди главнейших признаков, характеризующих млекопитающих, он выделил то, что они живородящие, выкармливают детенышей молоком, что плод прикреплен к матке посредством пуповины и органа, который впоследствии был назван последом. Исходя из этого, Аристотель отделил от группы рыб китов и поместил их рядом с млекопитающими. Считавшееся ошибочным наблюдение Аристотеля о том, что у акулы Галеоса яйца прикрепляются к стенке матки с помощью органа, сходного с последом млекопитающих, было подтверждено лишь в середине XIX века Иоганном Мюллером. Значение работ Аристотеля состоит прежде всего в том, что они символизируют переход от домыслов к наблюдению и описанию. Но из-за микроскопических размеров ранних зародышей и их частей глубокое изучение долгое время, до появления увеличива-

ющих оптических систем, было невозможным.

В отличие от Гиппократов Аристотель считал, что органы зародыша возникают постепенно, друг за другом, из однородной массы, а не преформированы изначально. Впоследствии эта идея легла в основу теории **эпигенеза** о постепенном развитии организма, сопровождающимся усложнением его организации.

Римлянин Клавдий Гален (130-200 гг.), получивший всеобщее признание как великий врач, анатом и физиолог, достаточно подробно изучил строение зародышей человека на поздних стадиях развития.

Период с V по XV вв., именуемый "средними веками" ("средневековым"), ознаменован возникновением и развитием феодализма, резким расслоением общества, всемогуществом знати и бесправием простого люда, что сопровождалось глубоким упадком науки, культуры, техники и резким усилением церковной идеологии. Представления о природе в этот период носили на себе глубокий отпечаток религиозных догм и канонов феодального общества.

Дальнейшее расширение и систематизация биологических знаний произошли лишь в XV-XVIII вв., в эпоху Возрождения. Лучшее из культурного достояния античного мира стало в XV-XVIII вв. образцами для подражания. Началась ломка канонов схоластического, догматического мышления средневековья.

Более прогрессивный буржуазный строй, связанный с бурным ростом материального производства и отказа от большинства старых представлений во всех областях духовной жизни, вызвал подъем всех отраслей естествознания. Целью науки стали не обоснования догм теологии и схоластики, а объективное познание законов природы и овладение ее силами. В области биологии, по сути дела, многое приходилось начинать с нуля, занимаясь накоплением и систематизацией огромного фактического материала.

Развитию биологических наук в эту эпоху способствовали, во-первых, использование новых приборов (микроскопа, термометра, барометра и т.д.), а во-вторых, многочисленные путешествия, давшие огромный новый фактический материал. В XVI-XVIII вв. определенные успехи были достигнуты и в области эмбриологии животных. В XVI в. Леонардо да Винчи выполнил очень интересные рисунки зародышей. Итальянский ученый У. Альдрованди (1522-1605 гг.), впервые после Аристотеля попытался систематически проследить за этапами развития куриного яйца. Он подложил под наседку два с небольшим десятка яиц, а затем, вынимая их по одному через определенные промежутки времени, последовательно описал формирование цыпленка в яйце.

Еще более тщательно эмбриогенез цыпленка был исследован учеником У. Альдрованди В. Койтером (1534-1576 гг.).

Соотечественник и ученик У. Альдрованди Д. Фабриций (1533-1619 гг.) изучал зародыши человека и самых разнообразных животных: кролика, морской свинки, мыши, собаки, кошки, овцы, свиньи, лошади, коровы и других, сравнивая зародышевое развитие разных видов животных. Однако его работы страдали определенной поверхностностью и бессистемностью, что понятно, учитывая громадный объем материала...

Следует также упомянуть небольшой трактат выдающегося французского ученого, одного из основателей рационализма Рене Декарта (1596-1650 гг.) "О формировании животного" (1648г.), в котором на основании собственных наблюдений над полученными с бойни зародышами животных были высказаны соображения о последовательности и способе образования отдельных органов: сердца, кровеносных сосудов, позвоночника, головного мозга, органов чувств и т.д. Кроме того, в данном труде Р. Декарт подробно изложил свои умозрительные представления о движении частиц "семени", участвующих в формировании зародыша.

Важной вехой в истории эмбриологии стала книга В. Гарвея "О зарождении животных" (1651 г.). Материалом для которой послужило изучение развития цыплёнка и млекопитающих. Гарвей обобщил представления о яйце как источнике развития всех животных, однако, как и Аристотель, считал, что развитие позвоночных происходит в основном путём эпигенеза, утверждал, что ни одна часть будущего плода «не существует в яйце актуально, но все части находятся в нём потенциально»; впрочем, для насекомых он допускал, что их тело возникает путём «метаморфоза» изначально предшествующих частей. Гарвей показал несостоятельность некоторых старых представлений об эмбриогенезе (в частности, утверждение о том, что зародыш образуется из семени отца и материнской крови). Хотя, ввиду их микроскопических размеров, яиц млекопитающих Гарвей не видел, но именно он сформулировал знаменитый афоризм: "все живое из яйца", смелость и глубина которого особенно понятны, учитывая господствовавшие в то время представления о возможности самопроизвольного зарождения. Итальянский врач и естествоиспытатель Ф. Реди в 1668 году точным экспериментом показал, что личинки мух не зарождаются в гниющем мясе, а выводятся из отложенных на него яиц. Много данных, также свидетельствующих против самопроизвольного зарождения было получено из наблюдений Я. Сваммердама (1637-1680 гг.).

Интересные описания эмбрионального развития были сделаны такими учеными как Р. де Граф (в 1672 году описал фолликулы яичника), М. Мальпиги (1628-1694 гг.) в этом же году с помощью микроскопа обнаружил органы на тех стадиях развития цыплёнка, на которых ранее не удавалось видеть сформированные части зародыша. Исходя из этих данных, Мальпиги примкнул к преформистским представлениям, господствовавшим в эмбриологии почти до конца 18 в.; главными их защитниками выступали швейцарские учёные А. Галлер и Ш. Бонне.

Необходимо отметить, что многие представления того времени в области эмбриологии носили умозрительный и наивный характер. В качестве примера можно привести взгляды на процесс оплодотворения. Считалось, что оплодотворение сводится к слиянию двух сортов "семени" - мужского и женского или даже к нематериальному влиянию семени на яйца ("оплодотворяющие испарения" и т.п.). Роль открытых в 1677 году С. Гамом и А. Левенгуком в семени человека сперматозоидов не была понята, их рассматривали как особые живые тельца, подобные инфузориям, паразитирующим в семенной жидкости.

Несколько ранее, в 1672 году, голландец Ренье де Грааф описал в яични-

ках многих млекопитающих фолликулы (пузырьки разной величины, наполненные жидкостью) и предложил называть их яйцами, поскольку они очень походили на яйца в яичнике птиц. Исследуя половые органы самок кролика через известные промежутки времени после совокупления, Грааф обнаружил, что пузырьки в яичнике лопаются и опустевают, а в яйцевоме одновременно оказывается примерно такое же число гораздо более мелких яиц. Грааф ошибочно принимал за яйцо в составе яичника более сложную, состоящую из сотен клеток, структуру, которая в наше время называется "граафовым пузырьком", а истинное яйцо находится внутри этого пузырька. Но именно Грааф впервые увидел яйцо млекопитающего в яйцевоме, показал, что яйца образуются в яичнике и позднее дают начало зародышам в матке. Согласно представлениям Р. Граафа, поддержанного многими учеными, зародыши животных происходят из яиц, возникающих в яичнике, а мужское семя после совокупления в матке самки отсутствует, и до нее доходит только "аура", или "дух" семени.

Антониус ван Левенгук (1632-1723 гг.), описавший с помощью изготовленных им микроскопов (с увеличением до 270 раз) сперматозоиды у ряда беспозвоночных и позвоночных животных, обнаружил, что в матке и яйцевоме собаки после спаривания имеется огромное число живых сперматозоидов. Основываясь на этом, он предположил, что зародыш образуется в матке из сперматозоидов. Таким образом, Грааф недооценил значение сперматозоидов, а Левенгук – значение яйца для развития зародыша.

В эпоху Возрождения окончательно оформились **преформистская и эпигенетическая** концепции. Сторонники **преформизма** (Д. Альдрованди, Я. Сваммердам, А. Левенгук, Лейбниц, Боннэ, Галер и др.) полагали, что зародышевое развитие сводится к росту вполне сформированного зародыша, уже предсуществующего в яйце (Сваммердам, Валисниери) или сперматозоидах (Левенгук, Либеркюн и др.) (рис. 1). Самый выдающийся представитель школы анималькулистов (адептов теории о том, что готовый организм заключен в спермии) Н. Андри писал, что яйцо имеет строение шара с люком, а спермии – вид миниатюрных человечков. Из огромной толпы человечков лишь немногие (привилегия первых!) проникают в яйца, запираются там и начинают расти.

Крайние преформисты, например Боннэ, придерживались концепции "вложенных зародышей", утверждая, что в яичнике зародыша уже содержатся зародыши следующего поколения, а в них зародыши последующих и т.д. Считалось, что в яичниках Евы уже были зачатки всего будущего человечества.

Как ни странно на первый взгляд, но успеху преформистских воззрений в ту эпоху способствовало начавшееся широкое использование микроскопической техники. В первых же исследованиях микроскопистов обнаружилась огромная сложность в структуре эмбрионов даже на самых ранних этапах их развития

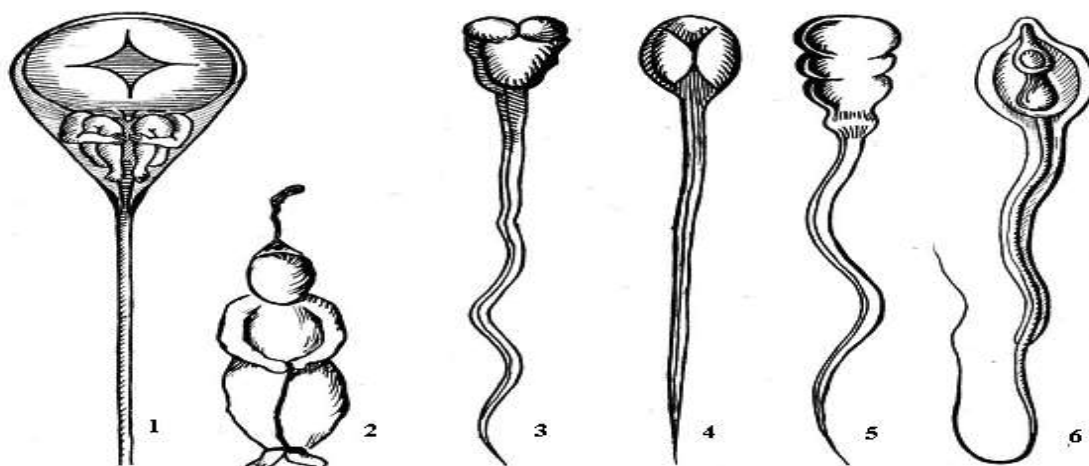


Рис.1. Сpermий по представлениям и описаниям древних авторов.
1-по Гартсокеру, 2-по Даленвацию, 3-5-по Левенгуку, 6-по Пуше.

Только соединение клеточной теории с эмбриологией в 19 веке показало полную бессмысленность этих построений.

Противоположные взгляды высказывались **эпигенетиками**. Эпигенетическую точку зрения в ее механистической интерпретации сформулировал в XVII веке Р. Декарт. Эпигенетические взгляды Гарвея носили более виталистический характер.

Сущность эпигенетического подхода заключалась в том, что развитие рассматривалось как своего рода неизбежная реакция в составленной в предшествующем поколении “микстуре” из подходящих веществ - яйцо, причем реакция, направляемая некоей особой “силой развития”. Стоит должным образом смешать набор определенных материалов и придать силу развития, как они начинают взаимодействовать, формируя этап за этапом зародыш. Опять-таки, до появления клеточной теории онтогенеза, не могло существовать представление о клеточной природе яйца, т.е. о сложнейшей его внутренней интегрированной структуре, включающей ядро, другие органоиды, их взаимодействие, т.е. о клетке как интегрированной единице жизни.

Нужно сказать, что к тому времени в самых разных областях биологии был накоплен фактический материал, который было невозможно объяснить с позиций преформизма. Так, например, молодой французский ученый Мопертюи, который провел ряд весьма интересных экспериментов по гибридизации различных видов животных, резонно поставил вопрос о том, что если зародыш преформирован либо в яйце, либо в сперматозоиде, то почему же мул - (гибрид осла и кобылы), похож на обоих родителей?!

Интересно, что Мопертюи сочетал учение об эпигенезе с учением о пангенезисе. Суть последнего - в “семени” собираются особые частицы от всех органов и частей тела. В этом он видел основу наследственности и считал, что благодаря этому приобретаемые признаки “отражаются” в семени и передают-

ся потомству.

Важнейшее значение в споре между эпигенетиками и преформистами, а главное в формировании эмбриологии как науки имела магистерская диссертация будущего российского академика Каспара Фридриха Вольфа (1734-1794 гг.) "Теория зарождения" (1759г.). Микроскопически исследуя форму отдельных органов зародыша и время их возникновения, он пришел к выводу, что органы не преформированы, а возникают и развиваются в процессе эмбриогенеза. При этом органы развиваются не одновременно, а в известной последовательности из бесструктурной, неорганизованной субстанции. То есть, процесс развития является **эпигенезом - подлинным новообразованием**, а не просто ростом. Например, кишечник, вначале представляет собой пласт, который лишь позже сворачивается в трубку.

Весьма изящные доводы в пользу эпигенеза привел немецкий профессор И.Ф. Блюменбах (1752-1840 гг.), указавший на несовместимость с преформизмом фактов регенерации некоторых организмов (гидры, например) из любого фрагмента тела, в основе которых лежит типичное формообразование, а не рост. Время после работ Вольфа и Блюменбаха отмечено распространением натурфилософии, придававшей значение не столько эмпирическому изучению явлений природы, сколько интуиции и суждениям по аналогии.

Дальнейший прогресс эмбриологии, когда она оформилась в самостоятельную отрасль биологии, связан с трудами Х. Пандера (1794-1865 гг.), К. Бэра (1792-1876 гг.), М. Ратке (1793-1860 гг.). В работах Пандера и, особенно, Бэра учение о развитии зародыша впервые стало на почву твердо установленных фактов и в эмбриологию был введен, наряду со сравнением отдельных стадий, метод описания всего процесса развития зародыша на всех его стадиях, начиная с яйца.

Важнейшим итогом наблюдений Пандера за развитием цыпленка (1818г.) явилось открытие, что на определенном этапе куриный зародыш состоит из трех слоев: наружного - серозного, внутреннего - слизистого и среднего - сосудистого. Из этих слоев бластодермы впоследствии образуются все органы и оболочки зародыша. Например, из серозного слоя развивается стенка тела и амнион, а из слизистого и сосудистого - кишечный канал и брыжейка.

Российский академик К.М. Бэр имел возможность непосредственно следить за исследованиями Х. Пандера, они его заинтересовали, но сам он взялся за работу в этой области лишь через несколько лет. В 1927 году он впервые описал яйца (как небольшие тельца в Граафовом пузырьке) в яичнике человека и других млекопитающих.

В своем классическом труде "История развития животных. Наблюдения и размышления" (I том вышел в 1828г., II том - в 1837 г.) К. Бэр проследил в деталях развитие куриного зародыша и описал возникновение из первоначально гомогенной массы зачатков, а затем формирование из них органов.

Вклад К.М. Бэра в мировую эмбриологическую науку трудно переоценить. Он описал "первичную полоску", процесс нейруляции, сегментацию мезодермы у куриных зародышей, образование хорды у зародышей позвоночных животных. На основании изучения огромного материала им было сделано важ-

ное обобщение о сходстве между зародышами, относящихся к разным классам позвоночных ("закон зародышевого сходства" по терминологии Ч. Дарвина). Бэр показал, что у эмбрионов высших позвоночных формируются органы, свойственные взрослым низшим формам (например, жаберные щели и дуги у птиц и млекопитающих). Интересные данные были получены им при изучении процесса дробления яйца лягушки.

Намеченное К. Вольфом и установленное Х. Пандером положение о том, что ранний зародыш образован лежащими друг поверх друга слоями, К. Бэром было детально разработано и распространено на всех позвоночных (учение о зародышевых листках). К. Бэр различал два первичных листка - анимальный и вегетативный. Анимальный листок впоследствии дает два слоя: кожный и мускульный, а вегетативный - сосудистый и слизистый слои. В свою очередь, кожный слой дифференцируется на покровы, нервную систему и органы чувств; мускульный - на мышцы и кости; сосудистый - на мезентерии и сосуды; слизистый дает стенки кишечника.

В ожесточенном споре преформистов и эпигенетиков К. Бэр долгое время занимал нейтральную позицию, а затем, в результате тщательного анализа всех аргументов и фактов, пришел к выводу, что развитие является преформированным эпигенезом.

Применительно к беспозвоночным животным теория зародышевых листков была плодотворно использована немецким анатомом и эмбриологом Г. Ратке (1793-1860 гг.). Являясь одним из крупнейших биологических обобщений, теория зародышевых листков стала одной из основ эволюционной теории Ч. Дарвина.

Заслугой выдающегося итальянского эмбриолога М. Рускони (1776-1840 гг.) явилось очень точное описание дробления яйца лягушки (1826г.). Судя по рисункам, он наблюдал и последующие этапы развития - гастрюляцию и нейруляцию.

Процесс дробления яйца у различных видов животных был описан также Э. Вебером, А. Грубе, К. Бергманом, Р. Келликером и Д. Бишофом.

В последующие годы стали появляться одна за другой работы, посвященные изучению происхождения сперматозоидов и их морфологии у разных животных. В этой связи можно отметить труды Р. Вагнера (1805-1864 г.), Ф. Дюжардена (1801-1860 г.), К. Лаллемана (1790-1854 гг.), Р.А. Келликера (1817-1905 гг.), Дж. Ньюпорта (1803-1854 гг.).

Общеизвестно, что крупнейшими открытиями биологии в XIX веке было создание клеточной теории и эволюционного учения. Теория Ч. Дарвина совершила переворот в науке о живой природе. При этом среди многих отраслей биологии, на которые оказало влияние учение Дарвина, была эмбриология.

Сам Ч. Дарвин создал знаменитую гипотезу "пангенезиса", объясняющую одновременно и наследственность и развитие. Он считал, что сходство органов родителей с таковыми детей обусловлено поступлением через кровь в половые клетки родителей (сперматозоиды или яйцеклетки) микрочастиц ("геммул") всех их органов, которые потом, в ходе эмбрионального развития потомков, "развертываются" в органы потомков со спецификой, в том числе и

приобретенной при жизни (рис.2). Поскольку организм родителей в конце концов погибает, то сперматозоиды и яйцеклетки представляются своего рода библейским “Ноевым ковчегом”, на котором спасаются от “потопа” (смерти многоклеточного организма) “семь пар чистых и семь пар нечистых” представителей сухопутного животного мира (т.е. геммулы от всех органов тела родителей) , которые вновь “размножаются” после потопа (т.е. формируют органы в сумме составляющие организм следующего поколения).

Принципиальная ошибка гипотезы пангенезиса заключается в том, что хотя клетки всех тканей многоклеточного организма наследуют геном оплодотворенной яйцеклетки - зиготы (т.е. единственной клетки), из которой они развиваются, но **не существует механизма наследования половыми клетками** организма (а, следовательно, и зиготой следующего поколения) каких бы то ни было **свойств или изменений соматических (неполовых) тканей** многоклеточного организма. Наследственность - свойство клеточного уровня.

В свою очередь, открытия в области сравнительного изучения эмбрионального развития имели немаловажное значение для теории эволюции, так как дали убедительные доказательства филогенетического родства далеких по своей организации групп животных.

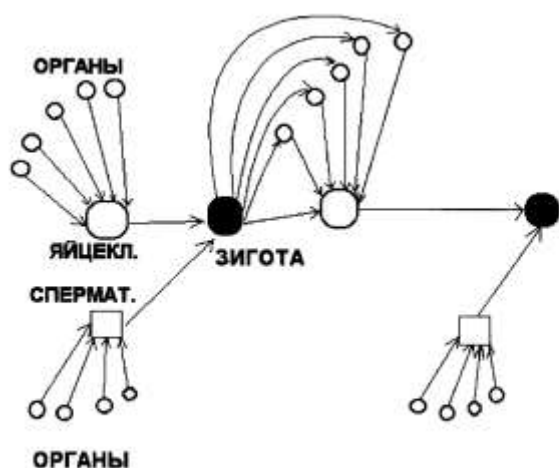


Рис. 2. Потоки генетической информации в ходе смены поколений, согласно гипотезе пангенезиса Ч.Дарвина. Органы взрослого организма посылают представляющие их геммулы в сперматозоиды или яйцеклетки. С ними геммулы попадают в зиготу, которая развивается в следующее поколение. Органы следующего поколения формируются путем “развертывания” соответствующих геммул. Изменения органов во взрослом организме приводят к изменению геммул, а, следовательно, и органов следующего поколения.

Сам Ч. Дарвин живо интересовался эмбриологическими работами, особенно теми, которые демонстрировали единство закономерностей эмбрионального развития позвоночных и беспозвоночных, в частности, трудами А.О. Ковалевского. В те годы, однако, еще не были найдены общие черты в эмбриогенезах у животных, относящихся к разным типам. Поэтому эволюционная эмбриология как наука, основывающаяся на историческом принципе, не могла еще возникнуть. Своим рождением эволюционная эмбриология обязана русским ученым А.О. Ковалевскому (1840-1901 гг.) и И.И. Мечникову (1845-1916 гг.).

Перед зоологами того времени стояла задача установить истинное систематическое положение, а, следовательно, филогенетические отношения с остальным животным миром, некоторых групп такого сборного типа, как черви, сомнительных в историческом отношении форм - бесчерепных, оболочни-

ков, мшанок, плеченогих, щетинкочелюстных, губок, кишечноротовых, кольцецов, боконервных, лопатоногих и головоногих моллюсков, ракообразных, паукообразных и насекомых.

Изучению закономерностей эмбрионального развития указанных форм Ковалевский и Мечников отдали 20 лет упорного труда. Уже в своей магистерской диссертации, посвященной развитию ланцетника, 25-летний А. Ковалевский обнаружил общие черты развития беспозвоночных и позвоночных. Причем ранние этапы онтогенеза ланцетника оказались чрезвычайно сходными с соответствующими этапами развития многих беспозвоночных, включая низших, например, кишечноротовых, а более поздние, как выяснилось, идут по типу развития позвоночных.

Через год (1866г.) А. Ковалевский опубликовал статью по эмбриологии асцидий, в которой впервые показал сходство в развитии нервной системы у асцидий и позвоночных, описал хорду у личинок асцидий. Тем самым было установлено родство асцидий, которых в то время причисляли к моллюскам, с позвоночными.

А.О. Ковалевский первым выявил зародышевые листки у беспозвоночных и доказал, что развитие всех животных происходит по единому плану. Обоснованная Ковалевским и Мечниковым идея гомологии зародышевых листков явилась эмбриологическим доказательством единства происхождения всех Metazoa.

Вслед за описательным и сравнительным этапами в эмбриологической науке в 70-80 гг. XIX века возникло аналитическое или экспериментальное направление. Целью использования в эмбриологических исследованиях экспериментальных методов явилось выяснение причин, механизмов развития и изучение возможностей целенаправленного влияния на процессы эмбриогенеза. Формирование нового направления, в первую очередь, связано с именами немецких ученых Г. Дриша (1867-1941 гг.), В. Гиса (1831-1904 гг.), В. Ру (1850-1924 гг.), Г. Шпемана (1869-1941 гг.).

Вильгельм Ру главной задачей экспериментальной эмбриологии, названной им "механикой развития", считал выявление причинных факторов, механизмов, определяющих развитие. Он полагал, что развитие строго детерминировано, и все части развивающегося зародыша тесно связаны между собой на всех этапах эмбриогенеза. В качестве средства для выявления механизмов развития В.Ру рассматривал эксперимент. Большой интерес представляют его взгляды на факторы дифференцировки различных зачатков органов. Если факторы, детерминирующие зачаток, находятся внутри него, то при наличии внешних благоприятных условий, имеет место "самодифференцировка", а если эти факторы лежат вне зачатка, то дифференцировка - "зависимая" и невозможна без воздействия фактора извне. Для выяснения пространственно-временных параметров действия факторов, определяющих развитие, В.Ру экспериментально изменял окружение зачатка. Им были разработаны теоретические основы проблем детерминации и дифференцировки. Громадное значение для понимания зависимого характера развития частей зародыша имел эксперимент В. Ру над дробящейся яйцеклеткой лягушки на стадии двух бластомеров.

Он убил один из бластомеров горячей иглой и увидел, что второй продолжает развиваться, но формирует лишь половину зародыша лягушки. Из этого эксперимента им сделаны два вывода: 1) о независимом развитии первых двух бластомеров; 2) о том, что зародыш - это мозаика из готовых зачатков.

Выдающийся эмбриолог и анатом В. Гис по праву считается основоположником аналитической эмбриологии. Он первым провел глубокий, с использованием физико-химических методов, анализ процессов морфогенеза на ранних стадиях развития зародыша. По его мнению, еще неоформленные предшественники будущих органов локализованы в яйце или в еще недифференцированном зародыше упорядочено и их возможно картировать. То есть, изначально, еще в неоформленном зародыше существуют **органобразующие участки**. Методологически данные взгляды можно классифицировать как умеренно **неопреформистские**.

Эпигенетических воззрений придерживался другой крупнейший эмбриолог-экспериментатор Г. Дриш. Им была показана способность зародыша восстанавливать естественный ход развития после экспериментально вызванного нарушения. Разделив волосистой петлей ранний зародыш морского ежа на два отдельных бластомера, он обнаружил, что каждый из них способен развиваться в полноценный организм. Отсюда он сделал вывод об эквипотенциальности клеток зародыша. Позднее, другими исследователями была показана возможность нормального развития каждого из нескольких бластомеров. Способность части зародыша восстанавливать нормальный процесс развития и давать полноценный организм Г. Дриш назвал эмбриональной регуляцией. Основываясь на способности зародышей к эмбриональной регуляции, Г. Дриш сформулировал закон о том, что "путь развития части зародыша есть функция положения этой части относительно целого".

Огромный вклад в экспериментальную эмбриологию внес Г. Шпеман. Модифицируя и углубляя эксперименты своих предшественников, он получил новые, совершенно оригинальные данные. Повторяя эксперименты Г. Дриша по разделению ранних зародышей тритона, он показал в 1901 г., что последующая судьба разделенных частей зависит от того, в какой плоскости разделяется зародыш, а точнее, каким образом распределяется материал т.н. серого серпа. Продолжив направление исследований В. Ру и Г. Дриша, Ганс Шпеман показал, что ведущую роль в детерминации будущей дифференцировки различных частей зародыша играют процессы взаимодействия частей между собой. Анализируя открытый им факт полного отсутствия осевых органов: нервной трубки, хорды и т.д. в тех разделенных частях зародыша, которые не содержали материал серого серпа, Г. Шпеман высказал идею, что нервная система формируется из индифферентной эктодермы под индуцирующим воздействием материала презумптивной (предполагаемой) хордомезодермы. Для проверки этого предположения Г. Шпеман в 1924г. пересадил зачаток хордомезодермы от зародыша гребенчатого тритона под брюшную энтодерму зародыша обыкновенного тритона и обнаружил, что пересаженная хордомезодерма действительно индуцировала превращение клеток хозяина в нервную трубку. Это явление было названо первичной эмбриональной индукцией. Следует отме-

титель, что в формообразовательных явлениях при воздействии эмбрионального индуктора имеют место и процессы регуляции.

Последующие исследования индукционных взаимодействий, проведенные в 50-60 гг. С. Тойвоненом, Л. Саксенем, П. Ньюкупом и К. Гробстайном, позволили выявить целый ряд вторичных индукций. С. Тойвонен и его ученик Л. Саксен в 1954-1968 гг. обосновали модель ранних индукционных процессов в нейрогенезе под влиянием двух индукторов, распределенных в зародыше по двум градиентам и действующих либо изолированно, либо в различных сочетаниях. Ими было показано, что нейрогенез идет в два этапа: вначале под действием нейтрализующего фактора идет собственно нейтрализация, а на втором этапе происходит регионализация ЦНС на отделы под действием производных мезодермы.

Таким образом, процесс индивидуального развития обусловлен индивидуальными взаимодействиями частей зародыша посредством внутренних и внешних факторов химической природы.

Совершенно иной механизм интегрированности процессов развития был предложен советским биологом и математиком А.Г. Гурвичем (1874-1954 гг.). Это был человек ярких, разносторонних дарований, смелый теоретик и прекрасный экспериментатор. В 1944 г. им была создана "теория биологического поля", включающая понятие "поле клетки". По его представлениям взаимовлияние клеток друг на друга осуществляется посредством их полей, объединенных в единое "актуальное поле". В ходе развития конфигурация и анизотропные свойства "биополя" постепенно меняются, но именно оно обеспечивает интеграцию зародыша в целостную систему.

Актуальными остаются идеи А. Гурвича о **"митогенетическом излучении"**, об устойчивом неравновесии биологических систем, о возможности математического описания морфогенетических процессов.

Вообще идея о существовании "биологического поля" всегда являлась привлекательной для некоторых исследователей (Дж.С. Гексли, Г.Р. де Бер, К. Уоддингтон, П. Вейс, Н.К. Кольцов и др.).

Значительный вклад в экспериментальную эмбриологию внес советский ученый М.М. Завадовский, который попытался выяснить механизмы становления различных признаков, особенно половых, у птиц и млекопитающих, как результат взаимодействия "частей". Например, петушиный гребень развивается из тканей покровов головы под влиянием половых гормонов семенника. Удаление семенника ведет к редукции гребня, а ампутация гребня, в свою очередь, влечет гипертрофию семенников. Завадовский экспериментально нашел еще ряд **взаимодействующих систем** (яичник-матка; гипофиз-яичник и др.) в развивающемся организме. Его труды положили начало многочисленным исследованиям гормональных регуляций гаметогенеза, эмбриогенеза, метаморфоза, регенерации и других морфогенетических процессов.

Большой интерес представляют работы по изучению вегетативного и полового размножения, а также восстановительного морфогенеза (Т. Морган, А. Вейсман, П.П. Иванов, А.А. Браун, М.А. Воронцова, Л.Д. Лиознер, Б.П. Токин и др.).

Под влиянием трудов Дж. Нидхема сформировалось новое направление "химическая эмбриология", в котором всё больший удельный вес стали иметь генетические и молекулярнобиологические работы.

Уже в конце XIX века в результате интенсивных исследований строения клетки было установлено, что материальным носителем наследственности является ядро, а еще точнее - хроматин ядра (О. Гертвиг, Э. Страсбургер, Г. де Фриз, А. Вейсман). В 1888 году Т. Бовери установил закон постоянства числа хромосом у каждого вида, показал, что хромосомы являются постоянными структурами, сохраняющими свою индивидуальность в период между клеточными делениями, сформулировал положение о том, что зигота и все соматические клетки содержат наборы отцовских и материнских хромосом. В 1900 г. Г. де Фриз, К. Корренс и К. Чермак заново открыли законы наследования дискретных признаков, впервые описанные еще в 1865 г. Грегором Менделем, но остававшиеся неизвестными широкой научной общественности. В 1909 г. В. Иогансен ввел понятие **ген** как единицы наследственности. Формирование и дальнейшее развитие цитологических основ генетики, в результате чего были открыты следующие фундаментальные принципы: линейность расположения генов в хромосомах, сцепление, кроссинговер, аллельность, связаны с именами Т.Моргана (1866-1945 гг.) и его учеников К. Бриджеса (1889-1938 гг.), Г.Миллера (1890-1967 гг.), А. Стёртеванта (1891-1970 гг.). В результате многочисленных экспериментов на политенных хромосомах личинок дрозофил у них сложилось представление о жесткой детерминированности проявления гена в признаке. Однако многие факты свидетельствовали о том, что фенотипическое проявление признака конкретного гена является весьма сложным, многоступенчатым процессом, в определенной степени зависящим от внешних условий. В 1925 году Н.В. Тимофеев-Ресовский ввел понятия "пенетрантность" (процент особей в потомстве, несущих признак) и "экспрессивность" (степень выраженности признака). Позднее было показано, что проявление каждого отдельного признака является результатом совместного действия множества генов (теория генного баланса К. Бриджеса, 1930 г.).

Открытые ещё в 1868 году И. Ф. Мишером в клетках богатых ядерным материалом нуклеиновые кислоты лишь в конце 30-х - начале 40-х годов стали рассматриваться как химическая субстанция генов. Ранее, в 1928 году, Ф. Гриффитс открыл явление **трансформации** - передачу генетических признаков убитых пневмококков живым. Но лишь много позднее из пневмококков было выделено вещество, ответственное за трансформацию и показано, что оно представляет собой ДНК.

Трехмерная структура ДНК была установлена в 1953 г. генетиком Г. Уотсоном и физиком Ф. Криком.

Большой вклад в решение проблемы взаимодействий ядра и цитоплазмы как основы функционирования генетического аппарата, внес академик Б.Л. Астауров (1904-1974 гг.). Ещё в 30-х годах он одним из первых высказал мысль о сложном, зависимом от многих факторов, характере реализации генетической информации. Разработанные им методы искусственного получения партеногенетического (на основе генов только яйцеклетки), андрогенетического (на ос-

нове генов только сперматозоида) потомства имели важное прикладное значение и могут быть смело квалифицированы, как вклад в мировую науку.

Современная научная эмбриология появилась, прежде всего, в результате развития клеточной теории. Ее главные представления могут быть сформулированы следующим образом:

- живые организмы представлены исключительно клетками (не считая вирусов);

- есть организмы, представляющие собой единственную клетку, и организмы, составленные многими клетками;

- все многоклеточные организмы развиваются из единственной клетки (яйцеклетки или зиготы), группы отдельных клеток (споры, дающие начало гифам, образующим плодовое тело грибов и родственных форм) или от групп клеток, происходящих, в конечном счете, из одной клетки при соматическом эмбриогенезе;

- диплоидная клетка - зигота, представляющая собой начальную одноклеточную стадию развития большинства видов организмов, является результатом слияния сперматозоида и яйцеклетки. Это часто очень необычные по форме и размеру образования, которые однако формируются путем модификации клетки вполне “обычного” облика;

- новый многоклеточный организм формируется из зиготы путем многократного митотического деления ее ядра и *немедленного или отложенного деления ее цитоплазмы* с образованием многоклеточной структуры и последующей дифференцировки многоклеточной структуры на органы и ткани эмбриона;

- при формировании из диплоидных клеток сперматозоидов и яйцеклеток одно из двух последовательных делений, необходимых для формирования этих гамет из обычной диплоидной клетки, протекает без репликации ДНК и после второго деления содержание наследственного материала в гаметах оказывается в 2 раза ниже (гаплоидные клетки), чем в обычных диплоидных клетках. При слиянии гамет при оплодотворении нормальное количество ДНК, характерное для диплоидных клеток, восстанавливается.

Достаточно очевидно, что *происхождение онтогенеза Metazoa* в ходе эволюции тесно связано с происхождением самой многоклеточности. Каждый организм Metazoa при наиболее обычном варианте размножения, включающего половой процесс, первоначально представлен единственной клеткой - зиготой (оплодотворенной яйцеклеткой). Первый этап онтогенеза - дробление представляет собой форму перехода от единственной клетки к многоклеточному организму. От обычного деления клеток в ходе *размножения* одноклеточных Protozoa дробление отличается тем, что клетка ***вырастает*** до гораздо больших размеров, чем обычная клетка (*малый и большой рост овоцита первого порядка*), а потом многократно делится ***без дорастания до прежнего размера после каждого деления (палинтомия)***, в результате чего размеры дочерних клеток уменьшаются, по сравнению с материнской (*зиготой*, т.е. оплодотворенной яйцеклеткой). В результате дробления получается сначала “куча” более или менее одинаковых клеток (*клон, или колония клеток*), которая лишь

позднее подразделяется на : 1) клетки разных типов (клеточная дифференцировка), 2) на разные органы (голова, хвост, конечности), которые могут включать наборы сходных и несходных клеточных типов (органный дифференцировка). При этом большинство клеток “кучи” утрачивает способность производить путем деления таких потомков, которые превратятся в сперматозоиды или яйцеклетки, и следовательно, непосредственно не участвуют в формировании следующих поколений, т.е. в размножении организма. Это удел лишь клеток, дифференцирующихся как клетки “зародышевого пути” (рис.3).

Сама эта схема онтогенеза подсказывает, как в ходе филогенеза могла развиваться многоклеточность, а с ней и неотделимый ее спутник онтогенез Metazoa:

1) продукты деления зигот (половой процесс свойственен, как известно и одноклеточным Protozoa) не расходятся, образуя колонию из группы клеток;

2) клетки колоний в ходе эволюции специализируются на половые и вегетативные (соматические, питающие), что является важным рубежом, отделяющим колонию равноправных клеток от целостного организма, способного обеспечить размножение лишь как целостное образование половых и питающих клеток;

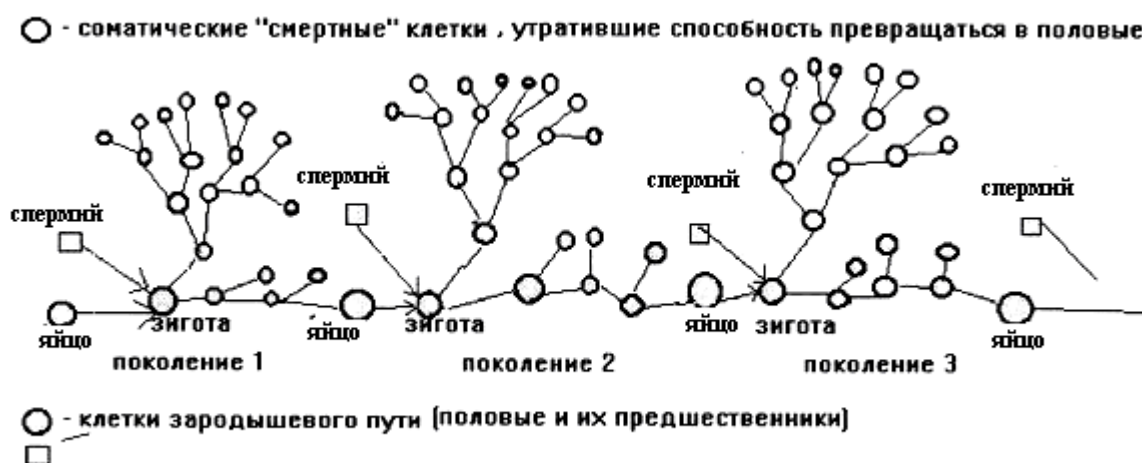


Рис. 3. Потоки генетической информации в ходе смены поколений согласно современным представлениям биологии развития. Некоторые из потенциально бессмертных клеток зародышевого пути передают содержащуюся в них генетическую информацию как в следующее поколение, так и в соматические клетки всех органов каждого данного организма. Соматические клетки погибают со смертью каждого поколения и не передают в клетки зародышевого пути тех изменений информации, которые в них произошли при жизни данного поколения. В следующее поколение могут передаваться только генетические (и возможно иногда менее устойчивые эпигенетические) изменения, происшедшие в самих клетках зародышевого пути, давших начало организмам нового поколения.

3) питающие клетки в ходе филогенеза приобретают разные функции и начинают отличаться друг от друга (цитодифференцировка);

4) разные стороны некогда сферической колонии приобретают разное строение, специализируются на разных функциях (органный дифференцировка). Этот взгляд на происхождение онтогенеза, который в общих чертах явля-

ется преобладающим в настоящее время, да, пожалуй, и со времени утверждения клеточной теории, преобладал и в прошлом, не был, тем не менее, безальтернативным, и в середине 20 го века продолжалась дискуссия. В частности, на основе сравнительно-эмбриологических исследований этот взгляд защищал крупный советский эмбриолог А.А.Захваткин. Иной точки зрения придерживался известнейший советский морфолог А.А.Заварзин.

Какие же факты могли ставить под сомнение изложенную теорию происхождения онтогенеза? Вспомним, что приведенная выше схема онтогенеза в той ее части, которая касается дробления, является хотя и частым, но все же частным случаем. Например, у многих насекомых дробления зиготы в обычном смысле нет вообще. Ядра делятся в центре зиготы, но деления цитоплазмы не происходит в течение всего периода, который можно “с чистой совестью” называть дроблением. Ядра в неразделенной цитоплазме мигрируют в ее поверхностный слой и там отделяются от соседних ядер (но, по началу, не от глубоких слоев цитоплазмы, богатых желтком) врастающими с поверхности цитоплазмы складками цитомембраны. Лишь позднее, скорее, с началом гастрюляции ядра с участками цитоплазмы окружаются цитомембраной со всех сторон.

Если бы мы были знакомы только с таким характерным для многих насекомых “поверхностным дроблением”, мы могли бы прийти к заключению, что эволюция многоклеточности шла иначе: 1) многоядерная клетка (как это встречается у Protozoa, например, у инфузории *Opalina*); 2) дальнейший рост размера клетки и появление в связи с этим складок цитомембраны между ядрами; 3) дальнейший рост клетки, локальная специализация цитоплазмы по форме и функции (как это бывает у инфузорий сложной формы, например, *Stentor* с его ножкой и воронкой) и изоляция в ней участков цитоплазмы с ядром в связи с необходимостью разного функционирования ядер в разных участках клетки; 4) вторичное изменение способа развития (*филэмбриогенез*) многоклеточной структуры у некоторых видов, приобретших полное дробление.

Иными словами, вместо траектории - многоядерная клетка; складки цитомембраны между ядрами в поверхностном слое цитоплазмы; полное окружение цитомембраной ядер с участками цитоплазмы - иная траектория: уже на стадии двух ядер складки цитоплазмы изолируют эти ядра с половиной цитоплазмы зиготы каждое друг от друга, что повторяется после последующего деления каждого из ядер и напоминает процесс размножения самостоятельных организмов Protozoa, но без разделения целостного материнского организма на две и более дочерних клеток-организмов.

Подобный филэмбриогенез можно видеть, например, при переходе от дискоидального неполного дробления у примитивных млекопитающих ехидны и утконоса, где разделения всей зиготы на две и более клеток в ходе дробления не происходит, к высшим плацентарным млекопитающим, у которых уменьшившаяся во много раз зигота приобрела способность уже при первом митозе делиться на две клетки, со всех сторон изолированные мембранами.

Примерно, такую точку зрения на происхождение многоклеточности высказывал А.А.Заварзин. При этом, в частности, он приводил следующий аргу-

мент против происхождения многоклеточности путем эволюции колоний из одноклеточных организмов. Простейшее - **целостный** организм, как и многоклеточные организмы, способный к самостоятельному существованию и воспроизведению в природе. Клетки многоклеточных есть лишь **части** целостного организма и к самостоятельному существованию в природе не способны. Эта целостность неделима и непрерываема. Колонии простейших не есть организмы и развитие из них интегрированных организмов означало бы утрату членами колонии организменной целостности, временное существование вида без организменной интеграции и возникновение ее заново, что представляется невозможным. Этот философский аргумент нельзя считать неотразимым. В конце концов, рабочая пчела, представляющаяся интегрированным сложнейшим организмом сама по себе не способна к воспроизведению, а воспроизводиться способен только рой пчел как целое, причем рабочие пчелы напоминают соматические питающие клетки, а пчелиная матка что-то вроде половой клетки или, вернее, гонады.

Можно подойти и с другой стороны. Существует ли в зиготе какая-то организменная целостность многоклеточного животного? Если да, то при механическом объединении двух зигот или двух разных эмбрионов должны развиваться два разных организма или уродливая структура из перемешанных тканей с признаками сросшейся двойни, вроде сиамских близнецов. В действительности даже при объединении эмбриона овцы с эмбрионом козы британским ученым удалось получить гармонично развитого химерного козо-ягненка с одной головой, четырьмя конечностями, одним хвостом, причем в формировании разных участков тела принимали участие клетки обоих видов. Проще всего этот феномен объясняется тем, что многоклеточная интеграция организма у ранних эмбрионов отсутствует, но **заново возникает** в процессе дальнейшего эмбрионального развития, как это, по-видимому, и имело место при эволюции колоний одноклеточных.

С другой стороны, нельзя считать, что организменная интеграция простейших полностью утрачена клетками многоклеточных. Достаточно вспомнить, что клетки многих тканей Metazoa способны размножаться вне организма в питательных средах, а некоторые клетки растений в таких условиях способны даже воспроизвести целый организм.

Огромные успехи, достигнутые в 50-60-х годах в области культивирования клеток и в области микрохирургической техники, позволили разработать методы пересадок ядер соматических клеток в энуклеированные яйцеклетки с целью выяснения их генетических потенций в новом окружении. Р. Бриггс и Т. Кинг в 1955 г. в экспериментах по пересадке клеточных ядер бластулы или гастрюлы лягушки в неоплодотворенные, активированные (уколом) к партеногенетическому развитию яйца лягушки с удаленными ядрами, показали, что приблизительно в 25-30% случаев происходят нормальные дробление и гастрюляция. Отсюда был сделан вывод о том, что ядра клеток бластулы и ранней гастрюлы ещё сохраняют "тотипотентность", то есть, ядро каждого бластомера генетически эквивалентно ядру зиготы. Дж. Гердон в 1962 г. доказал способность пересаженных ядер клеток кишечного эпителия питающихся головасти-

ков шпорцевой лягушки обеспечивать эмбриональное развитие энуклеированных яиц (правда, менее чем в 1,4% случаев из 726 пересадок).

Данные эксперименты послужили основой для бурно прогрессирующего в последние годы направления по клонированию животных из бластомеров и из соматических клеток зрелых животных. Первая клонированная шотландским ученым Уилмутом овца Долли (1997 г.), а также клонированные профессором Гавайского университета Р. Янагимати и его ассистентом Т. Вакаямой (1998 г.) мыши (и даже клонированные во втором поколении, то есть клонированные от уже клонированных), вызвали сенсацию не только среди специалистов, но получили также широкий общественный резонанс (подробнее в главе 18).

Для эмбриологических исследований конца двадцатого и начала двадцать первого веков характерно изучение чрезвычайно широкого круга вопросов, среди которых можно выделить следующие: молекулярно-биологические, биохимические и генетические механизмы регуляции развития и старения в целом, клеточной дифференцировки, пролиферации и морфогенеза в частности; проблемы становления иммунитета в развитии; изучение гаметогенеза, проблемы культивирования и консервации гамет и ранних зародышей особо ценных линий домашнего скота и редких видов диких животных; получение трансгенных животных; исследование регенерации органов и тканей в различных условиях, селекция, культивирование и консервация стволовых клеток и др.

Вопросы для самоконтроля:

1. Знания и представления об эмбриональном развитии человека и животных в античную эпоху. Взгляды Гиппократ и Аристотеля.
2. Эмбриологические исследования и теории в эпоху Возрождения. Работы У.Альдрованди, В.Койтера, Д.Фабриция, В.Гарвея, А.Левенгука и др.
3. Суть преформистской и эпигенетической концепций.
4. Работы К.Ф.Вольфа и К.М.Бэра.
5. Разработка теории зародышевых листков.
6. Влияние эволюционной теории Ч.Дарвина на развитие эмбриологии. Теория «Пангенезиса».
7. Эволюционная эмбриология. Труды А.О.Ковалевского и И.И.Мечникова.
8. Работы Г.Дриша, В.Гиса, В.Ру, Г.Шпемана и возникновение экспериментальной эмбриологии.
9. Исследования индукционных взаимодействий в развивающемся зародыше (С.Тойвонен, Л.Саксен, П.Ньюкуп, К.Гробстайн, А.Г.Гурвич).
10. Основные положения клеточной теории.
11. Возникновение Metazoa в эволюции.

Основные проблемы и «точки роста» современной биологии развития

ГЛАВА ВТОРАЯ

КРАТКИЙ ОБЗОР МЕТОДОВ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

Историческая динамика использования описательного, сравнительного и экспериментального методов в биологии индивидуального развития. Микрохирургия и ее использование в биологии развития. Метод «химер». Генная инженерия. Метод направленного включения определенного гена («нокаут»). Молекулярно-генетические и молекулярно-биологические методы, используемые в биологии развития.

Исторически первым этапом развития эмбриологии явился описательный, когда практически все исследования сводились к более или менее точному описанию морфологических изменений в развивающемся организме. Причем, первоначально изучалось общее строение организма зародыша в разные периоды его эмбриогенеза, а затем основное внимание исследователей стали привлекать вопросы становления тонкой структуры внутренних органов и их зачатков в процессе развития. Необходимо отметить, что классическая описательная эмбриология и в наши дни не исчерпала себя, прежде всего, благодаря использованию современных методов электронной и прижизненной микроскопии, а также новым способам маркировки частей развивающегося зародыша.

В середине XIX века, после появления трудов Ч. Дарвина, резко возрос интерес биологов к проблемам эволюции органического мира. Соответственно, в этот период в эмбриологической науке на передний план выдвинулись исследования сравнительного и эволюционного направления. Возникло понимание того, что индивидуальное развитие организма несет на себе отпечаток исторического развития животного мира в целом. Первые сравнительные исследования проводились на наиболее доступных объектах, в частности, на морских беспозвоночных. Прогресс техники исследований позволил перейти к сравнительному изучению эмбриогенеза других групп животных. И в наше время сравнительная эмбриология остается актуальной, полученные ею данные помогают лучше понять многие тонкие механизмы, лежащие в основе эмбриогенеза человека. Кроме того, исследование эмбриогенеза различных видов позволяет подбирать модельные системы для экспериментальной проверки тех или иных эмбриологических гипотез, предположений и т.п.

Постепенное накопление фактических данных о зародышевом развитии животных организмов подготовило почву для использования в эмбриологии экспериментальных методов исследования. Если описательная эмбриология исследует то, каким образом и в какой последовательности протекает тот или иной процесс зародышевого развития, то экспериментальная эмбриология ставит целью выяснение причинных взаимосвязей между различными процессами и частями зародыша в ходе развития. Неслучайно, один из основателей экспериментальной эмбриологии Вильгельм Ру назвал её "механикой развития".

Роль в зародышевом развитии различных внутренних и внешних факторов физико-химической природы особенно интенсивно изучается в наши дни.

В первой половине 20-го столетия пришло ясное понимание того, что среди множества процессов, определяющих развитие, важнейшими являются происходящие на молекулярно-генетическом уровне. Это вызвало повышенный интерес к биохимическим и молекулярно-биологическим исследованиям эмбриогенеза, которые позволили выявить глубинные механизмы, лежащие в основе процессов развития.

При этом важнейшими методами современной экспериментальной биологии развития, наряду с перечисленными традиционными являются следующие.

Микрохирургия. Этот метод включает ряд приемов, из которых важнейшим является **трансплантация** (пересадка) с помощью специального прибора-микроманипулятора или вручную под препаровальным микроскопом зачатков органа с его “естественного” места в эмбрионе в другие его части. Цель опытов по трансплантации – выяснить, обладает ли зачаток необходимой информацией к моменту операции, чтобы развиваться самостоятельно в направлении того органа, который из него в норме получится, или он нуждается в “сигналах” от окружающих его других структур для такого развития, а также не является ли он сам источником таких “сигналов” для других зачатков? Кроме зачатков органов могут трансплантироваться даже изолированные ядра одной клетки в другую клетку. Трансплантации зачатков тканей и органов возможны иногда даже между филогенетически далекими видами. Удавалось приживлять трансплантаты из эмбриона тритона эмбриону лягушки.

Близким по смыслу к трансплантации методом является **эксплантация** *in vitro* (перенос зачатка из эмбриона в стеклянную посуду с подходящей стерильной культуральной средой), также позволяющая выяснить, какие структуры способен сформировать зачаток, изолированный от влияния организма эмбриона в культуре ткани или органной культуре. Вместо эксплантации *in vitro* зачатки органов можно пересаживать на хориоаллантоис развивающегося куриного эмбриона или в переднюю камеру глаза млекопитающих, где имеются соответствующие условия трофики и, одновременно, ослаблен иммунный ответ.

Особенно ценным методом микрохирургии является получение так называемых **“химер”** путем объединения двух и более зародышей (рис. 4) с разной наследственностью (например, разного вида, разной окраски или разного пола) с получением из них одного правильно устроенного организма, содержащего клетки с разным генотипом вплоть до развития химерного ягненок-козленка нормального анатомического строения, но с участками тканей 3 типов: 1) из клеток одного генотипа, 2) из клеток второго генотипа, 3) из смеси клеток обоих генотипов. Методом химер можно установить, какая из тканей определяет тот или иной признак, например, определяется ли пол самими половыми клетками или “вспомогательными” клетками гонад.

Методы классической генетики развития. Под влиянием того очевидного факта, что мутация единственного гена способна радикально изменить строе-

ние органа, естественно утвердился взгляд, что ген определяет морфологический признак. В рамках биологии развития требуется анализ *механизма* связи между геном и признаком. В первую очередь эмбриологов интересовали вопросы: когда и где действует ген, т.е. на какой стадии развития включается активность гена и в клетках какой именно ткани. Если мутация гена проявляется во взрослом состоянии, например, коротконогость, то можно попытаться узнать время включения как мутантного, так и нормального, генов в ходе эмбриогенеза, соответственно, мутантной или нормальной особи по стадии эмбриогенеза, на которой появляются первые различия в размерах зачатков конечностей между мутантными и нормальными эмбрионами. Чтобы узнать в какой ткани проявляется действие гена, можно с помощью трансплантаций разных тканей или органов от мутантной особи нормальной выяснить, при какой комбинации тканей с мутантным генотипом и нормальным генотипом развивается мутантный фенотип, а при какой комбинации нормальный. Удалось, например, показать, что мутантный фенотип с отсутствием хрусталика глаза обусловлен неполноценностью гена в клетках эктодермы над развивающимся глазом, а не в клетках зачатка сетчатки глаза, которая нужна для начала развития эктодермы в хрусталик. Комбинирование сетчатки с мутантным генотипом и эктодермы с нормальным генотипом не мешало развитию хрусталика, а при обратной комбинации (эктодерма с мутантным геном и сетчатка с нормальным геном) хрусталик не развивался.

На вопрос, каким образом ген определяет морфологический признак, дать сколько-нибудь полный ответ труднее. Иногда дело оказывается, например, во временном подавлении клеточного деления в определенной ткани на определенной стадии развития. Однако полный ответ требует обычно молекулярно-генетических исследований.

Генная инженерия. Важнейшими генно-инженерными методами, все шире применяемыми в биологии развития, являются методы выключения (“нокаута”) в эмбрионе или его части экспрессии какого-либо гена или включения такой экспрессии в такой части эмбриона, где она в норме отсутствует (“эктопическая экспрессия”). Оба эти взаимодополняющие подхода позволяют уточнить конкретную роль гена в том или ином морфогенезе, уточнить функцию белка, кодируемого геном, в том числе его роль в кодировании, передаче и декодировании позиционной информации.

Техника «нокаута» достаточно громоздка и сложна, но эффективна для решения поставленных задач. Суть ее сводится к созданию методами молекулярной генетики генетической конструкции, включающей вирусный вектор, в который вставляется ген, подлежащий нокауту в эмбрионе (рис.5). Этот ген предварительно подвергают мутации, например, путем его разрезания ферментом рестриктазой и вставления в разрыв бактериального гена устойчивости к антибиотiku неомицину. Раствор из таких векторов вливают в культуру стволовых клеток раннего эмбриона и с помощью электрического разряда или другим способом вводят генетическую конструкцию в ядра клеток. В редких случаях в процессе репарации случайно возникающих повреждений ДНК хромосом введенный мутантный ген может встроиться в ДНК хромосомы вместо

нормального гена, внося в хромосому и ген устойчивости к неомицину. Помещая множество стволовых клеток, подвергшихся такой обработке, в культуральную среду с неомицином, убивающим клетки, не включившие вектор в хромосому, позволяют размножиться только клеткам, включившим мутантный ген.

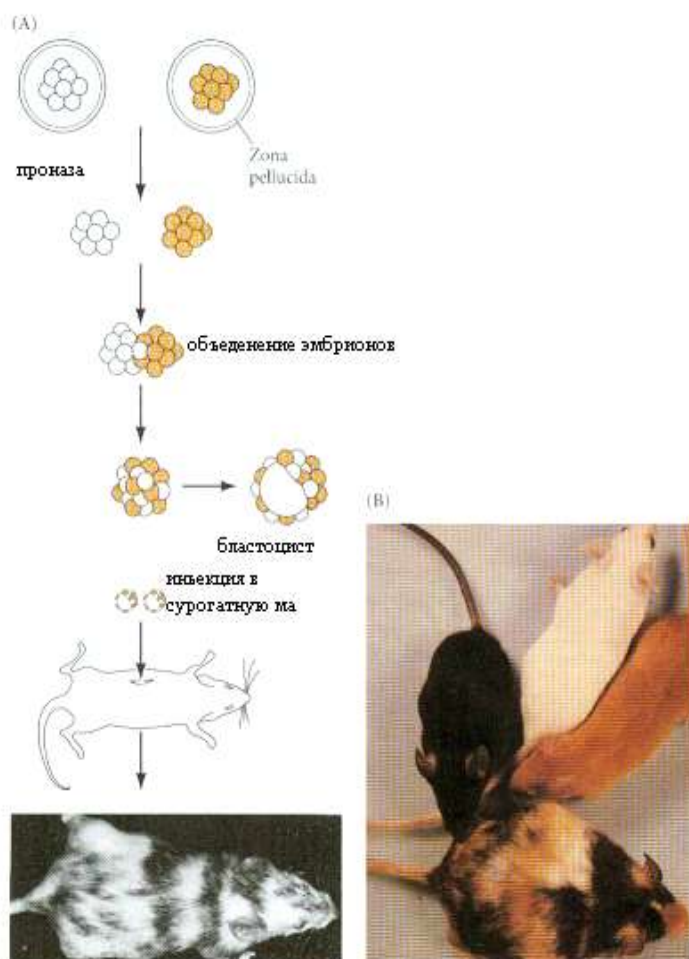


Рис. 4. Способ получения химер.

Эмбрионы мышей от родителей разной масти на стадии нескольких бластомеров извлекаются из яйцеводов матери, zona pellucida растворяется протеолитическим ферментом проназой, эмбрионы объединяются в один, культивируются до стадии бластоцисты и помещаются в матку для дальнейшего развития. Волосы на покрове родившихся мышей имеют вид полос разного цвета. Удавалось получать эмбрионов и от трех пар родителей разного цвета (полосы 3 цветов). Их потомство от скрещивания с белой мышью могло содержать мышей всех трех цветов уже в чистом виде (без полос), так как разные их гаметы могли происходить из клеток, гомозиготных по любой из 3 мастей. (По S.F.Gilbert. “Developmental biology”, 2003).

Такие клетки используют для получения химер, вводя их в ранний эмбрион мыши. В гаметах развившейся мыши могут оказаться хромосомы, несущие мутантный ген, а при спаривании таких мышей с нормальными мышами появляются особи, гетерозиготные по мутации гена, т.е. получившие от одного родителя нормальную хромосому, а от другого - хромосому с мутантным геном. При скрещивании двух гетерозигот между собой, каждый четвертый потомок оказывается гомозиготным по этой рецессивной мутации и развивающиеся гомозиготные эмбрионы будут лишены нормального гена, что приведет к нарушению тех морфогенезов, где данный ген требуется. По выявленным дефектам развития можно составить представление о роли данного гена в развитии.

Другой способ выключения генов связан с синтезом антисмысловой РНК

к данному гену, т.е. РНК, комплементарной иРНК, транскрибированной на гене, подлежащем выключению. Этот синтез можно осуществлять с помощью генной инженерии в самих клетках эмбриона или вне его. В последнем случае антисмысловую РНК вводят в клетки ранних эмбрионов. Присутствие достаточно высоких концентраций антисмысловой РНК в цитоплазме приводит к образованию двойных спиралей иРНК + антисмысловая РНК, которые разрушаются нуклеазами, что делает невозможным синтез соответствующего белка (трансляцию). Для получения *эктопической экспрессии гена* в генетической конструкции транскрибируемая часть гена остается нормальной, но в регуляторную нетранскрибируемую часть гена - промотор вносятся изменения, позволяющие включать транскрипцию гена не в том типе клеток, в котором она обычно реализуется, а в клетках иных тканей или в любых тканях. Такую конструкцию (нормальный ген с ненормальным промотором) можно ввести в зиготу и тогда экспрессия гена произойдет в тканях, где в норме ее нет. Можно ввести такую конструкцию и в соматические клетки в культуре, а затем сами клетки трансплантировать в те или иные части зародыша, где в норме соответствующий ген не экспрессируется. Такие опыты проводятся часто для того, чтобы доказать, что морфогенетический процесс может быть запущен экспрессией именно данного, а не какого-то иного гена.

Молекулярно-генетическая “гистохимия” (гибридизация *in situ*).

Помимо методов экспериментального воздействия в биологии развития применяются методы **выявления экспрессии** генов часто по наличию их транскриптов, синтезированных на генах РНК, в ядрах или цитоплазме. В качестве зондов, т.е. химических реактивов, специфично выявляющих РНК, синтезированную именно на определенном гене, используют комплементарную ей ДНК (т.е. фрагмент гена) или антисмысловую РНК, в которую включают радиоактивную метку. Срезы эмбриона или тотальные препараты мелких эмбрионов обливают раствором зонда, который прочно связывается только с комплементарной ему РНК.

Это прочное соединение комплементарных молекул называют “гибридизацией”, которая происходит непосредственно в тех клетках и даже в тех участках клетки, где находятся транскрипты, т.е. на их естественном месте (“*in situ*”) ткани (отсюда такое название метода). Затем отмывают избыток раствора зонда, который не закрепился за РНК, и покрывают срезы или тотальные препараты мелких эмбрионов фотоэмульсией на несколько дней. После этого фотоэмульсию проявляют обычными для фотографии методами и выявляют в ней почернения в местах, где присутствует связанный с транскриптом радиоактивный зонд, “засвечивающий” эмульсию.

Вместо радиоактивной метки можно использовать присоединение к ДНК- или РНК-зонду люминисцентной краски (флюоресцеина и др.) и выявлять присутствие транскрипта определенного гена в ткани с помощью люминисцентного микроскопа по люминесценции клеток в определенных структурах гистологического среза эмбриона или его тотального препарата.

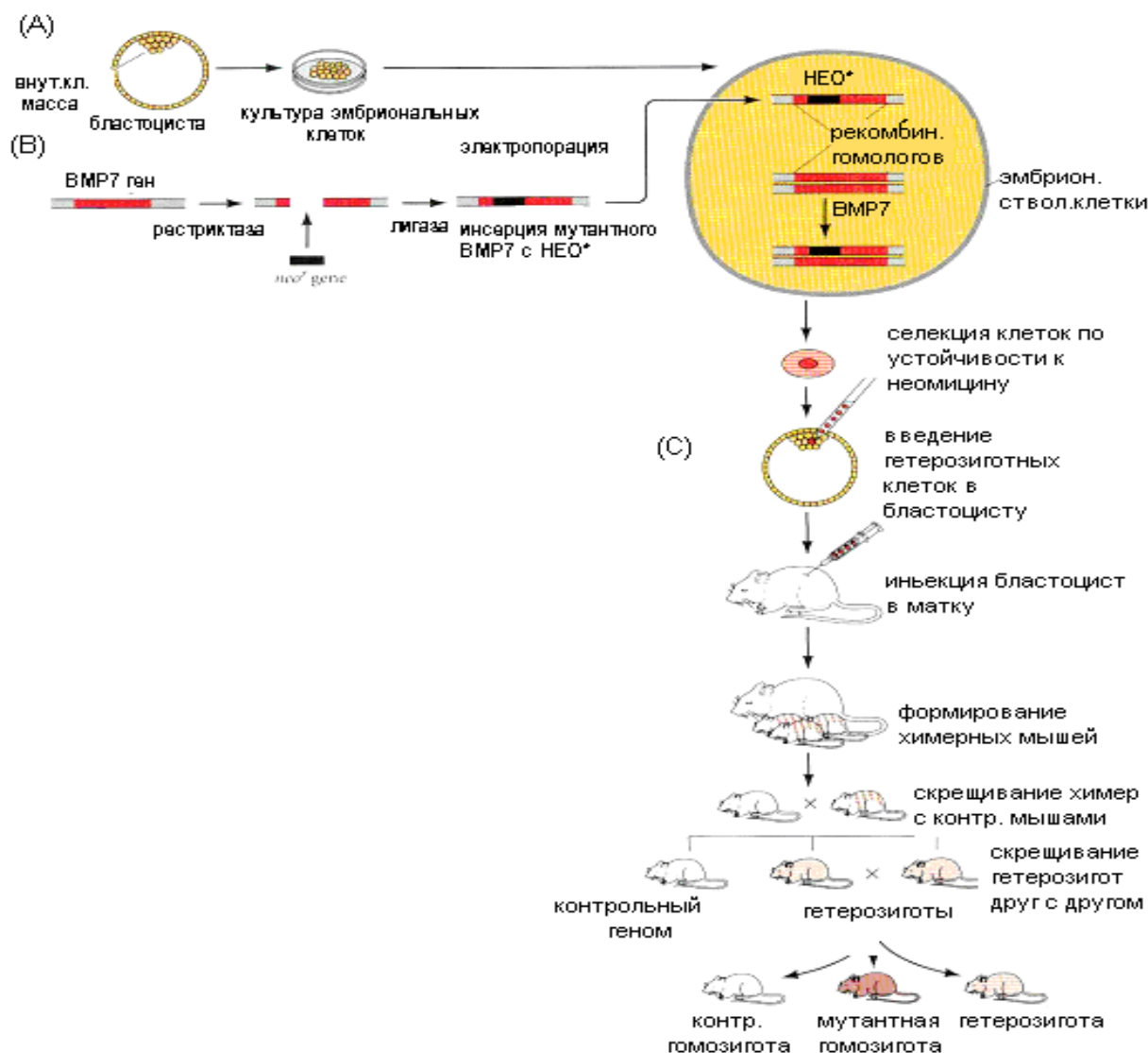


Рис. 5. Метод направленного выключения определенного гена (“нокаут”).

А) Стволовые клетки бластоцисты культивируются *in vitro* и с помощью электроразряда в них вводят генетическую конструкцию (В) ген, подлежащий выключению (например, ген “сигнального” белка - паракринного фактора BMP7, инактивированного искусственно созданной мутацией - разрезанием ферментом рестриктазой со вставлением в разрез гена устойчивости к неомицину). Такая конструкция в процессе изредка протекающего процесса гомологичной **рекомбинации** вставляется в хромосому на место нормального гена, а сам нормальный ген разрушается. Выбрать клетки с рекомбинацией удастся с помощью культивирования всей популяции клеток в среде с неомицином, где выживают только клетки с рекомбинацией. Выделенные трансгенные клетки вносятся в ранний эмбрион нормальной мыши (С), который возвращают в матку. Родившиеся химерные мыши спариваются с нормальными мышами и среди потомства некоторые особи оказываются гетерозиготами по созданной мутации. При скрещивании гетерозигот между собой каждый четвертый эмбрион оказывается гомозиготным по мутации, т.е. оказывается без нормального гена. Воспроизводящиеся отклонения от нормы показывают роль гена в определенных морфогенезах. Так было показано, что ген BMP7 участвует в морфогенезе глаза и почек (без него глаза не развиваются, а почки вырастают до незначительных размеров). При скрещивании гетерозигот между собой каждый четвертый эмбрион оказывается гомозиготным по мутации, т.е. оказывается без нормального гена. Воспроизводящиеся отклонения от нормы показывают роль гена в определенных морфогенезах. Так было показано, что ген BMP7 участвует в морфогенезе

незе глаза и почек (без него глаза не развиваются, а почки вырастают до незначительных размеров). (По S.F.Gilbert. “Developmental biology”, 2003).

Молекулярно-биологические методы выявления экспрессии генов..

Зонд, аналогичный используемому в гибридизации *in situ*, может быть использован и для выявления экспрессии гена по его транскрипту на электрофореграммах. В этом случае из ткани выделяется вся РНК, разделяется с помощью электрофореза на фракции с разной электрофоретической подвижностью, и эти фракции испытываются на способность прочно связываться с зондом. Наличие окраски зондом определенной полосы на фореграмме означает наличие в ней транскрипта, соответствующего гену.

В настоящее время на основе этого принципа разработан метод анализа, позволяющий выявлять особенности экспрессии одновременно многих генов у эмбрионов на разных стадиях развития или в опытах по трансгенезу и в контроле.

Вопросы для самоконтроля:

1. Использование описательного метода в эмбриологии в исторической ретроспективе и в настоящее время.
2. Сравнительно-эволюционные исследования в эмбриологии.
3. Цель, задачи и достижения экспериментальной биологии развития. Трансплантация, эксплантация зачатков органов, разделение зародышей на отдельные части и получение «химер».
4. Метод выключения («нокаута») или включения в эмбрионе экспрессии какого-либо гена.
5. Молекулярно-генетические и молекулярно-биологические методы выявления экспрессии генов.

ГЛАВА ТРЕТЬЯ

ПЕРИОДИЗАЦИЯ ОНТОГЕНЕЗА У ПОЗВОНОЧНЫХ

Стадии и периоды в онтогенезе позвоночных животных. Общая характеристика эмбрионального, личиночного, ювенильного периодов в индивидуальном развитии. Метаморфоз, его формы и гормональная регуляция. Морфофизиологические и биохимические особенности периодов размножения и старения.

Разделение онтогенеза на стадии и периоды основано на особенностях формообразовательных процессов и характере связей развивающегося организма с окружающей средой, доминирующих на конкретном этапе развития. Так как онтогенез – это непрерывный процесс, любая периодизация носит достаточно условный характер и у разных авторов различается. Относительно короткие этапы онтогенеза называются стадиями, а более продолжительные – периодами.

Обычно в онтогенезе позвоночных животных выделяют следующие стадии: предзародышевый (проэмбриональный), включающий развитие половых клеток (гаметогенез) и оплодотворение; зародышевый (эмбриональный), подразделяемый на дробление, гастрюляцию, органогенезы и становление функций тканей и органов; послезародышевый (постэмбриональный) – до наступления половой зрелости; взрослое состояние, включая период старения организма. Относительный характер разделения онтогенеза на отдельные периоды наглядно виден на следующих примерах: стадии гаметогенеза и оплодотворения часто объединяют под названием предзародышевого развития, а фазы дробления и гастрюляции относят к раннему эмбриогенезу. Действительно, гамета еще не является зародышем, но оплодотворенная яйцеклетка (зигота) – это уже новый, хотя и одноклеточный организм, начальная стадия собственно онтогенеза.

В онтогенезе позвоночных выделяют пять периодов: 1) эмбриональный (зародышевый); 2) личиночный; 3) метаморфоз; 4) ювенильный (период полового созревания); 5) период размножения. Указанные периоды достаточно четко обособлены друг от друга и повторяются в развитии всех групп позвоночных животных. Представляется возможным выделить еще один, весьма специфический, период – **старение**. Хотя, обычно, в естественных условиях многие особи до данного периода не доживают.

3.1. Эмбриональный период

Этот период охватывает этап онтогенеза от момента оплодотворения до выхода зародыша из яйцевых оболочек у яйцекладущих или до живорождения при внутриутробном развитии. Ю.С. Бочаров (1988г.) конечным этапом эмбриогенеза считает выход из яйцевых оболочек. Но тогда у плацентарных млекопитающих эмбриогенез завершается уже через несколько суток (единствен-

ная яйцевая оболочка растворяется перед имплантацией бластоцисты в слизистую матки). Логичнее считать завершением эмбриогенеза момент, с которого начинается жизнь особи во внешней среде. При этом организм, как правило, уже вполне сформирован, а в некоторых случаях (у рыб, амфибий, многих рептилий) способен к самостоятельному существованию.

Интересной адаптивной особенностью эмбрионального развития в онтогенезе ряда позвоночных является остановка развития на более или менее продолжительный срок, т.н. **диапауза**. Различают факультативные и облигатные (обязательные) диапаузы. Факультативные диапаузы вызываются действием определенного фактора, например лактации. Облигатные же диапаузы не связаны с внешними факторами и, вероятно, запрограммированы генетически.

Факультативные диапаузы в развитии сумчатых и некоторых грызунов вызваны тем, что оплодотворение и начало развития зародыша накладывается по времени на вскармливание самкой детенышей предыдущего помета. В связи с этим развитие зародыша останавливается до конца периода лактации (лактационные диапаузы).

Облигатные диапаузы описаны в развитии годовичных рыб из родов *Austrofundulus*, *Nothobranchius* и др., обитающих в пересыхающих водоемах Южной Америки и Африки. Так, в эмбриогенезе *Austrofundulus myersi* имеют место 2-3 диапаузы. Первая диапауза наступает после трех дней развития, на стадии гастрюляции и начала органогенезов. Вторая диапауза останавливает развитие зародыша в фазе интенсивно протекающих органогенезов. Она начинается после 12 суток развития и продолжается от 30 до 150 дней. Возможна и третья диапауза непосредственно перед вылуплением (Wourms, 1972 г.).

Адаптивное значение эмбриональных диапауз у *Austrofundulus myersi* связано с тем, что в Колумбии, где обитает данный вид, в течение одного года имеют место два сухих периода. Нерест происходит также дважды в году, перед началом сухого сезона. После нереста все рыбы в пересыхающих водоемах гибнут, и выживание популяции обеспечивается за счет яиц, сохраняющихся в состоянии диапаузы до сезона дождей.

Наличие облигатных пауз в эмбриогенезе некоторых плацентарных млекопитающих связано с тем, что периоды гона и рождения потомства происходят у них в наиболее оптимальные сезоны года. Так, у соболя (*Martes zibellina*) гон и оплодотворение происходит в июле. Зигота дробится до стадии бластоцисты и консервируется в этом состоянии на 7-7,5 месяцев, до марта следующего года, когда диапауза прекращается и происходит имплантация бластоцисты в матку.

Наличие диапаузы существенно удлиняет продолжительность беременности (у куньих, например, на 10-270 дней).

Вылупление из яйца или рождение происходит у разных видов на различных стадиях развития. Процесс вылупления или живорождения у гомойотермных животных сопряжен с переходом из среды, температура которой превышает 36°C, в среду, температура которой обычно намного (на 10-20 °C) ниже. При этом наблюдается довольно большой процент мертворожденных и гибнущих вскоре после рождения животных. В человеческих популяциях, даже

в развитых странах, гибнет около 3% новорожденных. Сразу после рождения, в пределах 1-2 минуты, за счет мышечной активности у млекопитающих устанавливается состояние гомойотермии (Аршавский, 1982), но с более низкой (на 4-5 °C) температурой тела, чем у взрослых животных. Однако температурный гомеостаз у новорожденных неустойчив.

Пониженная температура среды стимулирует рост организма, тогда как развитие в термоиндифферентных условиях ингибирует ростовые процессы.

Сразу после рождения кожные и слизистые покровы новорожденного заселяются естественной бактериальной флорой, сапрофитной для физиологически нормальных организмов и патогенной для животных с пониженным иммунитетом, что часто сопровождается их элиминацией естественным отбором.

Следующий возрастной период принято связывать с началом активного перемещения организма в пространстве, что относительно просто для водных и достаточно сложно для наземных форм из-за большей роли гравитации. Соответственно возрастает интенсивность энергозатрат, частота дыхания, сердечных сокращений и т.п.

Общеизвестно, что новорожденные животных разных видов значительно различаются между собой по степени морфофизиологической зрелости. У птиц принято различать «выводковые» и «птенцовые» виды. Детеныши крысы, мыши рождаются голыми и слепыми, а у многих копытных уже через несколько минут они встают на ноги и могут самостоятельно передвигаться.

У других видов, в частности, у иглокожих и некоторых земноводных зародыши выходят из оболочек очень рано, превращаясь в личинки. Основные процессы развития происходят у них в постзародышевый период.

3.2. Личиночный период

Данный период встречается в развитии многих беспозвоночных и некоторых позвоночных (миноги, большинство костистых рыб и амфибий), у которых запасы питательных веществ яйца недостаточны для завершения морфогенеза. «Наследство», доставшееся от матери в виде желтка, слишком мало и фактически полуэмбриону очень рано приходится самостоятельно выживать в этом сложном мире. Поэтому личинки уже после вылупления из яйцевых оболочек, не достигнув дефинитивной организации, способны к самостоятельному существованию. Хотя сразу после вылупления головастики, например, какое-то время остаются пассивными, так как их кишечник (желудка и даже ротового отверстия у них в этот период еще нет) заполнен остаточным желтком и им не нужно искать пищу. Наиболее существенная особенность личинки - это эмбриональный характер ее организации. Поэтому личинку иногда называют свободно живущим зародышем. У личинок очень рано дифференцируются временные (**провизорные**) органы, обеспечивающие их выживание.

Так как среда обитания и биология личинки часто отличается от среды обитания и биологии взрослых форм, то личиночные органы могут редуцироваться и отсутствовать у взрослых животных. Из-за различий в местообитании личинок и взрослых форм действующие на них факторы естественного отбора

также заметно различаются.

Биологическое значение личиночного периода в онтогенезе позвоночных довольно многообразно, но приоритетными являются такие функции, как **рост** и **расселение**. Прежде всего, будучи способной к активному питанию, личинка самостоятельно растет и завершает развитие до метаморфоза. Для сидячих, прикрепленных форм большое значение имеет расселительная функция личинок. Например, взрослый морской еж ведет практически неподвижный образ жизни, а его личинки, плютеусы, разносятся морскими течениями на значительные расстояния. Кроме того, способность личинок к активному перемещению повышает их адаптивные возможности. Личинка может в определенной степени выбирать более оптимальные условия жизнеобитания и т.д.

Вылупившиеся из яиц личинки поденок (гусеницы), специализированы для питания и растут несколько месяцев. Взрослые же формы (бабочки) приспособлены к полету и размножению и неспособны к питанию из-за отсутствия ротового аппарата, вследствие чего живут лишь один день, в течение которого они должны спариться и отложить яйца, прежде чем погибнуть.

Отличие личинки как "свободно живущего зародыша" от обычного зародыша состоит еще и в том, что морфогенетические процессы в ней замедлены. На протяжении месяцев или даже лет, личинки морфологически меняются очень незначительно, тогда как для зародыша характерны активные морфогенетические процессы.

У некоторых костистых рыб и амфибий личиночный период может быть очень коротким: его продолжительность у темных камбал (*Lipsette obscura*) - около двух месяцев; у обыкновенной чесночницы (*Pelobates fuscus*) - чуть больше 130 дней, у леопардовой лягушки (*Rana pipiens*) - 70-85 суток.

Чрезвычайно длительным личиночным периодом отличается европейский угорь (*Anguilla anguilla*) - 1,5-2 года. В течение личиночного периода он проплывает путь в 4000-7000 км из Саргассова моря в реки Европы. У одной из примитивных хвостатых амфибий - семиреченского лягушкозуба (*Ranodon sibiricus*) личинка превращается во взрослую форму только на третьем году личиночной жизни. У канадских хвостатых лягушек и у жабы-повитухи личиночное развитие нередко затягивается на три года. А личинка миноги (*Ammocoetes*) претерпевает метаморфоз на четвертый, или даже на пятый год жизни.

Большой интерес представляет собой явление **неотении**. При неотении происходит задержка развития на личиночной стадии с приобретением способности к половому размножению. Чаще всего, неотения встречается у тех видов животных, в онтогенезе которых происходит смена сред обитания, причем условия существования личинок оказываются более благоприятными и стабильными, чем у взрослых форм. Задержка онтогенеза на стадии неотенической личинки, обитающей в привычной и благоприятной среде, повышает шансы данной популяции к выживанию.

Различают **полную и частичную неотению**. При частичной неотении личинки длительное время растут и развиваются, не приступая к метаморфозу и не приобретая способности к размножению. При полной неотении органы

половой системы развиваются до уровня, характерного для взрослого организма, а другие системы органов сохраняют личиночное состояние. Неотения описана у некоторых червей, ракообразных, насекомых, а среди позвоночных - у земноводных. В качестве аквариумного животного хорошо известна личинка тигровой амбистомы (*Ambystoma tigrinum*) - аксолотль, способная к размножению. В мелких тёплых водоёмах онтогенез амбистом проходит с метаморфозом, в глубоких холодных - часто наблюдается неотения. Неполная неотения свойственна некоторым видам тритонов. Показано, что у аксолотля существует генетически обусловленная блокировка метаморфоза, при которой отсутствует либо гормон гипофиза, либо гормон щитовидной железы. У европейского протей возможна утрата чувствительности к гормонам эффекторов. Отсюда неотения у этих животных. Протей и сиреновые - неотенические личинки неизвестных саламандр, совершенно утратившие способность становятся взрослыми. Неотению следует отличать от педогенеза. При т.н. **педогенезе** новое поколение развивается из неоплодотворенных яиц личинок (партеногенетически). Педогенез описан у некоторых двукрылых насекомых, у жуков, у ветвистоусых ракообразных и трематод. Считается, что педогенез компенсирует недостаточно высокую плодовитость взрослых форм. Педогенетические поколения чередуются с обычными, дающими после метаморфоза взрослых самцов и самок.

3.3. Метаморфоз

Метаморфозом называется превращение личинки в ювенильную форму, сопровождаемое более или менее выраженными преобразованиями всей организации особи под воздействием специфических гормонов.

В ходе метаморфоза происходят такие важные морфогенетические перестройки, как разрушение провизорных личиночных органов; частичное разрушение и перестройка органов, функционирующих как в личиночном, так и во взрослом состоянии; новообразование **дефинитивных** (окончательных, свойственных взрослым формам) систем органов.

Таким образом, метаморфоз включает как процессы разрушения, редукции, так и формообразования, созидания. Если эти процессы носят постепенный характер, то метаморфоз называют **эволютивным**. Обычно такой тип метаморфоза встречается у видов, личинки которых, превращаясь в ювенильные формы, не меняют радикально условия обитания (так у личинок камбалы основные параметры среды сохраняются, лишь пелагический образ жизни меняется на придонный).

Метаморфоз называют **катастрофическим**, когда перестройка организации особи совершается чрезвычайно интенсивно, в короткие сроки.

В случаях, когда метаморфоз сопровождается особенно глубокими преобразованиями и дегенерацией органов, исчезновением целого ряда структур, например, у амфибий, говорят о **некробиотическом типе** превращения личинки. Некробиотический метаморфоз у асцидий сопровождается массовым разрушением личиночных образований и паузой в двигательной активности животного.

В качестве примера метаморфоза рассмотрим метаморфоз у амфибий, связанный с переходом водного организма к полностью или частично сухопут-

ному образу жизни. У хвостатых амфибий эти изменения включают резорбцию хвостового плавника, наружных жабр и изменения в строении кожи. Метаморфоз бесхвостых амфибий (лягушек и жаб) более значителен (изменения затрагивают практически каждый орган животного) (рис. 6). Регрессии подвергаются хвост головастика, наружные жаберы, жаберные дуги, роговые зубы; исчезает система боковой линии, укорачивается адаптированный к растительной пище кишечник. В то же время развиваются конечности, формируются органы воздушного дыхания (легкие и респираторно-моторный аппарат), слуха, зрения, преобразуются покровы, рот, челюсти, язык и кишечник, приспособленный к плотоядному питанию.

С метаморфозом связан целый ряд кардинальных биохимических изменений. Фотопигмент сетчатки глаза головастика **порфиросин** сменяется у лягушек **родопсином** - фотопигментом наземных и морских позвоночных; гемоглобин головастика замещается гемоглобином взрослого животного; синтезируются ферменты, необходимые для образования мочевины из двуокиси углерода и аммиака и т.д.

Все разнообразные морфофункциональные и биохимические изменения при метаморфозе вызываются секрецией щитовидной железой гормонов **тироксина** и, особенно, **трийодтиронина**. Головастики с удаленной щитовидной железой не проходят метаморфоз. Их антагонистом является выделяемый аденогипофизом гормон **пролактин**, который выполняет функцию личиночного гормона роста и ингибирует метаморфоз. В ходе метаморфоза возрастает концентрация тиреоидных гормонов, вызывая превращение головастика в лягушку и переход к сухопутному образу жизни у хвостатых амфибий. В онтогенезе хвостатых амфибий пролактин начинает превалировать над тироксином позже, вынуждая их во взрослом состоянии возвращаться в воду для выметывания половых продуктов. Таким образом, некоторые хвостатые амфибии претерпевают два метаморфоза: один стимулируется тироксином, другой - пролактином. Инъекциями данных гормонов можно искусственно регулировать характер метаморфоза. Кормление незрелых головастика озерной лягушки фаршем из щитовидной железы овцы или крупного рогатого скота ведет к ускорению метаморфоза и получению крошечных, размером с муху, лягушат.

Реакция разных органов и тканей на гормональные воздействия различна. Так, повышение уровня тиреоидных гормонов ведет к резорбции хвоста у головастика, что можно наглядно продемонстрировать, помещая хвосты в чашку с агар-агаром и добавляя в среду гормоны. При этом пролактин ингибирует регрессию хвоста, вызванную тиреоидными гормонами (Brown, Frye, 1969). Напротив, в печени под воздействием тиреоидных гормонов синтез белков в течение 4 часов возрастает почти в 100 раз (Cohen et al., 1978). Регрессия хвоста головастика начинается со снижения уровня биосинтеза белка в мышечных клетках хвоста, затем в них повышается содержание лизосомных ферментов. Увеличивается концентрация протеаз, РНКазы, ДНКазы, коллагеназы, фосфатазы, гликозидазы в эпидермисе, хорде и клетках нервного ствола. Они выходят в цитоплазму и обуславливают гибель клеток. Гибель клеток в области хвоста является генетически запрограммированной и сопровождается

накоплением макрофагов, переваривающих дебрис с помощью своих протеолитических ферментов (Kaltenbach et al., 1979). У человека примером подобной регрессии тканей является дегенерация хвоста на четвертой неделе эмбрионального развития и регрессия клеток между большим и указательным пальцами.

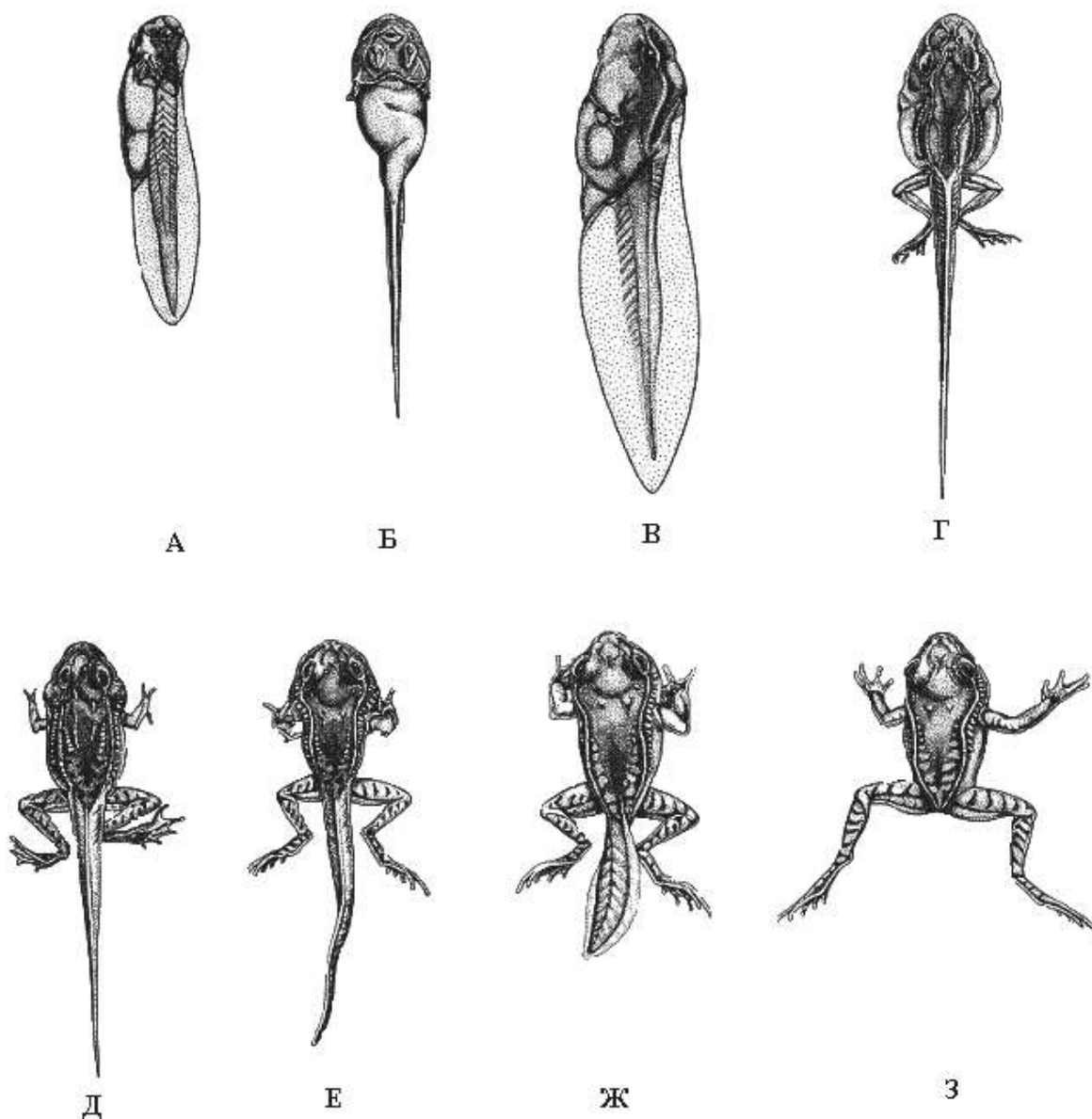


Рис.6 Развитие лягушки. А,Б,В,Г-личиночный период; Д,Е,Ж,З-метаморфоз.(из Witschi).

Необходимо подчеркнуть, что процессы дегенерации и развития различных тканей и органов во время метаморфоза четко скоординированы. Считается, что в основе этой координации лежат количественные различия между различными гормонами.

3.4. Ювенильный период

Ювенильный период соответствует возрасту от завершения метаморфоза до полового созревания. У животных с прямым развитием за начало ювенильного периода принимают вылупление из яйца или рождение. Отметим, что детеныши животных разных видов могут весьма значительно различаться между собой по степени зрелости в момент вылупления или рождения. Сумчатые млекопитающие, например, рождаются на предплодных стадиях, и их доношение происходит в складке кожи на брюхе матери. Напротив, у некоторых живородящих рыб из семейства Embiotocidae самцы становятся половозрелыми сразу после рождения, то есть, ювенильный период практически выпадает из онтогенеза.

В случаях морфофизиологической незрелости новорожденных некоторые авторы предлагают считать началом ювенильного периода момент раскрытия век (Шмидт, 1968 г.).

Морфологически ювенильный период характеризуется интенсивным ростом, в результате которого организм достигает размеров и пропорций взрослой особи, завершается формирование скелетно-мышечной системы, развитие половых желез и кожного покрова, у дифиодонтных животных молочные зубы сменяются постоянными, устанавливаются присущие взрослому животному эндокринные регуляции.

Продолжительность ювенильного периода значительно различается у разных видов. Так, у некоторых полевок самки достигают половозрелости в возрасте 13-18 дней. У наиболее позднеспелых позвоночных (белуга, калуга, крокодил, альбатрос, слон) половое созревание происходит между 18-22 годами.

Во время полового созревания в организме животного и человека последовательно появляются и совершенствуются взаимосвязанные первичные и вторичные половые признаки. Первичные половые признаки обусловлены генетически- обнаружено несколько генов, определяющих маскулинизацию или феминизацию эмбриональной прегонады (дифференцировку в семенники или яичники). Вторичные половые признаки в значительной мере обусловлены типом гонад и секретируемых ими половых гормонов, которые определяют тип полового тракта и наружных гениталий, а также характер парасексуальных признаков. Считается, что первичный пол программируется на генетическом уровне, а вторичный - в основном на гормональном. При половом созревании отмечается вспышка роста, происходят глубокие изменения в психике и поведении. Эти перестройки являются прямым или косвенным результатом созревания гипоталамо-гипофизарной гонадотропной системы, стимулирующей половые органы и секрецию половых стероидов.

Именно в этот период происходят значительные изменения формы тела, обуславливающие т.н. **половой диморфизм**. Например, в начале полового созревания мальчики и девочки характеризуются одинаковым соотношением мышечной массы, скелета и подкожного жира. К концу полового созревания масса скелета и мышц у юношей в 1,5 раза превосходит таковую у девушек,

тогда как у девушек накапливается почти в два раза больше жира.

Формирующиеся гонады того или иного типа посредством выделяемых ими гормонов создают основу для развития вторичных половых признаков — окончательно мужского или женского фенотипов. Эффекты половых гормонов начинают проявляться уже в эмбриогенезе, прежде всего в развитии гонад и других органов половой системы. У девушек, под влиянием эстрогена, выделяемого клетками яичника, развиваются молочные железы. У юношей под контролем тестостерона, вырабатываемого семенниками, созревают пенис и сами семенники. У обоих полов развитие волос на лобке и подмышками контролируется тестостероном, секретируемым семенниками у мужчин и надпочечниками у женщин. Отсюда понятно, что в организме и мужчин и женщин присутствуют одновременно и мужские и женские гормоны, но очевидно, что их соотношение различно у разных полов. Так у юношей наблюдается тестостерон-зависимая гипертрофия хрящей и мышц гортани, что делает голос более низким и грубым.

При этом основные события полового созревания приходятся на пубертатный период. У девушек первая менструация свидетельствует о новой интеграции половых циклов, обеспечивающих высвобождение развивающегося яйца из яичника. Юноши достигают половой зрелости, когда сперматоциты вступают в мейоз и формируется семявыносящий проток, по которому спермии перемещаются из семенников в уретру.

Гормональная основа полового созревания является очень сходной с гормональной основой метаморфоза. И у амфибий, и у насекомых метаморфоз начинается с гормональных изменений, индуцированных нейрогормонами мозга (РФ-ТТГ и ПТТГ соответственно). У человека половое созревание обоих полов инициируется **рилизинг-фактором лютеинизирующего гормона (РФ-ЛГ)**, секретируемого клетками гипоталамуса и поступающего в переднюю долю гипофиза. Под воздействием данного фактора в аденогипофизе выделяются два вида **гонадотропных** (воздействующих на гонады и мужчин и женщин, а у животных и самцов и самок) гормонов: **лютеинизирующий гормон (ЛГ)** и **фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)**. В результате этого гонады начинают вырабатывать половые гормоны: **тестостерон** (выделяется семенниками) и **эстроген** (выделяется яичниками). Указанные гормоны по-разному влияют на различные ткани-мишени, что и обуславливает разнообразные морфофункциональные и поведенческие трансформации в организме. Как и в случае метаморфоза, при половом созревании существует гормон, ингибирующий созревание. Им, возможно, является **мелатонин**.

Окончание ювенильного периода определяется наступлением половой зрелости и началом размножения. У многих позвоночных эти два процесса могут быть довольно сильно разнесены по времени. В частности, у многих копытных самцы на первом году половой зрелости не принимают участия в гоне, так как не готовы физически к связанным с этим нагрузкам.

3.5. Период размножения (зрелости)

Продолжительность и особенности этого периода целиком определяются биологией размножения вида. У большинства позвоночных животных период размножения начинается довольно рано, на первом-втором году жизни (у мышей, крыс, хомячков с 5-8 недельного возраста) и заканчивается со смертью. Время наступления половозрелости и возраст угасания половой активности значительно варьирует у разных видов и зависит от продолжительности жизни.

Обычно у большинства позвоночных продолжительность жизни связана с особенностями размножения, в отношении которых всех Vertebrata можно разделить на две группы: 1) размножающихся в течение жизни однократно; 2) размножающихся многократно. К первым относятся многие круглоротые и рыбы, например, ручьевая минога, европейский угорь, дальневосточные лососи. Представители этих видов, раз отнерестившись, погибают.

У многократно размножающихся видов большое значение имеет размер помета. Обычно, чем он больше, тем меньше продолжительность жизни вида.

Очень редко, в периоде размножения продолжается рост животных (рыб, рептилий, которые растут постоянно), но обычно идут лишь частные формообразовательные процессы (растут рога, клыки, грива и т.п.).

3.6. Старение

Сложные морфофункциональные и биохимические изменения в организме, наблюдаемые на различных этапах онтогенеза, как это твердо установлено, большей частью запрограммированы в геноме и зависят от эпигенетических факторов. Сложнее обстоит дело с последним периодом онтогенеза - старением. Является ли старение, сопровождающееся целым рядом характерных морфофункциональных изменений в организме и прогрессирующим ослаблением всех жизненных функций, также генетически жестко детерминированным? Для некоторых видов очевидно, что - да. В частности у бабочек поденок и лососей процесс старения ярко выражен, скоротечен и очень быстро приводит к смерти. У других видов, включая человека, старческие изменения постепенны и обусловлены как внешними, так и внутренними факторами. Существуют мутации, например при **прогерии** (синдроме Хатчинсона-Джилфорда), вызывающие преждевременное старение и смерть в детском или юношеском возрасте. Не случайно, что в одних и тех же условиях разные особи демонстрируют разную продолжительность жизни. Есть семьи, члены которых отличаются долгожительством, а есть семьи, члены которых живут в среднем 35-55 лет.

В последние годы проводятся интенсивные исследования по идентификации генов, обуславливающих различия в продолжительности жизни между долгожителями и обычными особями животных и человека. М. Роуз из Калифорнийского университета вывел линию дрозофил, живущих вдвое дольше, чем их сородичи. При этом у мушек данной линии обнаружена необычайно активная форма антиокислительного фермента супероксиддисмутазы, а, следо-

вательно, модифицирован и кодирующий его ген. Аналогичные результаты получены на ряде других беспозвоночных и позвоночных животных.

Вместе с тем, очевидно, что нельзя игнорировать роль средовых факторов. Весьма корректна поговорка: "укатали сивку крутые горки"! Неблагоприятные условия среды, действующие перманентно на протяжении длительного времени, чрезмерные физические и психоэмоциональные нагрузки могут вызывать преждевременный износ организма, старение и смерть. К настоящему времени описано множество возрастных психоэмоциональных и морфофизиологических изменений. Накоплен огромный фактический материал о возрастных изменениях во всех органах, тканях и клетках при старении, начиная с биохимических перестроек в молекулах коллагена и кончая снижением иммунного статуса. Установлено, что с годами аккумулируются нарушения в структуре ДНК, в клетках нарастает концентрация свободных радикалов кислорода (вызывающих повреждения мембран) и различных катаболитов. Нарушается синергизм гормонов и факторов роста, нарастают сбои в биосинтезе белка, снижается количество клеточных рецепторов и их чувствительность. Известно, что по мере старения многие клетки слабо реагируют на эндогенные и экзогенные стимуляторы клеточного деления. Вероятно, существует "ген, или гены, старения".

Следует при этом отметить, что в естественных условиях животные редко доживают до последнего периода, выделяемого в онтогенезе позвоночных, - периода старения. Адаптационные возможности у старого организма снижаются до такого уровня, что он не в состоянии сохранять высокую физическую активность, противостоять инфекционным и незаразным заболеваниям, добывать корм в условиях его дефицита и жесткой конкуренции, выдерживать неблагоприятные метеоусловия. Да и просто по теории вероятности животное, постоянно сталкивающееся с экстремальными ситуациями, не может жить долго. В результате, в дикой природе практически нет "стариков" и когда описывают «матерых, старых» особей волков, кабанов, медведей и т.д., то речь идет о животных примерно 28-38 летнего возраста по человеческим меркам!

Есть, конечно, и исключения. Так при особо благоприятных условиях в дикой природе могут длительное время существовать прекратившие размножение старые особи видов, находящихся на вершине пищевой пирамиды, или же практически не имеющие врагов. Вопреки широко распространенному мнению, относительно долго живут дикие животные в неволе (в зоопарках, зоосадах, вивариях). Так, например, по данным О.В. Башениной, большинство видов полевок живут в природе не более года, а в условиях вивария около 4-4,5 лет. Большой продолжительностью жизни, благодаря создаваемым человеком условиям содержания, характеризуются домашние и сельскохозяйственные животные.

Общеизвестно, что средняя продолжительность жизни человека неуклонно повышается и в наиболее развитых странах (Япония, Скандинавские страны) колеблется около 80 лет, при этом женщины живут в среднем на 5-10 лет больше мужчин. Однако максимальная продолжительность жизни, равная 120-122 годам, практически не меняется на протяжении периода, когда

подобные данные стали носить достаточно достоверный характер.

Вопросы для самоконтроля:

1. Основные стадии в онтогенезе позвоночных животных.
2. Периодизация онтогенеза позвоночных.
3. Общая характеристика эмбрионального периода.
4. Факультативные и облигатные диапаузы, их причины.
5. Особенности вылупления из яйца и живорождения у представителей разных таксонов.
6. Характерные черты личиночного периода.
7. Полная и частичная неотения. Педогенез.
8. Метаморфоз, типы метаморфоза.
9. Особенности метаморфоза у амфибий и его гормональный контроль.
10. Основные черты ювенильного периода. Изменения, связанные с половым созреванием.
11. Продолжительность и особенности периода размножения (зрелости).
12. Общая характеристика возрастных изменений в организме при его старении.

ГЛАВА ЧЕТВЕРТАЯ

ВЛИЯНИЕ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА ОНТОГЕНЕЗ

Стадии и периоды в онтогенезе позвоночных животных. Общая характеристика эмбрионального, личиночного, ювенильного периодов в индивидуальном развитии. Метаморфоз, его формы и гормональная регуляция. Особенности периодов размножения и старения.

Общепризнанно, что процесс формирования каждого фенотипа регулируется сложнейшими механизмами дифференциальной экспрессии генов, то есть, факторы развития находятся в самом зародыше. Резонно спросить, а какова здесь роль внешней среды и существует ли она? Возможно ли появление из одного и того же генотипа разных фенотипов? К настоящему времени накоплен огромный массив данных о том, что не существует жесткой детерминации между генотипом и фенотипом, и геном может реализовываться целым рядом фенотипов. Иначе говоря, развитие обладает определенной вариабельностью (так называемая фенотипическая пластичность).

Различают два варианта пластичности развития. В первом, под воздействием различных условий среды, возникает непрерывный спектр фенотипов. Так, например, при кормлении однотипных шестимесячных телят различными рационами можно через полгода получить различия в массе тела между ними в 5-100 килограммов. При этом данный спектр или норма реакции определяются особенностям генома. При одинаковом рационе кормления телята мясной герфордской породы будут расти гораздо быстрее, чем крупный рогатый скот африканских племен тутси.

Второй вариант пластичности развития – полифения, или дискретные фенотипы. В качестве примера можно назвать температурозависимую полифению бабочек *Araschinia levana*, вышедших из куколок в разные сезоны, которые различаются между собой окраской крыльев (К.Линней даже классифицировал их как два самостоятельных вида).

Какие же факторы среды обычно детерминируют развитие? Прежде всего это: температура, фотопериод, характер питания, плотность популяции, различные ксенобиотики, пресс хищников, конкуренция и т.д.

Другим примером температурозависимой полифении является определение пола у каймановой черепахи. В одних температурных условиях зародыш черепахи становится самцом, а в других – самкой. Классическим примером роли питания являются пчелы. При одном режиме питания женская личинка пчелы развивается в стерильную рабочую пчелу, при другом – дает чрезвычайно плодовитую матку.

Большой интерес представляют собой полифении, индуцированные хищником и конкуренцией. Так, например, если только что вылупившиеся головастики лесной лягушки *Rana sylvatica* содержатся в сосудах с хищными личинками стрекозы *Anax*, то вырастают головастики значительно меньших размеров, но

более подвижные, благодаря гипертрофированной мускулатуре хвоста (Van Buskirk, Relyea, 1998).

Чрезвычайно широкими нормами реакции обладает человек. Детерминирующими факторами среды при этом чаще всего выступает: питание, физические нагрузки, содержание в атмосфере кислорода, микрофлора, различные ксенобиотики и др.

Недостаток в организме детей активированного солнечным светом витамина Д ведет к рахиту. Дефицит витамина Д или кальция в пищевом рационе взрослых может вызвать остеопороз – болезнь, обусловленную как генетическими параметрами, так и образом жизни (Cymet et al., 2000). Активная форма витамина Д необходима для инициации транскрипции генов, белковые продукты которых регулируют адсорбцию кальция кишечником и уровень кальция и фосфата в костях.

Структура костной ткани и ее прочность определяются характером механической нагрузки: известно, что некоторые гены, обуславливающие функции остеобластов и остеоцитов, регулируются посредством физической нагрузки (Nomira, Takano-Yamamoto, 2000; Zaman et al., 2000). Соответствующие перестройки костей можно наблюдать у тяжелоатлетов и космонавтов при продолжительных полетах в невесомости. Исследования показали, что за месяц пребывания в космосе теряется около 1% минеральных солей пяточной кости и происходит резкое снижение активности нескольких генов, включая ген рецептора витамина Д (Hammond et al., 2000).

Важной частью фенотипа человека является мышечный и жировой компоненты тела. При этом вполне очевидна роль физических упражнений, анаболических препаратов и рациона питания в том, кем может стать достаточно скоро конкретный субъект – атлетом или толстяком.

Ярким примером влияния на человеческий фенотип рациона питания является цинга, вызываемая дефицитом витамина С (аскорбиновой кислоты). Болезнь развивается, если пища бедна или не содержит витамина С, так как у 100% людей в организме отсутствует гулонолактоксидаза – конечный фермент пути, ведущего к аскорбиновой кислоте. У человека гены этого фермента (в коротком плече хромосомы 8) мутировали (Nishikimi et al., 1994), в то время как остальные млекопитающие имеют этот фермент и могут самостоятельно синтезировать витамин С.

Становление иммунной системы человека идет под воздействием внешней среды. Выше упоминалась роль хищников в развитии головастиков. Главными, а часто смертельно опасными для человека «хищниками», являются микробы и вирусы. При инфицировании организма в иммунной системе происходит клональная селекция лимфоцитов, узнающих специфических возбудителей и их продукты. Соответственно резко возрастает количество именно тех лимфоцитов, которые могут защищать от них организм. Поэтому даже однояйцовые близнецы, ввиду того, что они инфицируются несколько различающейся микрофлорой, не идентичны по своим иммунным системам.

Можно сколь угодно много говорить о врожденных умственных способностях человека и животных, но и здесь роль обучения и самостоятельной рабо-

ты человека над собой трудно оспаривать. Срезовые факторы способны изменить структуру наших нейронов и синапсов (Tramontin, Benowitz, 2000).

Эмбриональное развитие является чрезвычайно сложным взаимодействием ростовых процессов, морфогенетических перемещений клеток и клеточных пластов, цитодифференцировки. Самые разнообразные факторы эндогенного и экзогенного происхождения способны вызывать патологические нарушения нормального развития зародыша. По данным медицинской статистики в промышленных странах около 90% плодов, абортинированных до месячного возраста, являются аномальными. Более половины зародышей не доживает до рождения, а около 5 % всех родившихся детей имеют более или менее выраженные уродства. В различных человеческих популяциях врожденные уродства составляют от 1,27 % до 15 % и их доля неуклонно растет.

Обычно врожденные аномалии вызываются т.н. тератогенами, которые вызывают уродства в течение определенных критических периодов. Критическим периодом для любого органа является время его закладки, роста и морфогенеза. Так как различные органы закладываются в разные сроки, то критические периоды развития у них отличаются. У человека для многих органов особенно опасно воздействие тератогенов между 15 и 60 сутками беременности.

Тератогенный эффект могут вызывать самые разнообразные агенты, включая, во-первых, такие физические факторы, как ионизирующая радиация и механические травмы, во-вторых, бактерии и, особенно, вирусы, а также тератогены химической природы.

Ионизирующая радиация вызывает разрыв хромосом и изменение структуры ДНК, а, следовательно, мутации. Существует также целый класс химических мутагенов.

Примером врожденных уродств является синдром Робертса (аутосомная рецессивная болезнь, при которой у новорожденного редуцированы конечности, расщепленно небо и имеет место сильное отставание в умственном развитии), вызванный мутацией лишь одного гена. Общеизвестный синдром Дауна обусловлен наличием лишней хромосомы в 21-й паре.

Набор генов, управляющий формообразованием тела животного называется **гомеобоксом** (термин лауреатов Нобелевской премии за 1995 год Э.Льюиса и Э.Вейсхауза). Достаточно небольшой мутации генов гомеобокса, чтобы вызывать аномалии в строении организма. Так, мутация гена «Lim» приводит к развитию мышат без головы. Особое место среди тератогенов занимают химические вещества, в том числе лекарства и природные соединения. Например, получаемые из растений хинин (противомалярийный препарат) и алкоголь вызывают врожденные уродства. Хинин – глухоту, а алкоголь (при употреблении более 70 г в сутки) – отставание в умственном и физическом развитии.

Выпущенный в начале 60-х годов в ФРГ слабый транквилизатор **талидомид**, часто прописываемый в качестве снотворного и успокоительного средства беременным женщинам, явился причиной рождения более 12 тысяч уродов с пороками развития сердца, кишечника, отсутствием ушных раковин.

Наиболее заметной аномалией при этом была **фокомелия** (рис.7), которая выражалась либо в редукции (меромелия), либо в полном отсутствии (амелия) длинных костей конечностей.

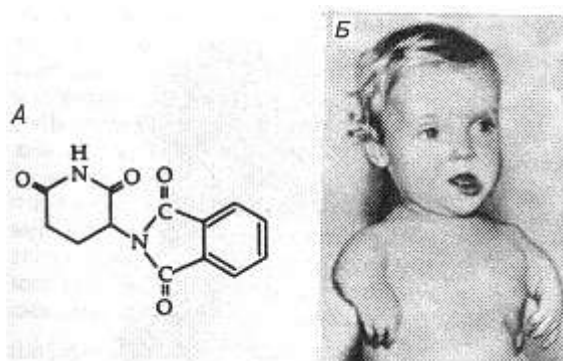


Рис 7. Структура талидомида и его тератогенный эффект.

А. Химическая структура талидомида

Б. Фокомелия у новорожденного младенца, мать которого принимала талидомид

Иногда, достаточно было всего одной таблетки, чтобы родился ребенок с укороченными руками и ногами (Lenz, 1966). Новак (Nowack, 1965) обнаружил, что транквилизатор оказывает тератогенное действие примерно в сроки от 20 до 36 суток после зачатия. Среди вызываемых им аномалий, помимо фокомелии, отмечены: отсутствие или деформация ушей, деформация больших пальцев, смещение бедра, пороки сердца и легких. В Бразилии, где медицина не так развита, как в индустриальных странах, из-за нехватки других средств талидомид и сегодня применяют для борьбы с некоторыми заболеваниями. Но побочным эффектом при этом является появление новорожденных с пороками развития.

Интересно отметить, что при лабораторном тестировании на мышах и крысах, в том числе беременных, талидомид не проявил побочных эффектов. Лишь после разразившегося скандала были проведены дополнительные исследования на беременных мартышках. При этом талидомид вызвал уродства, идентичные таковым у детей. Отсюда понятно значение корректного выбора вида животного при моделировании тех или иных воздействий. Считается (McBride, Vardy, 1983), что тератогенное действие талидомида обусловлено разрушением части ацетилхолинэргических нейронов спинальных ганглиев, связанных с развитием конечностей.

Благодаря достижениям науки в мире ежегодно возникают сотни новых химических соединений. Несомненно, что часть из них обладает тератогенным эффектом. Среди них можно упомянуть антираковое средство **циклофосфамид**, вызывающий дефекты нервной системы и **диоксин**, поражающий сперматозоиды. Особенно широкие масштабы по негативным последствиям на онтогенез животных в природных популяциях приобрели в последние десятилетия соли тяжелых металлов и пестициды.

Нарастающие темпы использования новых синтетических материалов в практике и продолжающееся загрязнение окружающей среды ведут к росту врожденных уродств и аномалий. Так, например, в 1992 году в России было зарегистрировано 24 702 случая врожденных уродств, а в 2002 году уже 29 276.

Отдельную группу тератогенов составляют вирусы и бактерии. Так вирус

краснухи (немецкой кори), поражающий женщин на первой трети беременности, может вызвать пороки развития или даже гибель плода. Тератогенными являются также **цитомегаловирус** и вирус простого **герпеса**.

Среди микроорганизмов тератогенным действием характеризуются возбудители **таксоплезмоза** и **сифилиса**.

Резюмируя вышесказанное, следует особо подчеркнуть, что результатом формообразования является конкретный фенотип. Его особенности в основном определяются генотипом, но также зависят и от воздействия внешних условий. Иначе говоря, формирование фенотипа регулируется дифференциальной экспрессией генов в ходе развития, но не все регуляторы экспрессии генов находятся в самом зародыше. Факторы окружающей среды, такие как температура, фотопериод, пищевой рацион, плотность популяции или присутствие хищника, воздействие вредных химических веществ могут стать причиной возникновения специфического фенотипа, предположительно, в результате изменения паттернов генной экспрессии.

Вопросы для самопроверки:

1. Роль дифференциальной активности генов в формировании конкретного фенотипа.
2. Два варианта пластичности развития.
3. Факторы среды, влияющие на фенотипические особенности.
4. Критические периоды в развитии и тератогенез.
5. Тератогены, их классификация.
6. Понятие о генах гомеобокса.

ГЛАВА ПЯТАЯ

ПРЕДЗАРОДЫШЕВОЕ РАЗВИТИЕ – ГАМЕТОГЕНЕЗ

Морфология и физиология гамет. Половые и соматические клетки. Строение семенников. Сперматогенез, его стадии. Мейоз. Морфология и физиология сперматозоидов. Микроструктура акросомного аппарата, шейки и хвоста спермия. Механизм движения жгутика спермия. Оогенез, его стадии, типы питания яйцеклеток - солитарный, алиментарный (нутриментарный и фолликулярный). Мейоз, профазы мейоза, цитологические и биохимические перестройки при мейозе. Биохимия оогенеза: синтез и накопление р-РНК и т-РНК; транскрипция структурных генов в оогенезе и рРНК; амплификация ДНК и образование сверхчисленных ядрышек; источники РНК и белка при разных типах оогенеза. Вителлогенез. Стадия созревания. Яйцеклетка, ее строение и свойства. Яйцевые оболочки. Классификация яиц по количеству желтка и его распределению в цитоплазме. Современные представления о формировании первичных половых клеток (гоноцитов) в онтогенезе.

Все клетки многоклеточного организма, строго говоря, являются клоном, так как они, несмотря на фенотипические различия генетически однородны и происходят из одной клетки - зиготы. У высших Metazoa от 100 до 250 разновидностей дифференцированных клеток сгруппированы в разнообразные тканевые системы (нервную, мышечную, эпителиальную и т.д.), которые в совокупности составляют соматический отдел тела - **сому**. Сюда же относятся клетки и ткани половых органов, за исключением собственно половых клеток (зрелых и дифференцирующихся), образующих герменативный отдел тела - **герму**. Именно половые клетки обеспечивают онтогенез будущих генераций и, в принципе, как это подтверждается явлением партеногенеза, из единственной половой клетки (яйцеклетки) может развиваться целый организм (**тотипотентность гамет**). Зрелые и дифференцирующиеся гаметы образуют **зародышевую плазму** данного индивидуума, а все остальные клетки и неклеточное вещество - **соматоплазму**.

Вопрос о происхождении зародышевой плазмы и ее связи с соматоплазмой ставился очень давно и решался неоднозначно.

Еще Ч.Дарвин в своей знаменитой гипотезе **пангенезиса** (1869г.) предположил, что свойство половых клеток обладать всеми факторами, необходимыми для развития целого организма, объясняется тем, что факторы ("геммулы"), определяющие будущие признаки, стекаются в половые клетки из всех частей взрослой особи.

В 1884 году ботаник К. Негели выдвинул идею "идиоплазмы" - гипотетической субстанции, определяющей наследственные потенции. Вскоре, благодаря прогрессу в изучении клетки, материальным носителем идиоплазмы стал рассматриваться хроматин ядра. В наиболее законченной форме эти взгляды были сформулированы в работах О. Гертвига, Э. Страсбургера, Г. де Фриза и А. Вейсмана. В 1880 году М. Нюссбаум обнаружил экстрагонадное образование половых клеток у рыб и амфибий. Это подтолкнуло его к мысли о

существовании непрерывной преемственности между половыми клетками в ряду поколений. Наиболее законченную форму эта идея получила в теории "зародышевой плазмы" Августа Вейсмана (1834-1914гг.), основные положения которой можно сформулировать в следующем виде:

1) зародышевая плазма, определяющая все признаки будущего организма, сосредоточена в материале ядра половых клеток;

2) зародышевая плазма состоит из **идов**, формирующих видимые в микроскоп структуры - **иданты**. По Вейсману им соответствуют хромосомы. Иды дискретны и состоят из более мелких единиц - **детерминантов**. Последние определяют (детерминируют) количество и характер наследственных признаков. Детерминанты, в свою очередь, состоят из групп органических молекул - **биофоров**, имеющих в разных детерминантах различный химический состав;

3) исходя из критерия полной или частичной передачи всего набора детерминант дочерним клеткам в процессе развития, различаются равно- и неравнонаследственные деления клеток зародыша. Серии равно- и неравнонаследственных делений в развивающемся зародыше периодически чередуются. Первые деления дробления обычно равнонаследственны (отсюда объяснение экспериментов Г. Дриша по развитию в полноценный организм разделенных бластомеров);

4) в результате «неравнонаследственных» делений исходный набор наследственных факторов-детерминантов постепенно расходится между всё возрастающим количеством клеток зародыша так что, в конечном счете, каждая соматическая клетка взрослой особи несет лишь одну детерминанту, определяющую ее специфику;

5) существуют две несмешивающиеся линии в онтогенезе живых организмов: «**бессмертной зародышевой плазмы**», клетки которой остаются неизмененными в течение всей жизни и передаются из поколения в поколение и «**телесной плазмы**», узкоспециализированные клетки которой стареют и умирают;

6) многоклеточность связана с разделением функций между клетками, дифференциация которых обусловлена выходом в цитоплазму определенных биофоров;

7) Protozoa и половые клетки Metazoa при делении получают всю зародышевую плазму и поэтому потенциально бессмертны.

До настоящего времени существуют разные точки зрения на научное наследие А. Вейсмана, но никто не может отрицать того факта, что некоторые положения теории непрерывности зародышевой плазмы, будучи умозрительными, тем не менее, предвосхитили многие понятия современной генетики. В частности, можно упомянуть идею о дискретном характере наследственной субстанции; идею о ненаследственном характере изменений, возникающих в соматических клетках, мысль о том, что наследуемы лишь изменения зародышевой плазмы; идею о рекомбинации хромосомного материала при редукционном делении и др.

Основной ошибкой теории Вейсмана явилось чрезмерное преувеличение феномена зародышевой плазмы, ее, якобы, особого происхождения, объема

содержащейся наследственной информации и т.п. Совершенно неверным оказалось представление о неравнонаследственном распределении детерминантов между клетками сомы в ходе эмбриогенеза.

Гипотезы "идиоплазмы" К. Негели и "зародышевой плазмы" А. Вейсмана предполагают свой, обособленный путь развития в онтогенезе половых клеток, их раннее отделение от будущих соматических клеток. В действительности, можно наблюдать разные варианты обособления линий половых и соматических клеток в ряду современных Metazoa.

1. а) У некоторых видов насекомых (*Miastor americana*), круглых червей (лошадиная аскарида), щетинкочелюстных, бесхвостных амфибий материал половой плазмы со скоплениями т.н. "**эктосом**" идентифицируются еще в яйце. Первичные половые клетки (ППК) - **гоноциты** обособляются от соматических уже на ранних стадиях дробления.

б) У большинства позвоночных гоноциты обособляются несколько позднее, обычно на стадии гастрюлы или нейрулы.

2. У большинства аннелид, моллюсков, иглокожих, кишечнодышащих, оболочников и бесчерепных имеет место сравнительно позднее обособление первичных половых клеток.

3. У некоторых полихет и олигохет сравнительно раннее обособление половых клеток не исключает возможность их образования из телесных, соматических.

4. В онтогенезе у губок, кишечнополостных, турбеллярий обособления гоноцитов не происходит и они постоянно образуются из различных соматических клеток (у губок из амебоцитов и хоаноцитов; у кишечнополостных и турбеллярий из малодифференцированных **необластов** и интерстициальных клеток - "**i-клеток**").

Удаление гонад у представителей этих групп животных не приводит к их стерильности. Говорить о непрерывности зародышевой плазмы в данном случае, естественно, не приходится.

Общим местом для всех вышеописанных вариантов является то, что первичные половые клетки обладают тотипотентностью. Причем в подавляющем числе случаев гоноциты обособляются довольно рано и лишь однажды.

Сперматогенез

Сперматогенезом называют развитие диплоидных малодифференцированных половых клеток - сперматогониев в высокодифференцированные гаплоидные зрелые сперматозоиды. Сперматозоиды отличаются от яйцеклеток гораздо меньшими размерами, многочисленностью и подвижностью. Сперматогенез происходит в тесной связи с вспомогательными клетками соматического происхождения (клетками фолликулярного эпителия) в разнообразных по морфологии половых органах - **семенниках**. Различают четыре типа семенников позвоночных, при этом семенники амниот относят к канальцевому типу

(рис.8). В процессе сперматогенеза, который протекает довольно сходно у представителей всех классов позвоночных, выделяют четыре основные стадии: 1) размножение (многократное деление митозом диплоидных сперматогониев), 2) рост (прелептотенных сперматоцитов), деления созревания (мейоз), спермиогенез (или формирование из сперматид сперматозоидов).

Однако, поскольку в ходе сперматогенеза рост половых клеток выражен очень слабо и не связан, как в овогенезе, с массивным накоплением трофических веществ, второй этап (роста) часто принято объединять с третьим (созревания) в один мейотический этап. Поэтому в зарубежной западной литературе принято выделять три фазы (этапа) сперматогенеза: 1) сперматоцитогенеза; 2) мейотическая; 3) спермиогенеза.

Характеризуя сперматогенезы у представителей разных видов млекопитающих, необходимо отметить, что больше всего сходства наблюдается в мейотической фазе, а различий - в фазе спермиогенеза.

Среди видовых особенностей сперматогенезов можно выделить следующие общие моменты:

1) развитие спермиев происходит либо в семенных фолликулах, либо в семенных каналах (рис. 9), причем сперматогонии располагаются по периферии, а в ходе развития смещаются к центру, в просвет канала. Поэтому каждый клеточный тип занимает определенное место в стенке семенного канала;

2) сперматозоиды развиваются в виде клона синцитиально и функционально связанных клеток;

3) в процессе сперматогенеза активно участвуют вспомогательные соматические клетки Сертоли (клетки эпителия семенных канальцев, обеспечивающие трофические, защитные и опорные функции).

Кроме того клетки Сертоли играют важную роль в поддержании межканальцевой среды и регуляции сперматогенеза посредством паракринного взаимодействия с зародышевыми клетками. Показана их способность синтезировать андрогенсвязывающий белок, который транспортирует тестостерон к сперматидам. Тестостерон вырабатывается другим видом соматических клеток - клетками Лейдига, находящимися в межканальцевом пространстве. В фазе размножения сперматогонии локализуются в стенке извитого семенного канала на периферии около базальной мембраны. Они представляют собой стволовые и полустволовые клетки. У человека выделяют три типа клеток: 1) тип А темные (A1), или Ad (dark -темные); 2) тип А светлые (A2), или Ap (pale-светлые); 3) тип В. Считается, что сперматогонии А темные - это резервные, истинно стволовые клетки, имеют очень продолжительный клеточный цикл, редко вступают в митоз. Эти клетки отличаются от ППК меньшими размерами и овальным ядром. Сперматогонии А светлые (A2)- полустволовые клетки, которые проходят следующие друг за другом короткие клеточные циклы, давая начало сперматогониям типа А3, которые, в свою очередь, дают начало сперматогониям типа А4, а эти последние - промежуточным сперматогониям. При делении промежуточных сперматогониев образуются сперматогонии типа В.

Сперматогонии типа В также митотически делятся, но при этом полно-

стью не расходятся, оставаясь связанными цитоплазматическими мостиками диаметром около 1 мкм (незавершенный цитокинез) вплоть до стадии поздних сперматид (рис. 9). Так начинается формирование клона клеток, родоначальницей которого является светлый сперматогоний типа А. Синхронизация созревания обеспечивается тем, что все клетки клона связаны мостиками, через которые легко проходят ионы и молекулы. Митотические деления сперматогониев типа В приводят к образованию **сперматоцитов 1-го порядка**, которые вступают в мейоз.

На половые клетки в фазе размножения воздействует ряд эндокринных и паракринных факторов. Пролиферация сперматогоний и их дифференцировка в первичные сперматоциты стимулируется **фоллитропином**. Его влияние опосредовано суспендоцитами. Кроме того, действие фоллитропина предотвращает гибель сперматогоний путем апоптоза. Еще один фактор, вырабатываемый клетками Лейдига и Сертоли, - цитокин интерлейкин-1- стимулирует синтез ДНК сперматогониями типа В и является фактором роста.

В стадии размножения образовавшиеся из гоноцитов первичные сперматогонии (А) несколько раз (чаще 3-8, иногда до 14 раз) митотически делятся; число делений видоспецифично, в результате чего возрастает количество клеток и постепенно уменьшаются их размеры.

Характерной особенностью гамет является гаплоидный набор хромосом, который достигается в результате особого способа деления клеток - **мейоза**, в результате которого происходит редукция числа хромосом. Вступающие в мейоз сперматоциты 1-го типа содержат удвоенное по сравнению с нормальным количество ДНК. При этом каждая хромосома состоит из двух сестринских хроматид, связанных общей центромерой. Следует подчеркнуть, что каждая хроматида является по сути дела одиночной хромосомой (S-хромосомой), в отличие от удвоенной в синтетическом периоде интерфазы d-хромосомы. Ядро соматической клетки человека содержит 46 S-хромосом и является диплоидным. Мейоз состоит из двух клеточных делений. При первом делении образуются два сперматоцита 2-го порядка, содержащие гаплоидный набор D-хромосом. При втором делении из каждого сперматоцита 2-го порядка образуются две сперматиды с гаплоидным набором S-хромосом. Профаза первого деления мейоза является решающей, поскольку именно в ней происходит генетическая рекомбинация. Она отличается большой продолжительностью, в ней различают пять стадий. На первой стадии - **лептотены** (стадии тонких нитей) хромосомы имеют вид тонких нитей. На второй стадии - **зиготены** (стадии сопряженных нитей) происходит спаривание (**синапсис**) гомологичных хромосом с помощью особой белковой ленты - **синаптонемального комплекса** в так называемые биваленты или тетрады (две D- хромосомы или четыре S- хромосомы соответственно).

На стадии **пахитены** (стадии толстых нитей) хромосомы укорачиваются и утолщаются, в них различимы отдельные S-хромосомы и картины - **кроссинговера** (перекреста хромосом). Считается, что в пахитене хромосомы частично деспирализуются, и в этих участках происходит синтез м РНК.

На стадии **диplotены** (стадии двойных нитей) синаптонемальный ком-

плекс деградирует, происходит раскручивание и расхождение гомологичных хромосом, которые некоторое время остаются спаренными лишь в нескольких точках перекреста - **хиазмах**. Именно в хиазмах отцовские и материнские хромосомы разрываются и вновь соединяются, обмениваясь участками. Данный процесс приводит к образованию новых комбинаций аллелей разных генов, обеспечивая комбинативную изменчивость в популяциях. У большинства организмов в диплотене продолжается процесс спирализации хромосом и редукции числа ядрышек, но в полилецитальных (богатых желтком) ооцитах рыб, амфибий, птиц, первозверей, а также в сперматоцитах некоторых насекомых хромосомы, напротив, деспирализуются и приобретают вид "ламповых щеток", что сопровождается активацией синтеза РНК и белка. В целом для стадии диплотены характерен высокий уровень транскрипции генов. Это наиболее продолжительная стадия профазы I.

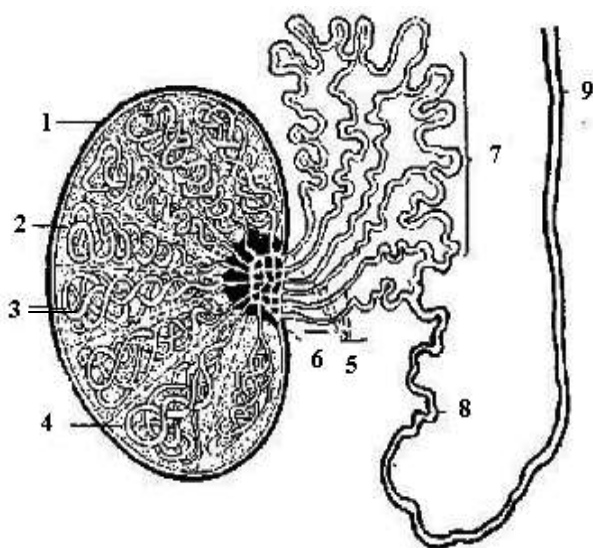


Рис. 8. Схема мужской половой железы человека. 1 - белковая оболочка, 2 - долька семенной железы, 3 - извитой семенной каналец, 4 - перегородка семенной железы, 5 - средостение семенной железы с сетью яичка (Геллери), 6 - отводящие канальцы, 7 - головка придатка и проток придатка, 8 - проток придатка, 9 - семявыносящий проток.

Во время следующей, завершающей стадии мейотической профазы - **диакинеза** (стадии двойных нитей) происходит дальнейшая спирализация и укорачивание хромосом, хиазмы прогрессивно смещаются к концам хромосом (терминализация хиазм). Одновременно исчезает ядрышко, разрушается ядерная оболочка, хромосомы перемещаются к метафазной пластинке и становятся различимым аппарат веретена.

У некоторых видов животных, в основном беспозвоночных, и, очень редко, у позвоночных, в диакинезе процесс мейоза может останавливаться (блок мейоза).

Метафаза I. К началу метафазы I ядерная оболочка фрагментируется и исчезает, формируется веретено деления, тетрады выстраиваются вдоль метафазной пластинки таким образом, что одна из гомологичных хромосом оказывается по одну сторону экватора, а другая - по другую (рис.10). При этом распределение отцовских и материнских хромосом носит случайный характер и лежит в основе второго закона Менделя.

Анафаза I. На этой стадии гомологичные хромосомы бивалентов начи-

нают расходиться к противоположным полюсам веретена, разрываясь в местах перекреста. Сестринские хроматиды каждой хромосомы при этом не разъединяются, удерживаясь при помощи центромеров. Именно то, что в анафазе первого деления мейоза расходятся две случайные комбинации гомологичных **хромосом**, обуславливает **генетическую** разнокачественность дочерних клеток. Набор хромосом становится гаплоидным. Напомним, что во время обычного митоза к каждому полюсу митотического веретена отходит по одной из каждой пары сестринских **хроматид или S-хромосом**, а не D-хромосом, как выше, что определяет полную генетическую идентичность дочерних клеток. Хромосомный набор остается диплоидным.

Телофаза I и интерфаза. На этой стадии вокруг каждого из обособившихся ядер формируется ядерная оболочка, внутри которой содержится гаплоидный набор хромосом (1п, 2с). Ввиду того, что сестринские хроматиды в интерфазе не разъединяются, синтеза ДНК не происходит, и общее число хроматид не меняется, как это имеет место в S-периоде интерфазы митотического цикла соматических клеток. В результате первого мейотического деления образуются два сперматоцита II-го порядка.

Второе деление мейоза в целом идет по схеме обычного митотического деления с той лишь разницей, что делится гаплоидная клетка. После атипичной профазы II формируется веретено деления, затем в метафазе II хромосомы выстраиваются по экваториальной пластинке, затем центромеры, соединяющие сестринские хроматиды, делятся и в анафазе II хроматиды расходятся к полюсам веретена. В телофазе II формируются дочерние ядра и происходит цитотомия, завершая процесс мейоза, в результате которого исходная половая клетка (сперматоцит 1-го порядка) делится на четыре округлые безжгутиковые гаплоидные клетки (1п, 1с) - **сперматиды**, все еще связанные между собой цитоплазматическими мостиками.

Следует обратить внимание на то, что у человека первое деление мейоза занимает несколько недель, а второе - около 8 часов. Поэтому на гистологическом препарате семенника видно очень много сперматоцитов первого и мало сперматоцитов второго порядка. В сперматогенезе из всех четырех гаплоидных клеток в дальнейшем образуются гаметы, а в оогенезе из-за ассиметричной цитотомии лишь одна клетка дает полноценное яйцо, а три другие клетки с редуцированной цитоплазмой превращаются в редуccionные тельца без определенных функций.

Полиплоидия. В очень редких случаях животные организмы развиваются из полиплоидных зигот. В основе полиплоидности зигот могут лежать разные причины, в том числе, связанные с нарушениями мейоза. Например, триплоидность у некоторых особей амфибий может возникать из-за того, что созревающая яйцеклетка почему-либо не претерпевает редуccionного деления и остается диплоидной. При ее оплодотворении нормальным гаплоидным спермием возникает триплоидный зародыш. Нарушения мейоза, в частности, возникают при действии на яйца хвостатых амфибий экстремальных температур (от 0° до 3°С и выше 37°С). Реже, чем триплоидные особи, встречаются тетраплоиды, у которых число хромосом вчетверо больше гаплоидного. Обычно при

этом пропорционально увеличиваются размеры клеток, но уменьшается их число.

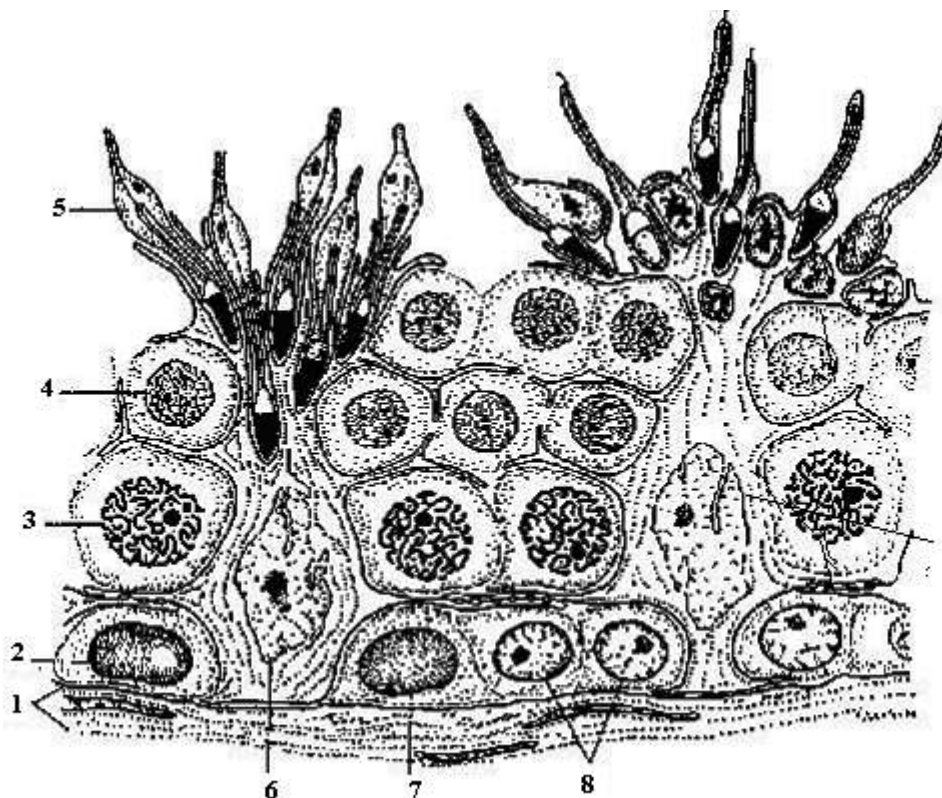


Рис. 9. Рисунок небольшого участка эпителия семенных канальцев, на котором показана связь между клетками Сертоли и развивающимися сперматозоидами (по Клермонту, 1977) 1 - ограничивающая мембрана, 2 - тёмная сперматиды типа А, 3 - сперматоциты в середине пахитены, 4 - сперматиды на ранних стадиях развития, 5 - сперматиды в конце развития, 6 - клетки Сертоли, 7 - бледный сперматогоний типа А, 8 - сперматогоний типа В.

Последний период сперматогенеза - **формирование** спермиев (**спермиогенез**). В начале спермиогенеза клетки все еще продолжают оставаться в составе синцитиального клона, и в них происходят глубокие изменения ядра и цитоплазмы. Геном перепаковывается, главным образом протаминами, что обеспечивает снижение объема полезного генетического груза, переходящего от относительно большой и громоздкой круглой сперматиды к обтекаемому и относительно небольшому по размерам спермию. Из-за активной дегидратации карриоплазмы и спирализации хроматина ядро уменьшается в размерах и занимает эксцентричное положение. Все синтетические процессы (ДНК, м РНК и др.) в нем подавляются.

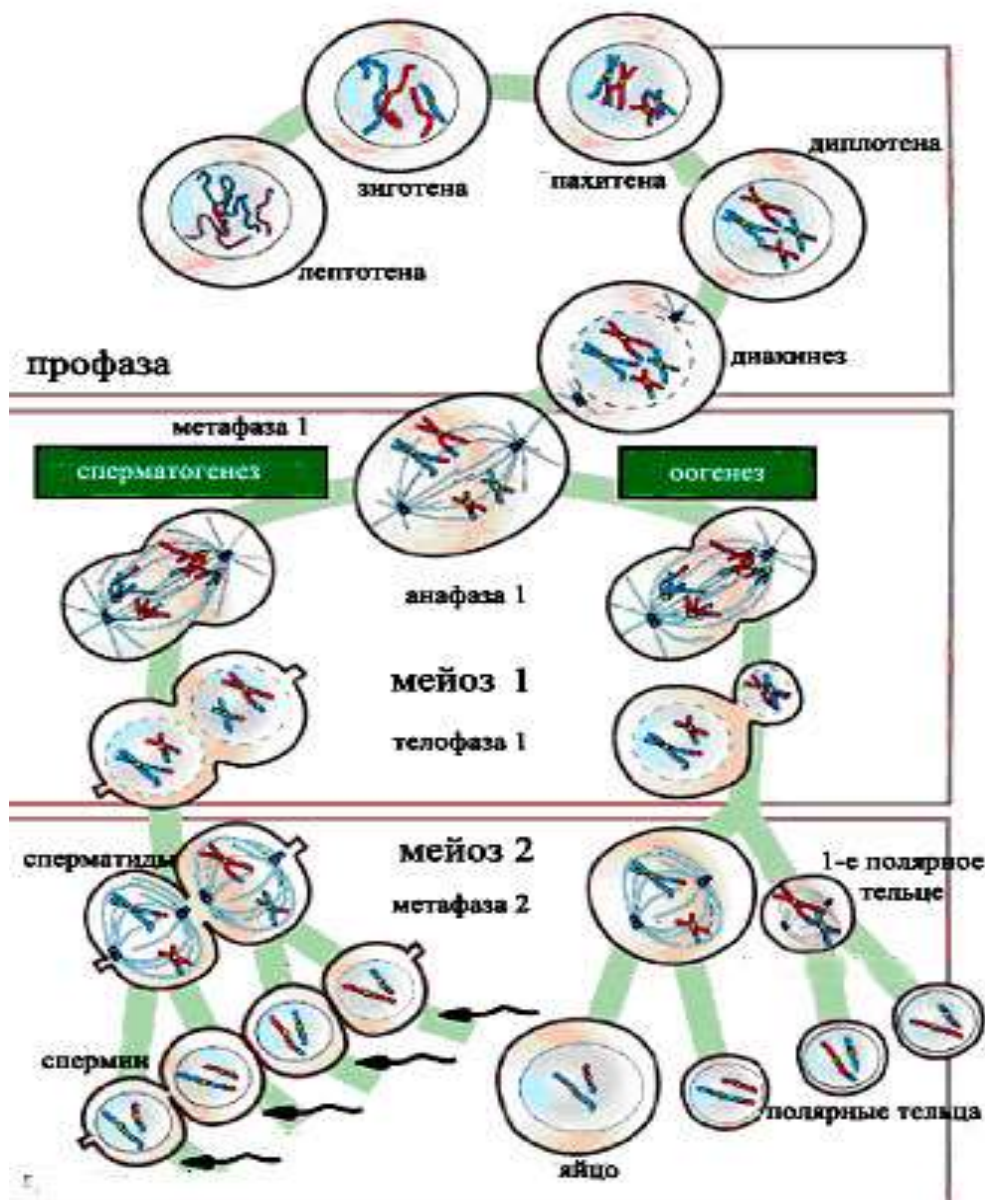


Рис.10. Схематическое изображение основных стадий мейоза в мужских и в женских половых клетках.

В цитоплазме более заметными становятся центриоли, которые образуют точку прикрепления для развивающегося хвоста. Основу хвостовой части составляет жгутик, состоящий из 9 пар периферических и одной центральной пары микротрубочек, образующих цилиндр. В состав жгутиков входят белки актиномиозинового типа и белок динеин. Цитоплазма смещается в сторону хвоста так, что вокруг ядра сохраняется лишь ее тонкий слой. Митохондрии в виде спиральной цепочки концентрируются в проксимальном отделе хвоста, которая затем превращается в среднюю часть сперматозоида (рис. 11). Часть цитоплазмы с аппаратом Гольджи перемещается на переднюю поверхность головки сперматозоида, формируя т.н. **акросомный аппарат**. Структура **акросомы** довольно однообразна у разных животных. Между акросомой и ядром различима зона плотного вещества - **периакросомное пространство**.

В процессе формирования акросомного аппарата, шейки хвостового отдела и в целом сперматозоида, большая часть (резидуальная) цитоплазмы от-

брасывается, и клетки освобождаются от синцитиальной связи. Физиологическая зрелость у сперматозоидов млекопитающих наступает обычно позже, в результате так называемой реакции капацитации в половых путях самки.

У мыши все развитие от стволовой клетки до сперматозоида длится 34,5 сут. Сперматогониальные стадии продолжаются 8 сут., мейоз-13 сут. и спермиогенез занимает еще около 13,5 суток. У человека развитие спермиев завершается через 74 сутки. Поскольку сперматогонии типа А1 являются стволовыми клетками, сперматогенез может продолжаться постоянно. Каждый час в семенниках мужчины образуется около 100 млн. спермиев, а при каждой овуляции выделяется около 200 млн. спермиев. Неиспользованные сперматозоиды либо резорбируются, либо выносятся из организма с мочой.

Сперматогенез обеспечивается вспомогательными соматическими клетками (рис. 8), создающими структуры разной сложности - от простых эпителиев, формирующих цисты, до очень сложных, связанных одновременно с различными генерациями развивающихся сперматоцитов. Эти клетки выстилают семенные фолликулы и каналы и имеют множество названий, среди которых наиболее часто употребляемы следующие: **клетки Сертоли** (Sertoli, 1865 г.) и **клетки фолликулярного эпителия** (Габаева, 1986 г.). Соответственно периодам развития сперматозоидов происходят циклические изменения фолликулярного эпителия, на их боковых и апикальной поверхностях появляются цитоплазматические отростки, охватывающие половые клетки. Изменяются ядра клеток Сертоли, в цитоплазме возрастает концентрация включений и гипертрофируются многие органоиды. Важнейшим признаком завершения дифференцировки фолликулярного эпителия является образование специфических плотных контактов между боковыми поверхностями клеток.

Зрелые **сперматозоиды** (открыты А. Левенгуком в 1677г. в сперме млекопитающих) делятся на жгутиковые и безжгутиковые. Типичные жгутиковые спермин характерны для всех позвоночных и большинства беспозвоночных. Обычно жгутик один, но встречаются исключения. Так, спермий десятиногого рака имеет три жгутика, а у реликтового термита *Mastotermes darwiniensis* - около 100 малоподвижных жгутиков. У некоторых беспозвоночных обнаружены бесжгутиковые спермии, способные к амебоидным движениям.

Длина спермиев обычно составляет от нескольких десятков до сотен микрометров, достигая у некоторых насекомых нескольких миллиметров.

В спермии различают: короткую (различной формы) головку с ядром и акросомой, короткую шейку, промежуточный (вставочный) отдел и нитевидный жгутик (рис.12). В свою очередь, в головке выделяют акросомальную и постакросомальную зоны. Хвост состоит из промежуточного, главного и концевого (дистального) отделов.

Акросома имеет вид шапочки, охватывающей переднюю часть ядра. Внутри нее заключена акросомная гранула, являющаяся высокоспециализированной лизосомой. Акросома вместе с примыкающим к ней периакросомным материалом составляет акросомный комплекс, который играет важную роль при проникновении спермия в яйцеклетку. В акросоме содержится группа ферментов, играющая важнейшую роль при оплодотворении: акрозин, пене-

траза, гиалуронидаза, кислая фосфатаза и др. Кроме того, акросома содержит белок **биндин**, который при оплодотворении способствует связыванию головки спермия с блестящей оболочкой ооцита.

В цитоплазме головки спермия элементы в виде плотных слоев филаментов образуют перинуклеарную капсулу цитоскелета, стабилизирующего структуру головки.

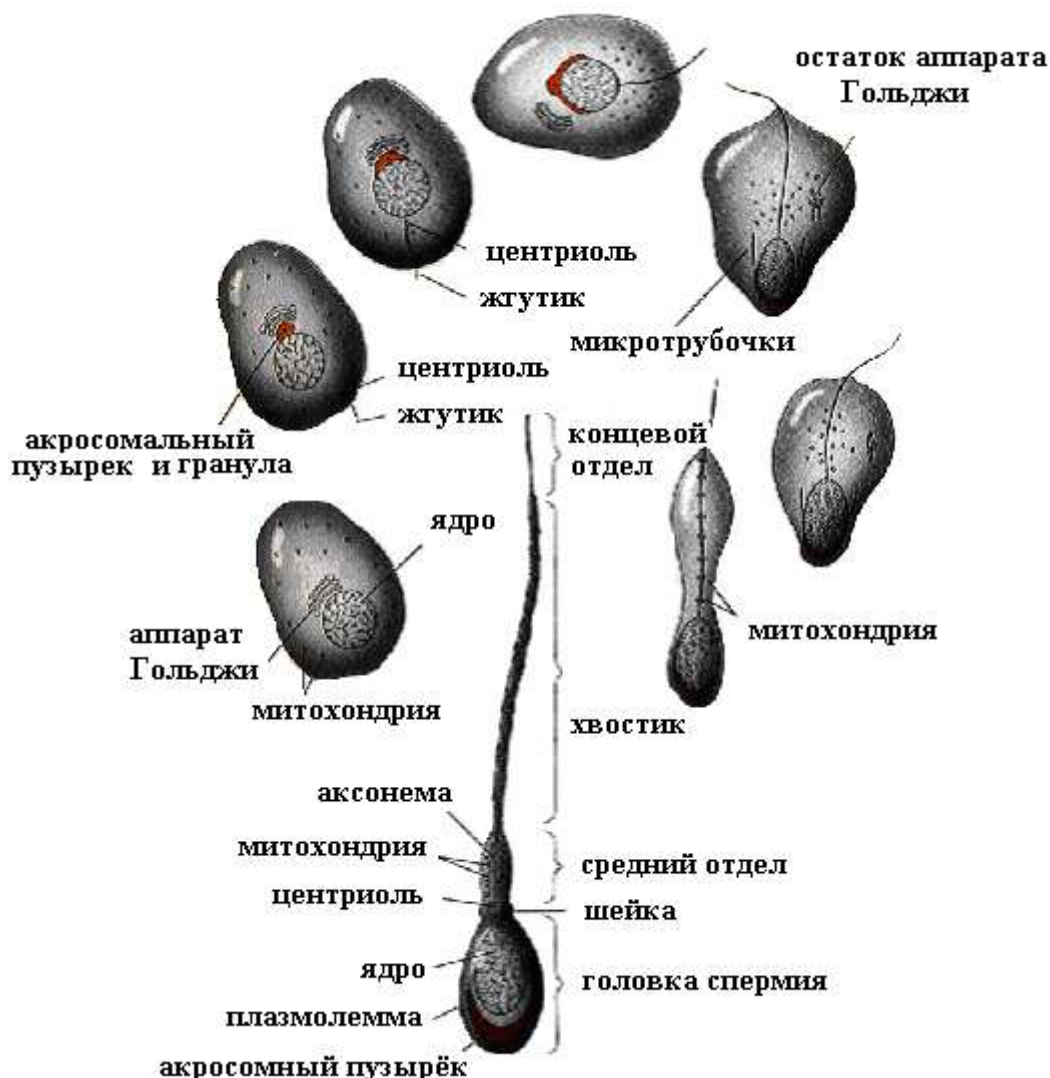


Рис. 11. Процесс формирования спермия из первичной половой клетки.

Центриоль дает длинный жгутик на будущем заднем конце спермия, а аппарат Гольджи образует акросомный пузырек на его переднем конце. Митохондрии собираются в среднем отделе. Остальная цитоплазма сбрасывается и ядро конденсируется (из Gilbert, 2000).

Ядро, занимающее большую часть головки, содержит гаплоидный набор хромосом. Хроматин ядра чрезвычайно упорядоченно спирализован и метаболически неактивен.

РНК в ядре отсутствует. К головке примыкает средняя часть с двумя, реже одной, центриолями. Одна центриоль лежит в углублении ядра, а вторая располагается каудальнее (ближе к хвосту), в основании жгутика. У некоторых видов в процессе формирования сперматозоида одна центриоль исчезает. У

большинства насекомых в ходе сперматогенеза дегенерируют обе центриоли. В среднем (промежуточном) отделе вокруг дистальной центриоли и начального отдела располагается в виде спирали цепочка митохондрий (4-10 и более), особенно длинная (до 300 витков) у грызунов. Митохондрии генерируют энергию для движения спермия, а также содержат необходимый для этого запас макромолекул.

Жгутики сперматозоидов имеют такое же строение, как жгутики и реснички Protozoa и Metazoa. Структурная организация этих органоидов

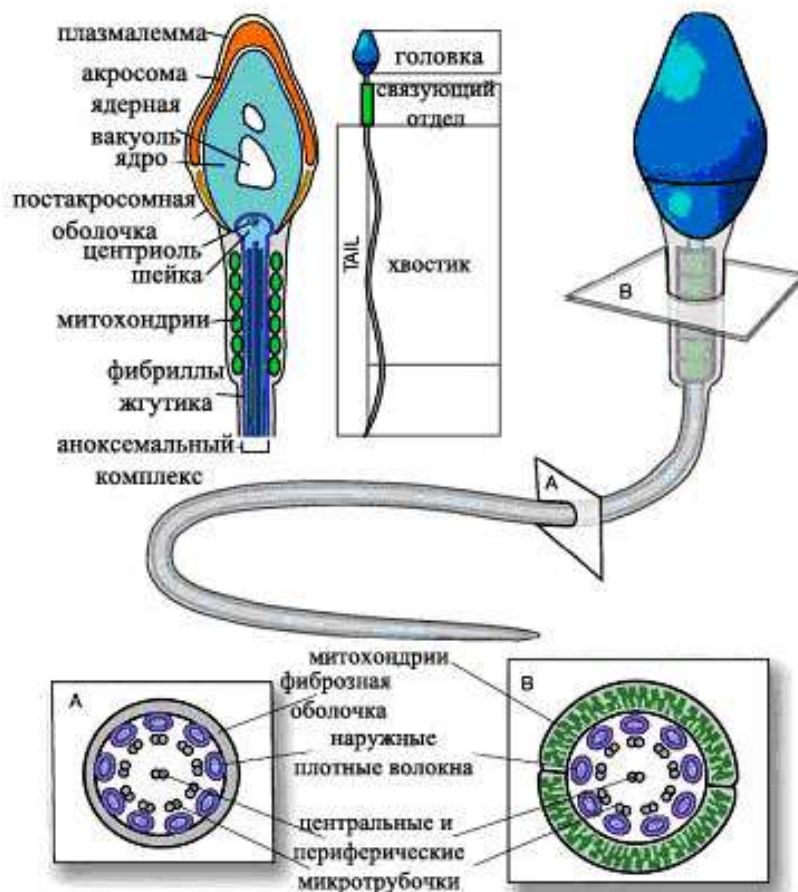


Рис. 12. Схема строения сперматозоида человека, составленная на основе электронно-микроскопических исследований

клеточной локомоции удивительно однообразна и очередной раз свидетельствует о единстве животного царства. От дистальной центриоли отходит осевая нить (аксонема), содержащая пучок фибрилл. Расположение фибрилл обычное - пара центральных одиночных фибрилл окру-

жена кольцом из девяти двойных фибрилл (9+2). В редких случаях встречаются другие вариации фибриллярного комплекса: в частности, с увеличенным числом центральных фибрилл (тип 9+3 у двукрылых; 9+7 - у ручейников), или, напротив, уменьшенным (тип 9+1 у плоских червей; 9+0 у поденок и некоторых рыб). В спермиях некоторых насекомых, пресмыкающихся, птиц, млекопитающих развивается еще одно наружное кольцо из девяти более грубых фибрилл. Снаружи фибриллярный комплекс окружен слоем цитоплазмы, окруженной мембраной, которая иногда образует гребневидные выросты или ундулирующую структуру. Сокращение осевого комплекса обеспечивает биевание жгутика и перемещение сперматозоида (у плацентарных млекопитающих со скоростью порядка 2-4 мм в минуту).

Оогенез

В процессе развития женских половых клеток выделяют те же основные стадии, что и в развитии сперматозоидов: размножения, роста, созревания. При

этом в оогенезе, в отличие от сперматогенеза, обычно гипертрофирована стадия роста, менее выражена стадия размножения и отсутствует стадия формирования. Сpermий, по сути дела, представляет собой подвижное ядро с редуцированным аппаратом движения. А женская гамета обладает всеми факторами, необходимыми для инициации, поддержания метаболизма и последующего развития нового организма. Яйцеклетка отличается исключительной сложностью организации ооплазмы, содержащей резерв цитоплазматических ферментов, матриц, органелл и метаболических субстратов.

Механизмы оогенеза характеризуются значительно большим разнообразием, чем механизмы сперматогенеза, что объясняется огромным видовым разнообразием биологии размножения и ранних этапов онтогенеза у разных групп животных.

Как уже указывалось, после попадания в закладку яичника, первичные половые клетки остаются на периферии, в корковой зоне железы. Первоначально их очень мало, но, благодаря интенсивному размножению, численность оогониев быстро возрастает. У человеческого плода максимальное количество оогониев отмечено к 5-ти месячному сроку. Однако вслед за этим размножение оогониев прекращается, и начинается **атрезия** (разрушение) образующихся из оогониев ооцитов. К 7-му месяцу большая часть ооцитов уже входит в профазу своего первого деления мейоза.

Вследствие атрезии численность ооцитов прогрессивно снижается, и к концу беременности в яичниках человека остается лишь около 1 млн, к семилетнему возрасту - примерно 300 тыс., а к моменту полового созревания - порядка 20 тыс. половых клеток. И из них на протяжении репродуктивного периода женщины овулирует всего 350-400 овоцитов.

В то же время у большинства низших позвоночных, например у рыб, оогонии способны размножаться на протяжении всего репродуктивного периода.

Образовавшиеся из овогониев овоциты переходят в малоактивное состояние, которое может тянуться многие годы до полового созревания.

С наступлением половой зрелости начинаются процессы роста ооцитов первого порядка, которые одновременно вступают в профазу первого мейотического деления. Стадия роста в оогенезе включает целый ряд весьма сложных процессов и отличается большей продолжительностью, чем подобная стадия сперматогенеза. В процессе роста ооцит аккумулирует пластические и энергетические материалы, морфогенетические детерминанты, в нем гипертрофируются клеточные органоиды, что обуславливает значительное (в сотни и в тысячи раз) увеличение объема ооплазмы. В зрелых ооцитах шпорцевой лягушки содержится примерно в 100 000 раз больше митохондрий, РНК-полимераз, ДНК-полимераз, в 200 000 раз больше рибосом, в десятки тысяч раз больше гистонов и дезоксирибонуклеозидтрифосфатаз.

Процесс роста в оогенезе разделяют на два периода: 1. **малого роста (превителлогенез)**; 2. **большого роста (вителлогенез)**. В первом периоде объем цитоплазмы изменяется незначительно, так как содержание РНК, белков, рибосом, митохондрий растет исключительно за счет собственных синтезов. Также незначительно увеличивается объем ядра, однако в нем в это время,

на фоне профазы происходят чрезвычайно важные генетические перестройки. У анамний период малого роста всегда более продолжителен, чем период накопления желтка. У некоторых рыб (европейский угорь) он длится 10-12 лет. Период малого роста обычно соответствует периоду до - или ранней диплотене мейоза. Когда ооцит вступает в весьма продолжительную диплотену, в нем идут процессы интенсивного роста ядра и цитоплазмы (превителлогенез, цитоплазматический рост) и отложения трофических элементов (вителлогенез, трофоплазматический рост).

В превителлогенезе интенсивные синтетические процессы происходят в ядре, что сопровождается увеличением его диаметра в 7-8 раз. Хромосомы частично деспирализуются и образуют многочисленные (у тритона до 20 тыс.), отходящие перпендикулярно от основной нити ДНК петли. Считается, что каждая петля - это ген. Из-за своей характерной формы хромосомы получили название **хромосом типа ламповых щеток**. На этой стадии около 5% генома ооцита дерепрессировано и служит матрицей для синтеза главным образом 5S РНК и т РНК, тогда как р РНК образуется мало. Темп накопления рибосомной РНК начинает возрастать лишь к концу периода малого роста. Тем не менее, 90% всей РНК, синтезированной в период малого роста, составляют 5S РНК и т РНК. Во втором периоде, **периоде большого роста** синтетическая активность ооцита сохраняется, но ведущую роль в накоплении питательных веществ играют экзогенные источники белков, углеводов, жиров, липидов, витаминов и минеральных солей.

В периоде большого роста наблюдается интенсивное накопление рибосомных (28 S и 18 S) РНК; соответственно резко возрастает темп синтеза ядрышковых РНК. В ооцитах шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) на стадии ранней диплотены образуется до 1500 ядрышек, располагающихся под ядерной оболочкой.

Накопление огромного количества рибосом в ооплазме становится возможным благодаря избирательной активности рибосомных генов (р-генов) - участков ДНК, содержащих гены (цистроны), с которых транскрибируются 18S и 28S - р РНК. Эти участки многократно копируются, (**"экстракотируются"** или **амплифицируются**) с образованием р ДНК в виде дополнительных "свободных" ядрышек (**экстраядрышек**), которые интенсивно продуцируют рибосомы. В результате амплификации рибосомных генов уровень синтеза рибосом в ооците возрастает в тысячи раз и у *Xenopus laevis* достигает временами 300 тыс. в минуту!

Таким образом, механизм амплификации состоит в том, что с петли рДНК снимаются кольцевые копии - "экстраядрышки", на которых затем транскрибируются р РНК. Амплифицированная ДНК в конце оогенеза разрушается. С хромосом типа ламповых щеток транскрибируется м-РНК. Выходя в цитоплазму, м-РНК покрывается белковой оболочкой и образует **информосомы**. Большинство последних находится в цитоплазме ооцита в покоем состоянии и активизируется только после оплодотворения.

Высокая скорость накопления 5S РНК и т РНК происходит без механизма амплификации и обусловлена тем, что кодирующие их гены многократно

повторены. В ооцитах шпорцевой лягушки около 25 тыс. копий генов 5S РНК и несколько сотен копий генов т РНК.

Аккумулированные в ооплазме огромные запасы компонентов аппарата трансляции (рибосомы, 5S РНК, т РНК, и РНК) в основном используются не собственно ооцитом, а в ходе последующего эмбрионального развития.

Образование экзогенного желтка. Учитывая огромные размеры некоторых яиц, очевидно, что аккумулированный в них желток имеет экзогенное происхождение. Описаны следующие способы поступления трофических материалов (предшественников желтка) в овоцит: 1. **фагоцитарный**; 2. **солитарный**; 3. **фолликулярный**.

1. При **фагоцитарном способе** (рис. 13) подвижные ооциты развиваются в разных участках тела, и их рост обеспечивается активным фагоцитозом соседних клеток по простой формуле - "большие пожирают меньших" (губки, некоторые кишечнополостные и черви). В ооцитах развивается мощный аппарат Гольджи и гранулярный эндоплазматический ретикулум, которые обеспечивают синтез гидролитических ферментов и их "упаковку" в мембраны. В ходе фагоцитоза ооплазма заполняется фаголизосомами, находящимися на разных стадиях переваривания, а желточные гранулы не образуются.

2. При **солитарном способе** питания ооцит не связан с вспомогательными клетками и демонстрирует большую самостоятельность в отношении синтеза желтка и всех видов РНК. Соответственно в ооцитах, растущих солитарным способом хорошо развит гранулярный эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи (рис. 14). Эти органоиды обеспечивают синтез желточных белков и их отложение в виде гранул. Низкомолекулярные предшественники питательных веществ поступают из окружающей среды. С некоторыми вариантами такой тип вителлогенеза встречается у кишечнополостных, моллюсков и иглокожих (Голиченков, 1991 г.).

3. Наиболее распространен **фолликулярный способ** накопления желтка, который осуществляется с участием вспомогательных соматических (фолликулярных) клеток и идет в двух вариантах: **алиментарном** и **нутриментарном**.

а) В первом, алиментарном варианте, желток поступает в ооцит из окружающих его в один или несколько слоев фолликулярных клеток (рис. 15, а). Все виды РНК при этом синтезируются в ядре ооцита без участия вспомогательных клеток. Фолликулярный эпителий за редким исключением (головоногие моллюски) служит лишь промежуточным элементом для поступления в ооцит желтка. Помимо транспорта в ооцит питательных веществ экстрагонадного происхождения, фолликулярный эпителий выполняет также защитную, барьерную и регуляторную функции. Вещества, предшественники желтка, основным компонентом которых является **вителлогенин**), синтезируются у насекомых в жировом теле, у ракообразных - в гемолимфе и в гематопанкреасе, у амфибий, птиц и млекопитающих - в печени. Гормональный контроль вителлогенеза осуществляется гипоталамусом, гипофизом и фолликулярными клетками яичника. При наступлении брачного сезона гипоталамус секретирует рилизинг-фактор гонадотропного гормона в гипофиз, который, в свою очередь, отвечает выделением в кровь гонадотропинов. Последние стимулируют фолликулярные

клетки к секреции эстрогена, под воздействием которого печень начинает синтезировать и выделять в кровь вителлогенин. С кровью предшественники желтка переносятся по сосудистой системе в яичники. В яичниках они должны пройти через фолликулярный эпителий для того, чтобы попасть в ооцит. Молекулы вителлогенина очень большие (молекулярной массой около 470 000 дальтон), а потому не могут проникнуть сквозь плазмолемму ооцита путем диффузии и преодолевают мембрану посредством микропиноцитоза (Dumont, 1978).

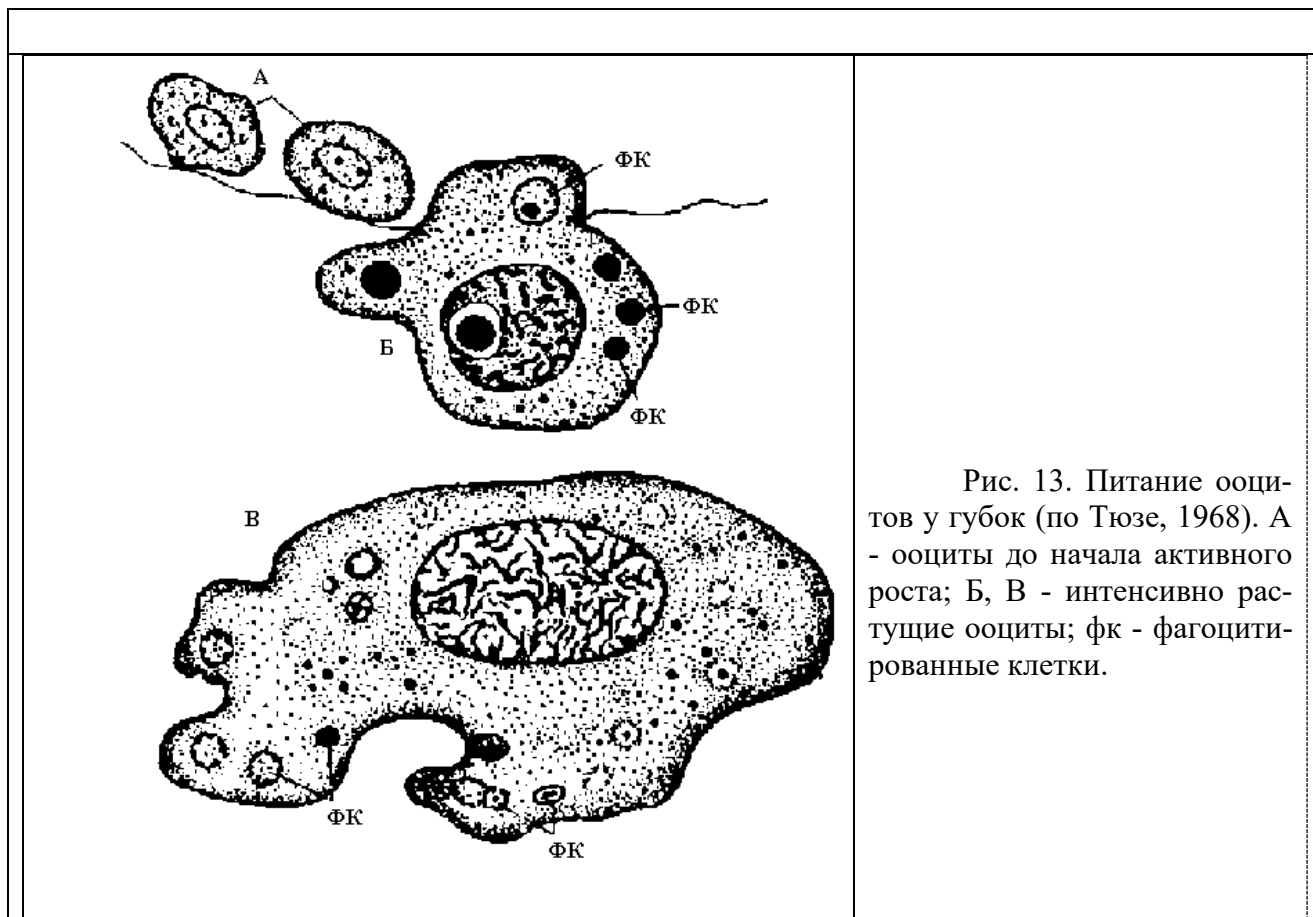


Рис. 13. Питание ооцитов у губок (по Тюзе, 1968). А - ооциты до начала активного роста; Б, В - интенсивно растущие ооциты; фк - фагоцитированные клетки.

Фолликулярные клетки и мембрана ооцита разделены тонким периооцитным пространством, которое пронизано микроворсинками – выростами мембран фолликулярных клеток и ооцита, расположенных навстречу и между друг другом (рис. 14,15). Капли вителлогенина, содержащиеся в микроворсинках фолликулярных клеток, отшнуровываются в периооцитное пространство, а затем путем пиноцитоза в виде небольших (20-30 нм) пузырьков поступают в ооцит. В зрелом яйце вителлогенин не обнаруживается, т.к. распадается на более простые белковые соединения – высокофосфорилированный фосфовитин и липопротеин - липовителлин. Оба белка совместно упакованы в ограниченные мембраной желточные пластинки. Гликогеновые гранулы и липохондрияльные включения служат соответственно местами хранения углеводных и липидных компонентов желтка.

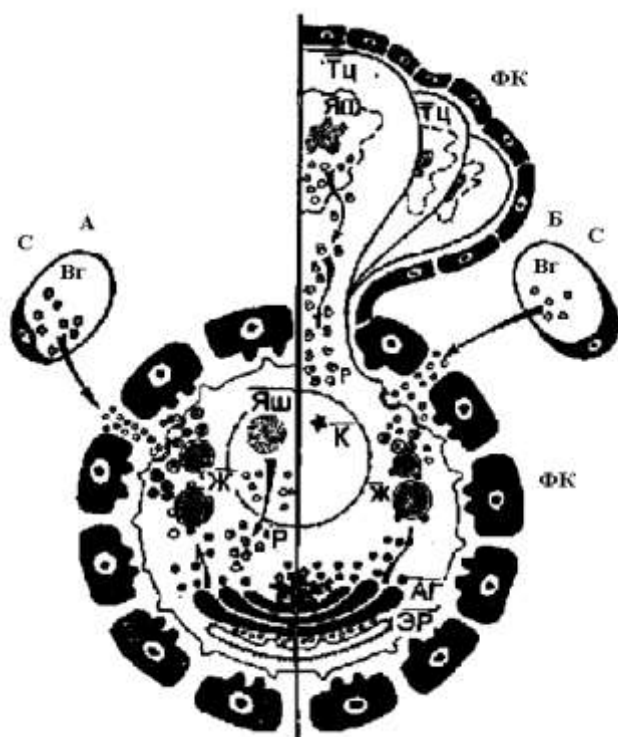


Рис. 14. Схема ультраструктуры ооцита, растущего по солитарному типу (Айзенштадт, 1984). Желточные белки синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме, а желточные гранулы формируются в аппарате Гольджи. Первые гранулы желтка появляются в околоядерной цитоплазме и распространяются центробежно, пиноцитоз выражен слабо. ЭР - эндоплазматический ретикулум, КГ - комплекс Гольджи, Я - ядро, Яш - ядрышко, ЖГ - желточные гранулы.

б) Нутриментарный способ накопления желтка (рис.15б) заключается в том, что питательные вещества, включая рДНК и большое количество РНК, поступают в ооцит из окружающих его фолликулярных и абортивных половых клеток (трофоцитов). Трофоциты возникают в результате ассиметричных митотических делений оогониев. Например у дрозофилы в результате четырехкратного деления каждый оогоний дает 16 клеток, связанных между собой цитоплазматическими мостиками. Лишь один из 16 ооцитов продолжает нормальный оогенез, а 15 остальных преобразуются в питательные клетки – трофоциты (рис. 16). В данном варианте собственная синтетическая активность ооцита невелика, в ядре в основном идут мейотические преобразования. В то же время в трофоцитах отмечаются интенсивные синтетические процессы. Синтезированная РНК и, возможно, белки по сохраняющимся цитоплазматическим мостикам транспортируются из трофоцитов в цитоплазму ооцита. Число питающих ооцит клеток видоспецифично и колеблется от 8 (жук-плавунец) до 2000 (улитковая пиявка). Одновременно с образованием желточных пластинок в цитоплазме ооцита идет формирование кортикальных гранул, представляющих собой окруженные мембраной включения из белков и мукополисахаридов.

Такие гранулы обнаружены не во всех группах животных, так например они содержатся в яйцеклетках бесхвостых амфибий и отсутствуют в яйцах хвостатых. Яйца большинства видов животных отличаются выраженной ассиметрией и именно в процессе оогенеза происходит становление их анимально-вегетативной оси. Показано (Danilchik, Gerhart, 1987), что вителлогенин включается равномерно через всю поверхность ооцита, однако затем происходит его перемещение в

Рис. 15. Функциональные отношения между растущим ооцитом и функцио-



нальными клетками. При фолликулярном оогенезе (А) основным источником рРНК служит ядро ооцита, а при нутриментарном (Б) - ядра трофоцитов. Большая часть желточных белков синтезируется вне гонады и поступает внутрь фолликула по межклеточным пространствам фолликулярного эпителия; большая часть желтка синтезируется в ЭР и АГ и присоединяется к экзогенному желтку. Р - рибосомы, Вг - вителлогенин, С - кровеносный сосуд, ФК - фолликулярные клетки, Тц - трофоциты, ЭР - эндоплазматический ретикулум, АГ - аппарат Гольджи, Яш - ядрышко, Ж - желток, К - кариосфера (по Айзенштадту, 1984).

ооплазме к центру клетки. В вегетативном полушарии желточные пластинки постепенно растут и смещаются от кортекса внутрь. В конечном счете более 75% желтка концентрируется в вегетативном полушарии (рис. 19). Желточные пластинки в основном концентрируются в вегетативном полушарии, а гранулы гликогена, рибосомы, митохондрии, эндоплазматический ретикулум собираются ближе к анимальному полюсу. Даже локализация мРНК и морфогенетических факторов носит строго специфический характер. Точный механизм формирования этих градиентов неизвестен, однако установлена наверняка важная роль в этом феномене цитоскелета (микротрубочек и микрофиламентов).

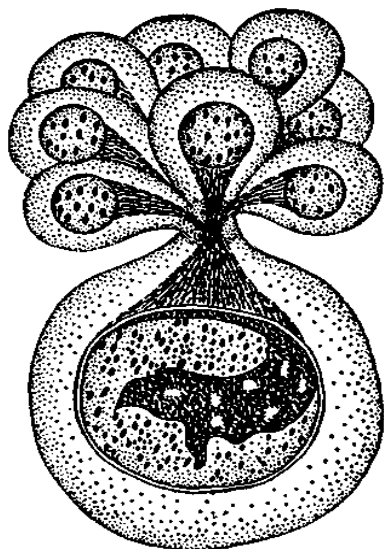


Рис.16. Ооцит жука-плавунца с группой клеток-кормилок (трофоцитов) (по И.И.Соколову)

По мере отложения желтка расположение органелл также приобретает ассиметричный характер. Из аппарата Гольджи формируются кортикальные гранулы, которые первоначально распределены по цитоплазме беспорядочно, а затем перемещаются к периферии и образуют кортикальный слой ооцита. Одновременно идет репликация митохондрий, они делятся, давая начало миллионам новых органелл, которые при дроблении распределятся между многочисленными бластомерами.

К концу вителлогенеза ооплазма становится сегрегированной, неоднородной. На периферии ооцита формируется кортикальный слой, включающий кортикальные гранулы, митохондрии и гранулы пигмента.

Стадия созревания (мейотические деления)

После завершения роста ооцит может быть оплодотворен и мейотические деления (созревание) начинаются только после проникновения сперматозоида. Созревание охватывает период от первого мейотического деления до образования яйца. Причем, у разных животных спермий проникает в яйцо на различных этапах созревания.

Преобразования ядра яйцеклетки идут до определенной, характерной для данного вида стадии мейоза, затем останавливаются, и яйцо как бы ожидает оплодотворения. У некоторых животных мейоз блокируется на стадии профазы первого деления, еще до растворения ядерной оболочки (тип I - губки, многие черви, моллюски; из млекопитающих - лиса, собака, лошадь), у других - на стадии метафазы I-го мейотического деления (тип II - некоторые черви и моллюски, многие насекомые, асцидии), у третьих - на метафазе II деления (тип III - некоторые ракообразные, почти все позвоночные, включая человека) и, наконец, - после завершения мейотических делений (тип IV - кишечнополостные, морские ежи и морские лилии).

Ооциты амфибий могут годами оставаться на диплотенной стадии профазы мейоза. Для возобновления мейоза первичному ооциту амфибий требуется прогестерон, вырабатываемый, как уже указывалось выше, фолликулярными клетками. Буквально через несколько часов после стимуляции прогестероном происходит первое деление мейоза и зрелое яйцо овулирует из яичника на стадии метафазы второго деления мейоза.

Согревательные деления прежде всего затрагивают ядро, в котором происходят сложные процессы рекомбинации генетического материала. В связи с тем, что мейоз уже описан ранее, остановимся лишь на тех особенностях, ко-

торые характерны именно для оогенеза.

Профаза мейоза у разных животных имеет неодинаковую продолжительность - обычно от нескольких дней до нескольких десятков лет. После дипло-тены ооциты не вступают сразу в прометафазу, а переходят в стадию диакине-за. Чаще всего на этой стадии возникает блок мейоза.

Выход из диакинеза и начало созревательных делений связаны с наступ-лением половой зрелости и контролируются гормонами аденогипофиза и фол-ликулярного эпителия.

Яркой специфической чертой мейоза женских гамет является асиммет-ричность и первого, и второго деления созревания. В ходе созревательных де-лений образуются обычно четыре клетки, но лишь одна из них (яйцо) получает почти весь объем цитоплазмы с его компонентами, сформированными с таким трудом в ходе стадии роста. В результате первого редукционного деления оо-цит 1-го порядка отделяет от себя так называемое редукционное или первое полярное тельце, окруженное небольшим ободком цитоплазмы и превращается в ооцит 2-го порядка.

В процессе второго созревательного деления от ооцита 2-го порядка "от-почковывается" 2-ое полярное тельце с гаплоидным набором хромосом

Одновременно 1-ое редукционное тельце делится (если не дегенерирует) на два. Таким образом, в конце периода созревания из одного ооцита 1-го по-рядка образуется одна зрелая яйцеклетка и три полярных тельца с редуциро-ванной цитоплазмой и гаплоидным хромосомным набором.

Зрелые яйцеклетки обычно имеют округлую (рис.17) или овальную форму. В редчайших случаях (у губок и некоторых кишечнополостных) яйца способны к амeboидным движениям, у остальных животных они неподвижны. Размеры яйцеклеток варьируют в очень широких пределах и в основном опре-деляются количеством содержащегося желтка. Так у некоторых паразитиче-ских перепончатокрылых яйца чрезвычайно малы (6x10 мкм в ширину и дли-ну). У большинства плацентарных млекопитающих размеры яиц варьируют от 50 до 300 мкм (90-130 мкм - у человека).

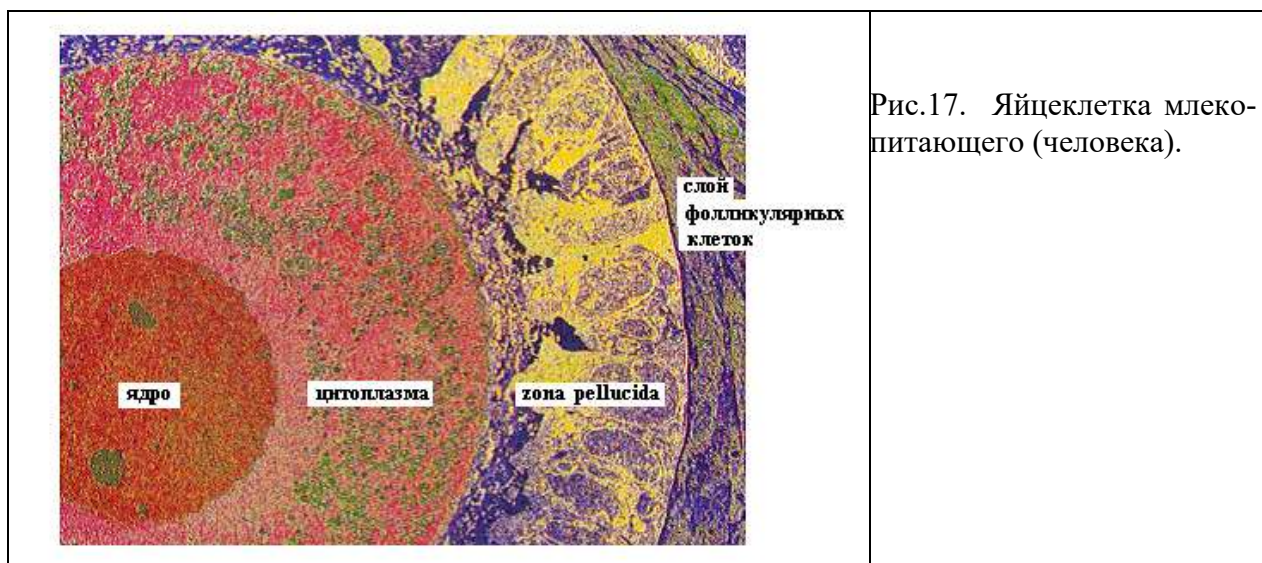


Рис.17. Яйцеклетка млеко-питающего (человека).

У некоторых моллюсков, иглокожих и ракообразных диаметр яиц достигает 1,4

мм, у перевозверей - 3,5-4,3 мм, у лососевых рыб 7-9 мм, у морских сомов 17-21 мм, у акулообразных рыб - до 50-70 мм. Диаметр яйца (без белковой оболочки) курицы около 30 мм, страуса - 80 мм (при общей массе - 1,4 кг). Как правило, чем крупнее птица, тем больше откладываемые ею яйца. Бывают и исключения, так у кулика перевозчика масса яйца достигает 28-30% массы тела. Обычно величина яиц зависит не столько от размеров тела животного, сколько коррелирует с плодовитостью самок данного вида. Животные из самых разных таксонов, охраняющие потомство, откладывают, как правило, немногочисленные яйца крупных размеров. Так, например, морские сомики, вынашивающие самые крупные среди костных рыб яйца в ротовой полости, откладывают всего 20-40 яйцеклеток, тогда как треска выметывает до 10 млн. яиц диаметром немногим более 1 мм. Такой корреляции нет у плацентарных млекопитающих, зародыши которых получают питание во время развития из материнского организма. Яйца у них мелкие и немногочисленные.

Яйца – это высокоспециализированные клетки. Это особенно проявляется в строении их дополнительных оболочек и организации ооплазмы с трофическими включениями и разнообразными физиолого-биохимическими системами.

Различают **первичные, вторичные и третичные** яйцевые оболочки. Некоторые оболочки вырабатываются самим яйцом, другие - окружающими яйцо фолликулярными клетками, третьи - половыми путями самки (после овуляции). Яйцевые оболочки защищают клетку от механических повреждений, от инфицирования, от резких колебаний температуры, у наземных животных (многие беспозвоночные, рептилии, птицы) - от высыхания и т.п. Вместе с тем они могут предотвращать полиспермию, выполнять трофические функции, играть антимикробную роль. У очень многих морских беспозвоночных, выметывающих мелкие яйца в воду, яйца одеты только тонкой желточной оболочкой, окруженной слоем студенистого вещества (студенистая оболочка). У таких яиц обычно вся поверхность доступна для сперматозоидов.

Первичная (желточная) оболочка имеет вид однородной неклеточной субстанции, лежащей снаружи от плазмолеммы яйца. Иногда (у птиц) желточная оболочка содержит грубые волокна неколагенового белка. Чаще всего эта оболочка секретируется яйцом, реже - в ее синтезе участвуют окружающие фолликулярные клетки (например, в образовании *zona pellucida* яйцеклетки млекопитающих). Обычно формирующаяся желточная оболочка пронизана микро - и макроворсинками фолликулярных клеток и самого ооцита, что многократно увеличивает поверхность контактирующих мембран и свидетельствует об активном транспорте веществ между фолликулярными клетками и яйцом. Формирование желточной оболочки обычно совпадает с интенсивным поступлением в ооплазму трофических веществ в периоде большого роста. После накопления в яйце основной массы желтка и приближения овуляции, микроворсинки редуцируются. Непосредственно перед овуляцией между желточной оболочкой и плазмалеммой яйца образуется заполненное жидкостью **периви-**

теллиновое пространство.

Вторичная оболочка (хорион) яйца либо продуцируется фолликулярными клетками, либо образуется путем трансформации этих клеток. У некоторых животных хорион достигает значительной толщины.

Третичные оболочки отличаются разнообразием структурно-функциональной организации в яйцах разных животных, но их объединяет то, что все они образуются после выхода из яичника, во время прохождения яйцеклетки по яйцеводу. Примеры таких оболочек - кокон многих червей и моллюсков; белковая оболочка и твердая наружная капсула яиц акул и рыб, белковая, известковая и волокнистая оболочки у крокодилов и черепах; трехслойная белковая оболочка, две подскорлуповые пленки, известковая капсула и надскорлуповая оболочка в яйцах птиц (рис. 18).

Характер дифференциации оболочек яйца обычно определяется условиями в которых происходит оогенез и развитие зародыша (например, инкубация яйца). Мощное развитие наружных оболочек с гипертрофированными трофическими и защитными функциями обычно наблюдается у яйцекладущих животных, особенно у наземных форм. С развитием плотных, непроницаемых для спермиев оболочек, оплодотворение становится возможным лишь двумя путями: либо через специальные микропиллярные каналы в оболочках, через которые сперматозоиды проходят к поверхности ооплазмы (насекомые), либо гаметы объединяются до момента формирования таких оболочек, в верхних отделах яйцевода (акуловые рыбы, рептилии, птицы). В ооплазме содержатся митохондрии, аппарат Гольджи, эндоплазматическая сеть, рибосомы, желточные включения и пигментные гранулы. Для яйцеклеток большинства животных характерна гетерогенная структура ооплазмы. Кортикальные гранулы, митохондрии и пигментные гранулы локализируются по периферии клетки, образуя кортикальный слой ооцита. Гранулы гликогена, рибосомы, эндоплазматическая сеть и митохондрии смещаются к анимальному полюсу, а желточные пластинки - к вегетативному. Точный механизм данной гетерогенности ооплазмы до конца не определен, но известно, что в локализации специфических мРНК и морфогенетических факторов важную роль играет цитоскелет.

Трофические компоненты ооплазмы представлены белками, углеводами, жирами, липидами, витаминами, минеральными солями. Около 9/10 всего белка полилецитальных яиц входит в состав желтка, который является совокупностью различных в химическом отношении веществ, преимущественно липопротеидов и гликопротеидов, обеспечивающих питание развивающегося зародыша. Желток является эволюционным приспособлением для развития зародыша без поступления питательных веществ извне. Поэтому особенно богаты желтком яйца у видов с растянутым эмбриогенезом вне материнского организма и не проходящих при этом стадии личинки, способной к самостоятельному питанию (у рептилий и птиц, например). Обычно желток содержится в виде гранул, реже в виде пластинок. В частности желток куриного яйца имеет вид вязкой жидкости, в которой взвешены гранулы различных размеров.

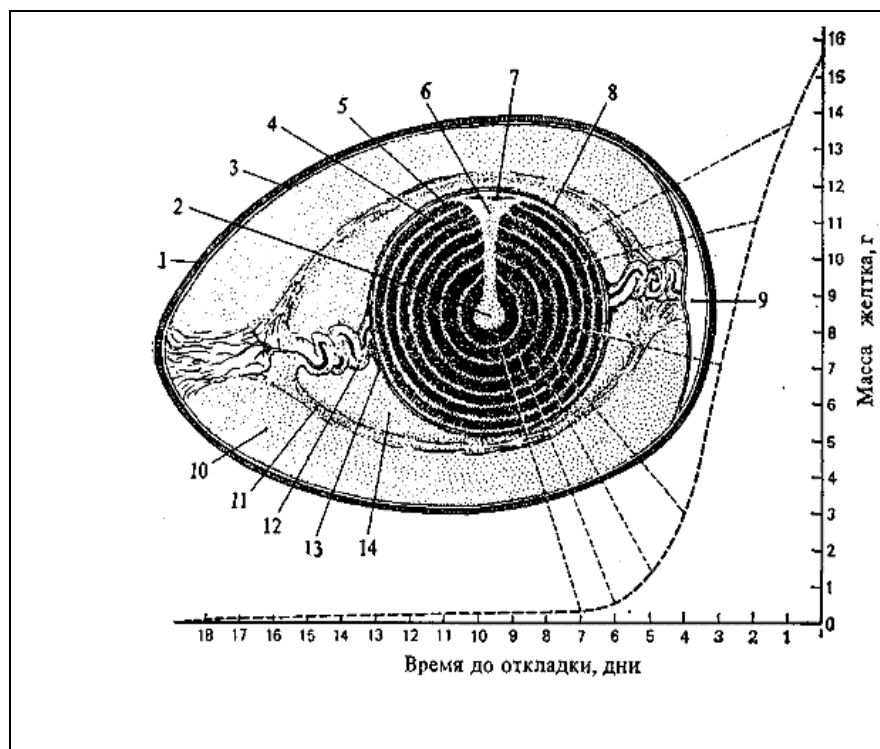


Рис.18. Схема строения только что снесенного куриного яйца (из Карлсона, 1983).

1-скорлупа; 2-латебра; 3-подскорлуповая оболочка; 4-белый желток; 5-желтый желток; 6-яйцо Пандера; 7-бластодерма; 8-желточная оболочка; 9-воздушная камера; 10-яичный белок (наружный слой альбумина); 11-яичный белок (внутренний слой альбумина). Кривая справа отражает скорость роста яйца на протяжении 18 дней, предшествовавших его откладке. Штриховые линии ведущие от разных слоев желтка к кривой роста показывают, в какое именно время сформировались эти слои

Его состав: около 50% воды, 33% жира, 16% белка, менее 1% углеводов и витаминов. Главные белки желтка: вителлин и липовителлин, фосфовитин и ливетины. Жировые вещества представлены нейтральными жирами, фосфатидами и холестерином.

Классификация яиц по количеству желтка и его распределению в цитоплазме.

Желток является не только важным трофическим компонентом яйцеклетки, но и во многом определяет характер ранних стадий эмбриогенеза, особенно процессов дробления и гастрюляции. В связи с этим, наиболее распространенная классификация яиц основана на учете количества желтка и особенностей его распределения в ооплазме.

В соответствии с количеством желтка в ооплазме различают следующие типы яиц: **алецитальные**, **олиголецитальные**, **мезолецитальные**, **полилецитальные**.

Алецитальные (безжелтковые) яйца практически не содержат желтка. Характерны для паразитических перепончатокрылых, плацентарных млекопитающих.

Олиголецитальные (бедные желтком) яйца описаны у моллюсков, иглокожих, многих червей.

Мезолецитальные (со средним содержанием желтка) яйца типичны для осетровых рыб и амфибий.

Полилецитальные (богатые желтком) яйца характерны для членистоногих, костистых рыб, рептилий, птиц, однопроходных млекопитающих.

Количество желтка в яйцеклетках филогенетически обусловлено особенностями эмбриогенеза различных животных. Обычно яйца, в которых зародыш

развивается до вполне сформированного состояния без притока питательных веществ из материнского организма содержат большое количество желтка (полилецитальные). Так зародыши рептилий и птиц развиваются исключительно за счет трофических компонентов яйца, а инкубация иногда идет 40-50 суток. При этом у птиц родители поддерживают лишь оптимальную температуру развития, а у рептилий (за редчайшим исключением) яйца развиваются вообще автономно.

Внутриутробное развитие плацентарных млекопитающих осуществляется за счет пищи и кислорода, поступающих через специализированный временный внезародышевый орган эмбриона из материнского организма, в связи с чем яйца практически не содержат желтка. В то же время, развивающиеся в воде автономно от материнского организма мезолецитальные яйца амфибий в состоянии обеспечить развитие зародыша лишь до личиночного состояния. Вылупившиеся личинки в дальнейшем растут, питаясь самостоятельно. Однако у некоторых тропических лягушек, как например, *Liopelma* и *Arthroleptella*, отсутствует стадия головастика. Это связано с тем, что яйца данных видов снабжены огромным количеством желтка и, благодаря этому, способны развиваться на суше, минуя стадию личинки.

Помимо количества желтка большое значение для последующего эмбриогенеза имеет характер его распределения в ооплазме. Отложение желтка в цитоплазме яйцеклетки изначально происходит неравномерно. Тот полюс яйца, где желтка содержится меньше, называется **анимальным**, а противоположный, возле которого желтка больше - **вегетативным**. То есть существует анимально-вегетативная полярность в распределении желтка, которая отражает анимально-вегетативный градиент в организации кортикального слоя яйцеклетки и других цитоскелетных структур. Опытами по центрифугированию яиц доказана определяющая роль в поляризации ооцита именно кортикального слоя и желтка.

Классифицируя характер распределения желтка в цитоплазме, прежде всего учитывают локализацию его основной массы относительно анимально-вегетативной оси яйца. Различают **гомолецитальные, центролецитальные и телолецитальные** яйца.

Для **гомолецитальных или изолецитальных** яиц характерно равномерное распределение желтка в цитоплазме. Чаще всего желтка при этом мало или очень мало, отсюда и его равномерное распределение (яйца иглокожих, ланцетника, плацентарных млекопитающих). Однако встречаются гомолецитальные яйца богатые желтком (у гидр, немертин). В гомолецитальных яйцах ядро располагается в центре.

В **центролецитальных** яйцах членистоногих, имеющих обычно вытянутую, эллипсоидную форму, большое количество желтка распределено равномерно. Ядро несколько смещено от центра. Тонкие прослойки чистой цитоплазмы разделены слоем желтка. Одна прослойка окружает ядро, а другая располагается по периферии яйца. Между собой они связаны цитоплазматическими мостиками.

Для **телолецитальных** яиц (рис. 18,19) характерна ярко выраженная по-

лярность в распределении желтка, который в основном концентрируется в вегетативном полушарии. Градиент концентрации желтка в анимально-вегетативном направлении может быть относительно плавным (в мезолецитальных яйцах амфибий), а может быть резким (в полилецитальных яйцах рептилий и птиц). В последнем случае огромная масса желтка занимает практически весь объем цитоплазмы, оставляя относительно свободным лишь небольшой участок на анимальном полюсе (зародышевый диск), в центре которого располагается ядро (рис. 18). Количество желтка и его распределение является дополнительным фактором, обуславливающим характер сегрегации ооплазмы, что, в свою очередь, сказывается на течении эмбриогенеза в целом и, особенно, на его начальных стадиях. Вместе с тем, еще в 1886 году французский эмбриолог Лоран Шабри, изучая эмбриогенез оболочников, обнаружил, что каждый бластомер ответственен за формирование специфического набора тканей личинки. При удалении скальпелем определенных бластомеров у личинки отсутствовали именно те структуры, которые образуются из них в норме. Кроме того, он обнаружил, что если изолировать определенные группы клеток зародыша, то из них формируются вполне определенные («запрограммированные» по современной терминологии) структуры даже без связи с другими клетками. Такой способ развития, как уже говорилось, называют **мозаичным**. Но ведь каждая клетка, в конечном счете, образуется в результате деления из частички цитоплазмы яйца. И потому гетерогенность клеток основывается на разнокачественности цитоплазмы из которой они возникли. Полагают, что эта разнокачественность, кроме всего прочего, обусловлена наличием в разных участках ооплазмы разнообразных **морфогенетических детерминантов**, контролирующих коммитирование (детерминацию) данной клетки к дифференциации в строго определенный клеточный тип. Например, у оболочников большая часть тканей детерминируется сразу же после оплодотворения яйца, лишь некоторые ткани претерпевают прогрессивную детерминацию. Задняя анимальная пара бластомеров дает начало эктодерме, задняя вегетативная пара продуцирует энтодерму, мезенхиму и мышечную ткань. При удалении бластомеров, дающих мышечную ткань, из оставшихся 6/8 частей зародыша развивается личинка, лишенная мускулатуры.

Локализованные в цитоплазме яйцеклеток половые детерминанты обнаружены у представителей разных видов. Их химическая природа и механизм действия достаточно разнообразны и весьма активно исследуются в последние годы. Наиболее часто встречающиеся детерминанты - это те, которые детерминируют развитие первичных половых клеток.

Цитоплазма зрелого яйца богата различными органоидами. Количество митохондрий в ооплазме обычно превышает миллион, тогда как в большинстве соматических клеток редко превышает несколько сотен. Огромная численность митохондрий обусловлена их интенсивным автономным делением. Соответственно, перед каждым делением митохондрии происходят редупликация ее ДНК.

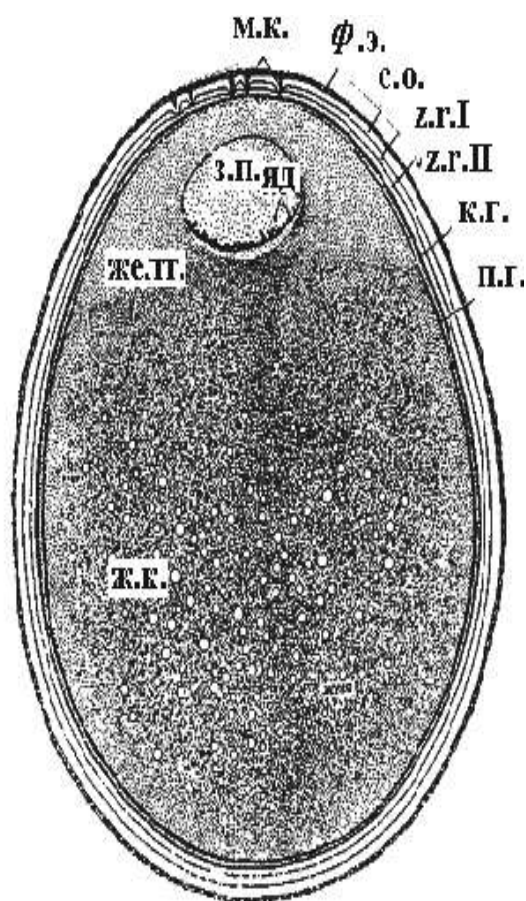


Рис.19. Телолецитальное яйцо осетра (разрез по анимально-вегетативной оси).

желт.-желточные гранулы; ж.к.- жировые капли; з.п.-зародышевый пузырек; к.г. — кортикальные гранулы; м.к.-микропилярные каналы; п.г.- пигментные гранулы; с.о.-сосудистая оболочка; ф.э.- фолликулярный эпителий; я.д.-ядрышки; з.р. I - zona radiata externa; z.r.II-zona radiata interna

В результате существенную часть суммарной ДНК зрелого ооцита составляет митохондриальная ДНК. Кроме митохондрий цитоплазма ооцитов содержит также центриоли, аппарат Гольджи и специализированную форму эндоплазматического ретикулула - **кольцеобразные ламеллы** в виде стопок пористых мембран, содержащих некоторое количество РНК. В зрелых яйцах многих животных накапливаются огромные запасы компонентов аппарата трансляции. У амфибий, например, количество рибосом и тРНК соответствует их количеству в сотнях и тысячах обычных соматических клеток. Рибосомы присутствуют в ооплазме в виде неактивных 80S частиц, аРНК в виде т РНК, 5S РНК и

м РНК. Соответственно в ооцитах содержится большое количество структурных белков рибосом и специфических белков, образующих комплексы с 5S РНК, м РНК и т РНК. Довольно много, до 1% всего белка ооплазмы, составляет белок тубулин.

Помимо компонентов аппарата трансляции и структурных белков в ооплазме содержатся резервы многих ферментов, необходимых для ранних стадий развития зародыша, прежде всего для синтеза ДНК и м РНК (ДНК - и РНК-полимеразы), фосфокиназы и редуктазы,

ДНК-зависимая РНК-полимераза, компоненты системы синтеза РНК.

Кроме того, в яйце содержится много факторов, выполняющих разнообразные регуляторные функции (активацию ферментов, рибосом, РНК, сборку нуклеосом и т.д.).

Помимо желточных включений зрелый ооцит содержит многочисленные пигментные гранулы. Эти гранулы возникают в оогенезе позже других включений и, обладая относительно небольшим удельным весом, обычно концентрируются в верхней части яйца, которая называется **анимальным полушарием**. Те яйцеклетки, развитие которых происходит в водной среде, ориентированы таким образом, что более легкое анимальное полушарие оказывается вверху и, благодаря пигментации, лучше поглощает солнечные лучи и прогревается.

Вопросы для самоконтроля:

1. Половые и соматические клетки. Сходство и различие.
2. Гипотезы "идиоплазмы" К. Негели и "зародышевой плазмы" А. Вейсмана
3. Изо- и гетерогамия.
4. Яйцеклетка, ее строение и свойства.
5. Яйцевые оболочки, их строение и функциональное значение.
6. Классификация яиц по количеству желтка и его распределению в цитоплазме.
7. Морфология и физиология сперматозоидов.
8. Микроструктура акросомного аппарата, шейки и хвоста спермия.
9. Механизм движения жгутика спермия.
10. Современные представления о формировании первичных половых клеток (гоноцитов) в онтогенезе.
11. Оогенез, его стадии.
12. Типы питания яйцеклеток - солитарный, алиментарный (нутриментарный и фолликулярный).
13. Мейоз, профазы мейоза, цитологические и биохимические перестройки при мейозе.
14. Биохимия оогенеза: синтез и накопление р-РНК и т-РНК;
15. Транскрипция структурных генов в оогенезе и рРНК;
16. Амплификация ДНК и образование сверхчисленных ядрышек; источники РНК и белка при разных типах оогенеза.
17. Пре- и вителлогенез.
18. Сперматогенез, его стадии.
19. Спермиогенез.
20. Биохимия сперматогенеза.

ГЛАВА ШЕСТАЯ

ПОЛОВЫЕ ЦИКЛЫ

Цикличность половых процессов. Особенности полового цикла в связи со средовыми условиями существования животных: однократный, сезонный, непрерывный. Моноциклические и полициклические виды животных. Ритмика овуляции. Гормональная регуляция полового цикла у млекопитающих, основные эндокринные органы и гормоны, регулирующие процессы полового размножения.

Размножение у животных - явление строго регламентированное, как состоянием самого организма, так и факторами внешней среды. Большая часть процессов, служащих подготовкой к размножению носит циклический характер и затрагивает, в первую очередь, органы репродуктивной системы. Как правило, цикличность половых процессов более отчетливо выражена у самок, чем у самцов, и, особенно, у животных с внутриутробным типом развития.

Циклический характер носят, в частности, процессы развития и овуляции яйцеклетки, перестройки тканей половых путей, матки и т.д. Изменения морфофункциональных особенностей репродуктивных органов у особей обоего пола происходят при активном участии гормонов, нередко взаимодействующих по принципу строго регулируемой обратной связи.

Весьма распространенным является заблуждение, что секреция половых гормонов приурочена к половому созреванию. В действительности, это - одна из перманентных функций, проявляющаяся, начиная с самых ранних стадий постнатального развития и особенно усиливающаяся к моменту наступления половой зрелости.

В частности, у самцов норки в возрасте 1 месяц уровень тестостерона равен $1,08 \pm 0,33$ нмоль/л., в 3-х месячном возрасте – $1,74 \pm 0,74$ нмоль/л., в 6-ти месячном – $2,7 \pm 0,63$ нмоль/л, в 7-ми – $4,86 \pm 0,98$, в 10-и месячном (наступает половая зрелость) концентрация андрогенов у самцов становится максимальной ($7,25 \pm 0,96$, $P < 0,001$) в сравнении с ранним постнатальным онтогенезом.

Вместе с тем на процессы размножения значительное влияние оказывают факторы внешней среды, а также психическое состояние организма. У многих видов начальным звеном в цепи активации половой функции являются воздействия внешней среды, неодинаковые в разные сезоны года. Среди них особенно выделяются такие факторы как температура, свет и наличие в достаточном количестве корма.

Различают виды животных у которых в течение года наблюдается только один половой цикл (так называемые моноциклические или моноэстральные виды), и виды циклические или полиэстральные, у которых половые циклы в году следуют один за другим и рождение детенышей возможно в любое время года, хотя в каком-то сезоне с большей вероятностью. Интересно отметить, что

у животных с ярко выраженной сезонностью размножения после окончания гона происходит обратимая инволюция семенников, масса которых значительно (на 10-60%) снижается, семенные каналцы запустевают, их длина и диаметр уменьшаются и сперматогенез прекращается. Большинство исследователей рассматривают этот феномен как арест или блокировку сперматогенеза (Rodrigues, Burgoyne, 2001).

Примером моноэстральных животных являются представители семейства псовых. В летние месяцы половые органы самцов лис, песцов, волков и собак аборигенных пород недоразвиты, а с ноября начинается постепенное их развитие. У серебристо-черных лисиц, например, гон начинается с конца января и заканчивается в апреле. Но имеются небольшие географические отличия. В более северных районах сезон размножения наступает на 1-2 недели позднее. У песцов эстральный период начинается с конца февраля.

У псовых, таким образом, бывает только одна овуляция в году. Течка у песцов, например, происходит в течение 12-14 дней, а период охоты длится 3-5 дней, в течение которых происходит овуляция яйцеклеток. После покрытия самки яйцеклетки опускаются в яйцеводы, оплодотворяются и перемещаются в матку, не прикрепляясь к ее стенке в течение 15-16 дней. В период течки стенки матки и влагалища становятся толще, наружные края влагалища, набухают и по ним возможно установить наступление состояния половой охоты. По окончании охоты яичники уменьшаются в размерах, созревают желтые тела, наружные края влагалища (половая петля) становятся почти незаметным в волосяном покрове. Все эти изменения не зависят от того, была ли самка оплодотворена или нет, и если в этот период самка оказалась непокрытой, то может дать потомство только на следующий год. Продолжительность беременности у большинства псовых варьирует между 51-66 днями. В летние месяцы (конец июля, август) половые органы самок и самцов в наших географических широтах частично подвергаются обратному развитию.

Интересно отметить, что в некоторых случаях изменением условий внешней среды возможна модификация эстрального ритма. У многих видов моноцикличность обусловлена ограничениями, накладываемыми суровыми условиями среды, особенно в умеренных и высоких широтах зимой. В благоприятных условиях содержания и кормления у многих моноциклических животных (уток, гусей овцы, собак и др.) наблюдается переход к полиэстральному ритму.

Для стимулирования брачного поведения у моноциклических видов необходимо определенное оптимальное соотношение внешних факторов: продолжительности светового дня, благоприятной температуры, соответствующий ландшафт, возможность постройки гнезда, логова, норы, отсутствие сильных стрессовых раздражителей и т.д. Иногда, например, даже при наличии всех остальных факторов, брачный сезон у животных не наступает из-за отсутствия самца-соперника. И зачастую трудно объяснить истинные причины взаимного влечения именно данных особей друг к другу.

Так, например, самки плодовой мушки (*Drosophila subobscura*) (Maynard, Smith, 1956) имеют возможность либо спариться с ухаживающим за ними сам-

цом, который описывает вокруг самки круги («танцует»), либо улететь. Показано, то самки улетают гораздо чаще от старых, раненных или инбредных самцов. То есть, они способны делать выбор и делают его. Интересно отметить, что самцы дрозофил менее разборчивы и начинают «танцевать», пытаются взобраться даже на комочек воска на конце препаровальной иголки, если его передвигать соответствующим образом. Бейтман предложил объяснение этой неразборчивости тем, что самцы спариваются ежедневно по многу раз.

Очень часто самки предпочитают самцов с ярким, броским экстерьером (самцы гуппи, павлинов), хотя они несут гены, делающие потомство (самцов) более доступным для хищников. Ч.Дарвин писал, что признаки, встречающиеся только у самцов, обычно являются вредными.

Роль самцов у разных видов значительно различается. В одних случаях она сводится к тому, что самец передает потомству лишь свои гены (гаметы), а в других, самец строит гнездо, кормит беременную самку и активно участвует в выкармливании и воспитании потомства. У нанду *Rhea Americana* (Bruning, 1973) доминирующие самцы (иерархия, доминирования устанавливается поединками) собирают гаремы, спариваются с самками и строят гнездо, в которое самки откладывают до 50 яиц. Затем самец прогоняет самок (которые обычно присоединяются к другому самцу), высиживает яйца и воспитывает страусят.

Весьма интересна проблема предотвращения инбридинга у животных. Считается, что инбредные особи обладают пониженными адаптационными способностями по сравнению с потомством от неродственного скрещивания. Есть соответствующие данные на этот счет. В частности Хилл (Hill, 1984) показал, что у оленьих мышей (*Peromyscus maniculatus*) при скрещивании между истинным братом и сестрой помет меньше, а смертность потомства выше чем при скрещиваниях между неродственными животными. В естественных условиях существуют разнообразные механизмы, препятствующие инбридингу.

Общеизвестно, что запрет на близкородственные браки широко распространен среди различных человеческих культур.

Процесс созревания половых клеток и развитие зародышей происходит обычно таким образом, что детеныши появляются в наиболее благоприятные для развития периоды года. Для наших умеренных широт таким периодом является весна. Бывают, конечно, исключения. Например, детеныши бурых медведей рождаются во время зимнего сна, когда на протяжении 5-6 месяцев медведица существует исключительно за счет накопленного осенью жира. В связи с этим она в состоянии выкормить медвежат лишь благодаря тому, что они рождаются крошечными, массой всего 400-500 г. (0,2 – 0,3% веса матери, тогда как, например масса новорожденных жеребят составляет около 10% от веса кобылы) и медленно растут. За теплое время года они успевают подрасти и зиме встречаются уже достаточно окрепшими.

Клесты-еловики (*Loxia curvirostra*) могут гнездиться не только весной и летом, но при наличии обильной пищи – осенью и даже зимой. Чаще всего они размножаются в конце зимы, когда еще лежит глубокий снег и бывают сильные морозы. Но именно этот период совпадает с наибольшим обилием семян ели и сосны. Гнезда у этих птиц относительно крупные, хорошо утепленные,

защищены от снега и дождя густыми еловыми ветвями. Период от начала насиживания яиц до вылета птенцов из гнезда составляет у клестов менее 4-х недель. Здесь ведущим фактором, инициирующим размножение, является питание.

Внешние сигналы о наступлении брачного периода воспринимаются через анализаторы центральной нервной системы и через гипоталамо-гипофизарную систему передаются гонадам, стимулируя созревание половых клеток (ооцитов и сперматозоидов) и усиливая синтез половых гормонов (эстрогенов и андрогенов), которые и обуславливают сложный комплекс физиологических и поведенческих реакций при размножении (ритуал ухаживания, спаривание, откладку яиц, вынашивание зародышей и т.п.). При этом половая система выполняет не только основную репродуктивную функцию, но влияет практически на все процессы жизнедеятельности. Так, например, под действием мужского гормона у большинства видов развиваются более крупные особи с более мощной мышечной системой и некоторыми морфологическими особенностями т.н. вторичными мужскими половыми признаками. Однако есть и исключения, так у хищных птиц самки обычно крупнее и мощнее самцов. Вторичные половые признаки включают не только внешние (экстерьерные) различия, но и различия в обмене веществ, энергии и т.п.

Факт гормональной функции гонад был описан еще в XIX веке Бертольдом и Броун-Секаром. В первой половине XX века половые гормоны были выделены из гонад и мочи в чистом виде, была изучена их химическая структура и осуществлен синтез. Основные гормоны половых желез относятся к классу стероидов, но кроме них гонады продуцируют также пептидные гормоны: релаксин, ингибин и аминокислоту тиразин.

Половые гормоны имеют свои, так называемые органы-мишени, где происходит их избирательное накопление. Их действие начинается только тогда, когда активный компонент препарата доставлен к мембране клетки-рецептора или внутрь нее. Гормоны на протеиновой основе начинают действовать, будучи доставлены к рецепторам, расположенным на клеточной мембране, стероидные и тиразиновые гормоны действуют на рецепторы, расположенные в цитоплазме и ядре клетки. Рецепторы к тестостерону обнаружены в клетках семенных канальцев, в придатке семенника, в простате, семенных пузырьках, в гипоталамусе и в матке. Рецепторы прогестерона и эстрадиола найдены в матке, яичниках, молочных железах, в интерстиции семенников, в простате, в гипофизе, гипоталамусе и других отделах ЦНС. Большинство гормонов переносится в виде комплексов с плазматическими белками, так называемыми переносчиками гормонов, причем связывание с переносчиками носит обратимый характер. Гормоны разрушаются соответствующими ферментами, обычно в печени. Наконец, гормоны и продукты их деградации выводятся из организма экскреторной системой, обычно почками. Все перечисленные процессы влияют на концентрацию гормонов и осуществляют контроль за передачей сигналов.

В органах-мишенях имеются клетки, несущие рецепторы, способные связывать гормоны и тем самым воспринимать гормональный сигнал. После связывания гормонов рецепторы передают информацию клетке и запускают цепь

биохимических реакций, определяющих клеточный ответ на действие гормона. Известны два основных типа передачи гормонального сигнала клеткам-мишеням. Липофильные гормоны, к которым относятся стероидные гормоны, свободно проникают через плазматическую мембрану внутрь клетки, где взаимодействуют с высокоспецифическими рецепторами (рис.20). Гормон-рецепторный комплекс в форме димера связывается в ядре с хроматином и инициирует транскрипцию определенных генов. Усиление или подавление синтеза мРНК (mRNA) влечет за собой изменение концентрации специфических белков (ферментов), определяющих ответ клетки на гормональный сигнал. Гидрофильные гормоны на протеиновой основе (рис. 20) оказывают действие на уровне клеточной мембраны.

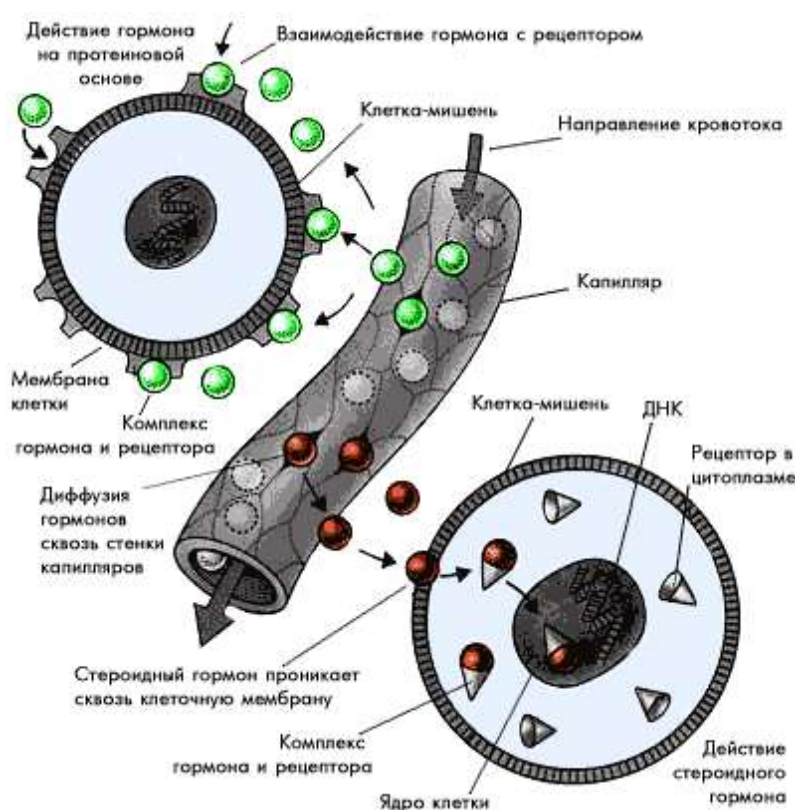


Рис. 20. Принципы передачи гормонального сигнала в клетках-мишенях

Гормоны циркулируют в крови в очень низких концентрациях. Последние, однако, сильно варьируют. Концентрация гормонов подвержена периодическим колебаниям, цикл или ритм которых может зависеть от времени дня, месяца, времени года или менструального цикла. Многие гормоны поступают в кровь импульсами и нерегулярно. Поэтому концентрация гормона может меняться эпизодически, как происходит в случае половых гормонов. Концентрация другой группы гормонов изменяется в зависимости от внешних факторов. Выброс гормонов является ответом организма на внешнее воздействие или на изменение внутреннего состояния.

После связывания половых гормонов с цитоплазматическим рецептором происходит перенос этих комплексов в ядро, где они соединяются с активными центрами ядерного хроматина. Соответственно возрастает содержание в цитоплазме РНК и активируется синтез специфических белков, что влечет за собой усиление метаболизма в клетках мишенях.

Цикличность половых процессов, как правило, более выражена у самок, тогда как у самцов обычно на протяжении всего репродуктивного периода имеет место т.н. «монотонный» уровень активности гонад. Однако у самцов некоторых видов, например у оленей, осенью наблюдается период интенсивной половой активности («половая охота» или «гон»), за которым следует длительный период половой импотенции и редукции сперматогенеза.

Эстрогены оказывают специфическое действие в женском организме на развитие половых органов. В частности, присутствие эстрогенов необходимо для развития фолликулов в яичниках, где они потенцируют влияние гонадотропных гормонов, увеличивая число рецепторов ЛГ в фолликулярных клетках. Эстрогены также потенцируют лютеотропные влияния гипофиза, поддерживая структуру и секреторную активность желтых тел. Особенно велико влияние эстрогенов на матку, влагалище и молочные железы. Они усиливают обмен веществ в этих органах. В матке увеличивается аэробный и анаэробный гликолиз, дыхание вследствие активации соответствующих ферментов, возрастает и синтез структурных белков. Благодаря этому происходит гипертрофия миоцитов, значительно увеличивается масса этого органа. Прогестерон является синергистом эстрогенов в этом процессе. Эстрогены увеличивают число митозов в эпителии матки и влагалища, вызывая его пролиферацию. Верхние клетки эпителия влагалища при этом погибают и слущиваются. Еще в 1917 году было показано, что у некоторых животных (грызунов) периодически происходит ороговение эпителия влагалища, что легко определяется по микроскопическому исследованию влагалищного мазка. При овариэктомии самок циклические изменения вагинального эпителия пропадают, стадия течки, характеризующаяся наличием ороговевших клеток (эструс), исчезает.

Прогестерон, действуя после эстрогенов, прекращает пролиферативные изменения в эпителии влагалища. В эндометрии он способствует его секреторному преобразованию, увеличивая число желез и их пролиферацию. Благодаря этому усиливается синтез специфических белков и других компонентов маточного секрета, необходимого для питания зародышей до имплантации. Разрыхление стенки матки под влиянием прогестерона, образование децидуальной ткани способствует nidации (имплантации в стенку матки) зародышей и образованию плаценты.

Эстрогены усиливают электрическую активность матки, ее сократимость и возбудимость. Прогестерон является их антагонистом в этом плане, вызывая расслабление матки, снимая ее возбудимость. Эти аспекты действия прогестерона необходимы для поддержания беременности. Перед родами, когда происходит усиление сократительной деятельности матки, влияние эстрогенов на нее возрастает, а прогестерона падает.

В действии на молочную железу эстрогены и прогестерон являются си-

нергистами, причем эстрогены вызывают рост протоков, а прогестерон – альвеол. Однако эффект половых гормонов на молочную железу проявляется лишь при условии влияния гормонов гипофиза в первую очередь пролактина и других гормонов. Эстрогены увеличивают синтез пролактина. Прогестерон его тормозит. Резкое падение продукции половых гормонов после родов способствует увеличению секреции пролактина и наступлению лактопоэза.

Важным аспектом действия половых гормонов является их влияние на ЦНС, в частности на гипоталамус. Прежде всего, они участвуют в регуляции секреции гонадотропинов, подавляя их избыточную продукцию. В женском организме половым гормонам, особенно эстрогенам, принадлежит важная роль в стимуляции секреции гонадотропинов в предовуляторный период, которые вызывают овуляцию созревших фолликулов. Эстрадиол и тестостерон стимулируют также развитие полового поведения у самок и самцов. Эстрогены в период эструса, соответствующий моменту овуляции, возбуждают гипоталамус, вызывая характерное поведение самок (лордоз, позы неподвижности, рецепцию самцов). У самок приматов усиление полового влечения достигается наряду с эстрогенами, также и воздействием андрогенов. Прогестерон, усиливая вначале половое поведение, затем его тормозит. Половые гормоны помимо воздействия на половые органы и ЦНС оказывают влияние на другие системы организма. Эстрогены, как и андрогены, - являются мощными анаболическими факторами, вызывая развитие мускулатуры. Они стимулируют защитные силы организма. Прогестерон является слабым иммунодепрессантом, что, по-видимому, важно для подавления иммунологического конфликта между матерью и плодом при беременности. Кроме того, половые гормоны влияют на обмен электролитов и воды, особенно в коже и почках.

Кроме гонад, источником половых гормонов в организме является и кора надпочечников, относительный вклад которой особенно велик у неполовозрелых особей, когда эндокринная функция гонад еще невелика.

С наступлением брачного периода в гипофизе самцов усиливается синтез лютеинизирующего гормона (ЛГ), стимулирующего интерстициальные клетки. Попадая через кровь в мужские гонады ЛГ, в свою очередь, стимулирует секрецию интерстициальными клетками семенника стероидного гормона – тестостерона. Тестостерон наиболее важный представитель андрогенов (мужские половые гормоны). Он синтезируется клетками Лейдига в семенниках и контролирует развитие и функцию половых желез. Этот гормон отвечает также за развитие вторичных мужских половых признаков (развитие мускулатуры, волосяной покров и т.п.). В семенниках тестостерон оказывает местное действие, поддерживая сперматогенез, но выделяясь также в кровь он оказывает специфическое действие на разные органы, в том числе на центральную нервную систему. Во многих тканях – мишенях тестостерон превращается в дигидротестостерон, обладающий более сильным действием. Тестостерон действует на гипоталамо-гипофизарную систему таким образом, что уровень тестостерона в крови находится в постоянном равновесии с синтезом и секрецией гонадотроп-

ных гормонов гипофиза – ФСГ и ЛГ. В целом, высокий уровень тестостерона подавляет секрецию этих гормонов, а низкий – стимулирует ее.

Кроме тестостерона семенники вырабатывают также **андростерон, андростендион и дигидроэпиандростен.** Все эти мужские стероидные гормоны являются производными **андростана.** Процесс стероидогенеза в семенниках в основном останавливается на стадии образования андрогенов, однако небольшое количество их в дальнейшем превращается в женские половые гормоны (эстрогены) и секретируется в кровь. Основными продуцентами стероидных гормонов в семенниках являются клетки Лейдига. Уровень секреции андрогенов зависит от концентрации ЛГ.

Андрогены в мужском организме очень важны для стимуляции сперматогенеза наряду с влиянием ФСГ. Последний стимулирует деление сперматогоний, а тестостерон необходим для активации образования сперматоцитов и сперматид. Андрогены способствуют образованию рецепторов гонадотропинов в семенниках и тем самым потенцируют их влияние. В мужских половых органах андрогены активируют обмен веществ и пролиферацию клеток, способствуя их росту и развитию. В женском организме они также способствуют биосинтезу белка в клетках половой сферы.

Андрогены, в частности тестостерон, являются мощными анаболическими факторами, стимулирующими развитие соматической мускулатуры (что нередко используется в спортивной практике). Они усиливают активность иммунной системы, способствуя укреплению защитных сил организма.

Под влиянием повышенной концентрации тестостерона в крови у самцов развивается брачное поведение (иногда очень сложное), в свою очередь ускоряющее созревание половых клеток и ведущее к отбору для размножения наиболее крепких самцов. Этой цели служат разнообразные брачные ритуалы – токование и пение птиц, турнирные бои оленей и т.п.

Брачное поведение самцов стимулирует развитие гамет в яичниках у самок, после чего самки и самцы на некоторое время (часы, сутки) становятся способны к размножению. В это время у особей обоих полов под влиянием половых гормонов возникает очаг стойкого возбуждения в коре больших полушарий и в подкорковых центрах – **«половая доминанта».** Под прессом половой доминанты ослабевает инстинкт самосохранения, животные на какое-то время забывают о пище, питье, сне. В период гона мобилизуются все ресурсы организма, причем настолько, что у многих видов копытных самцы истощаются и погибают после спаривания. После гона у самцов выработка половых гормонов снижается. А половая система самок после оплодотворения остается активной на все время вынашивания или высиживания потомства и его выращивания, и только потом приходит в состояние покоя.

У самок полициклических видов (насекомоядные, некоторые грызуны, приматы), как только заканчивается выращивание потомства в яичниках начинают расти развиваться новые ооциты, что приводит к новой беременности. Так у многих грызунов короткие периоды беременности (около 3-х недель) и лактации (примерно такое же время) повторяются без перерывов на всем про-

тяжении репродуктивного периода жизни самки. Сходно функционирует половая система и у приматов, включая человека.

В то же время описаны относительно простые половые циклы, состоящие лишь из фолликулярной стадии, в течение которой происходит рост и созревание яиц и выведение их во внешнюю среду (у большинства беспозвоночных, у рыб, земноводных и пресмыкающихся). У птиц половой цикл состоит из трех стадий: фолликулярной (рост, созревание и овуляция яиц в яичниках и яйцеводах), стадии инкубации и стадии вскармливания птенцов.

Полный половой цикл свойствен плацентарным млекопитающим и включает четыре стадии: **проэструс, эструс, метаэструс, диэструс.**

Период повышенной половой активности самок ("течка" или "эструс") внешне проявляющийся в поведении, имеет в основе определенные морфофункциональные перестройки органов размножения и совпадает по времени с овуляцией. Если в этот период не произойдет оплодотворения, то наступают регрессивные изменения и для повторной готовности к размножению организм вновь должен пройти период подготовки. Этот повторяющийся ряд изменений получил название эстрального или **полового цикла**. В отсутствии беременности он складывается из следующих стадий: 1) короткий период полной готовности к размножению, сопровождающийся половым влечением - **эструс**; 2) период регрессии, наступающий при отсутствии оплодотворения - **метэструс**; 3) период покоя - **диэструс**; 4) подготовительный к размножению период - **проэструс**.

Изменение гормонального статуса организма в различные периоды эстрального цикла в первую очередь сказывается на органах половой системы, включающей яичники, половые проводящие пути и матку. Из позвоночных у круглоротых, рыб, амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих матка отсутствует. Строго говоря, среди современных позвоночных внеутробное развитие является единственным вариантом лишь у круглоротых и птиц. Во всех остальных классах позвоночных наблюдаются виды и с внеутробным типом развития (яйцекладущие) и "живородящие" виды, у которых ранние этапы онтогенеза протекают в полостях материнского организма: либо в полости яйцевого фолликула, либо в яичнике, либо в специализированном отделе яйцевода - матке. Внутриутробный тип развития среди рыб особенно часто встречается в отряде карпообразных, в большинстве семейств пластинчатожаберных, в отряде акулобразных (у колючей акулы *Squalus acanthias* беременность растянута до 22 месяцев), у кистеперых рыб, из земноводных у африканских жаб, у некоторых саламандр и у многих безногих амфибий. Среди современных рептилий, внутриутробное развитие встречается только у чешуйчатых. У удавов (семейство *Boidae*), например, беременность продолжается около 5 месяцев, после чего рождаются до 30 молодых змеек длиной 50-55 см. Впервые в эволюции позвоночных специализированная матка, как орган внутриутробного развития, появляется у сумчатых. Однако она имеет примитивное строение и зародыши находятся в ней очень короткое время. Иногда говорят о яйцеживорождении у сумчатых, поскольку скорлуповая оболочка сбрасывается в самом конце короткого периода беременности (у кенгуру *Setonix brachyurus*) зародыши освобождаются от скорлуповой оболочки на 19 день беременности при ее об-

щей продолжительности 27 дней (Hughes, 1974г.). Донашивание зародышей происходит в сумке на животе матери. То есть, эмбриогенез у сумчатых фактически распадается на внутриматочный и "внутрисумочный" этапы. Наиболее сложное строение имеет женская половая система у плацентарных млекопитающих. Под действием гонадотропных гормонов гипофиза в различных органах половой системы самки происходят соответствующие циклические синхронные превращения:

1. На стадии **проэструс** в яичниках происходит развитие яйцеклеток, сопровождающееся секрецией фолликулярных гормонов - эстрогенов; одновременно в матке наблюдается разрастание слизистой оболочки, утолщение мышечных слоев и усиление кровоснабжения. В яичнике эта фаза называется фолликулярной, а в матке - пролиферативной (рис. 21).
2. На стадиях **эструс** и **метаэструс** в яичнике происходит овуляция яйцеклетки (яйцеклеток), которая в окружении фолликулярных клеток выделяется в брюшную полость и попадает в воронку яйцевода, через который в случае оплодотворения спускается в матку и имплантируется в слизистую оболочку (рис. 21), где затем формируется **плацента**.



Рис.21. График суммирующий изменения, происходящие в эндометрии во время обычного менструального цикла и следующего за ним цикла, в котором наступила беременность (из Карлсона, 1983). Вверху показаны коррелятивные изменения, происходящие в эти же сроки в яичниках. I-менструация; II- пролиферативная фаза; III-секреторная фаза; IV-неполный цикл; V-образование плаценты

На месте лопнувшего Граафова пузырька в яичнике образуется **желтое тело**, вырабатывающее половой гормон - **прогестерон**. Синхронно в матке идет секреторная стадия: стенки матки еще более утолщаются, кровеносные сосуды переполняются кровью, железы эндометрия выделяют обильный секрет. Если беременность не наступает, то все возвращается в исходное состояние покоя.

Одной из особенностей многих видов птиц и млекопитающих является

необходимость стимуляции точковых фолликулов и их овуляции. Таким стимулом может быть нервное возбуждение во время гона, сам по себе ритуал ухаживания, коитус и т.д. После спаривания овуляторные фолликулы увеличиваются в размерах и изменяются морфологически. В этих случаях овуляция происходит только после определенной задержки вслед за спариванием (например, у некоторых куных через 30-75 часов).

Гормональная регуляция женского полового цикла у млекопитающих

Все гормональные системы, включая гормоны полового цикла, обычно взаимосвязаны и в ряде случаев образуют иерархическую лестницу. Наиболее важной из них является система гормонов гипофиза и гипоталамуса, контролируемая центральной нервной системой (ЦНС). На стимулирующее или тормозящее воздействие нервные клетки гипоталамуса отвечают выбросом стимулирующих или ингибирующих гормонов, которые носят групповое название либерины (рилизинг-факторы) и статины (ингибирующие гормоны). Гонадотропные гормоны гипофиза - лютеинизирующий (ЛГ) и фолликулостимулирующий (ФСГ) - это гликопротеиды с молекулярным весом 28 000 и 35 000 дальтон. Освобождение ЛГ и ФСГ из гипофиза в кровь регулируется гипоталамусом (рис. 22), который выделяет **либерины (релизинг-факторы, факторы высвобождения гормонов)**. Химически - это декапептиды. Эти нейроморфоны через короткие сосуды достигают аденогипофиза, где стимулируют (либерины) или ингибируют (статины) биосинтез и секрецию так называемых тропинов. Гонадотропины, например, стимулируют биосинтез стероидных гормонов в половых железах. Стероидные гормоны действуют только на клетки-мишени, а по механизму обратной связи, подавляют синтез или секрецию других гормонов регуляторного каскада.

Именно к этой гормональной иерархической лестнице принадлежат, такие липофильные гормоны, как эстрадиол, прогестерон и тестостерон. Они не накапливаются в железах, а секретируются в кровь сразу после завершения биосинтеза (исключение составляет тироксин). При транспортировке в крови они связываются со специфическими плазматическими белками (переносчиками). Все липофильные гормоны действуют по общему механизму, т. е. связываются с внутриклеточным рецептором и регулируют транскрипцию определенных генов. Наиболее важными представителями стероидных гормонов позвоночных являются прогестерон, кортизол, альдостерон, тестостерон и эстрадиол. Общим предшественником стероидных гормонов является холестерин. Наконец, стероиды выводятся из организма с мочой и частично с желчью. Содержание стероидов в моче используется в качестве критерия при изучении метаболизма стероидов.

Под действием ФСГ и ЛГ фолликулы начинают вырабатывать стероидные гормоны **17В-эстрадиол** и **прогестерон**. По своей химической природе они относятся к стероидам. Эстрадиол называют эстрогенным гормоном, т.е. вызывающим течку (эструс). Эстрогенным действием обладают также **эстрон** и

эстриол. Эстрон и эстрадиол являются первичными гормонами яичника, а эстриол представляет продукт их обмена. **Прогестерон** - гормон, который секретируется лютеиновыми клетками желтого тела яичника и химически является дикетоном. Помимо этого, яичники секретируют в незначительном количестве мужские половые гормоны-андрогены. В яичниках последние являются промежуточными продуктами при синтезе эстрогенов. Все фолликулы, за исключением одного, вскоре дегенерируют, а единственный оставшийся, т.н. **преовуляторный фолликул**, в конце фолликулярной фазы цикла секретирует все возрастающее количество эстрадиола. Резкое повышение секреции эстрадиола действует на гипоталамо-гипофизарную систему, повышается уровень синтеза и секреции гипоталамического либерина, что, в свою очередь, вызывает резкое увеличение секреции ЛГ и ФСГ, уровень которых также достигает максимума. Максимум концентрации ЛГ -последний стимул, необходимый для созревания фолликула, после чего в течение суток происходит овуляция.

Вскоре после овуляции ведущая роль в секреции эстрадиола и прогестерона переходит к **желтому телу**. Максимум концентрации этих гормонов в крови приходится примерно на середину лютеальной фазы. Постепенное повышение уровня стероидных гормонов в крови ведет к ингибированию секреции ЛГ и ФСГ, так что уровень их в крови сильно снижается. В конце лютеальной фазы желтое тело начинает регрессировать, секреция яичниками эстрадиола и прогестерона снижается, что стимулирует продукцию релизинг-факторов гипоталамусом, а вслед - гонадотропных гормонов гипофизом. Затем начинается новый цикл.

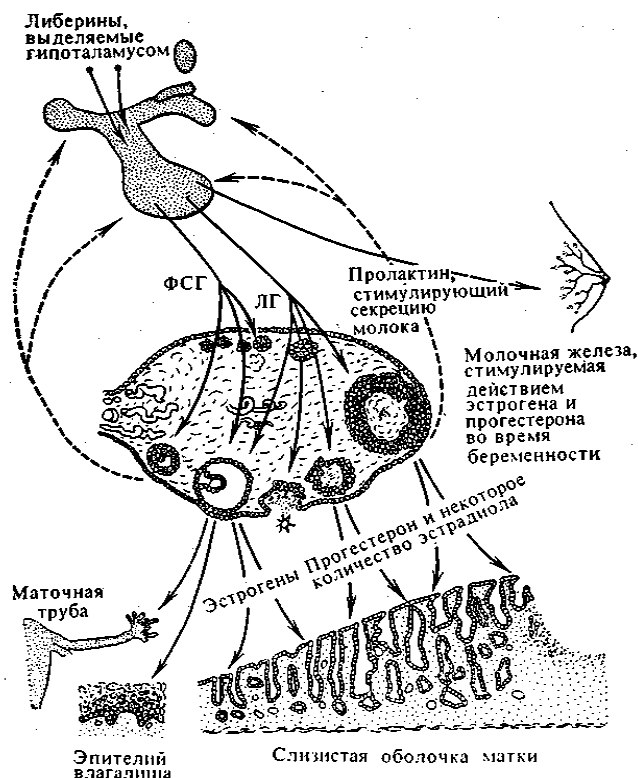


Рис.22.Схема, иллюстрирующая взаимодействие между гормонами передней доли гипофиза и яичником, обеспечивающее регуляцию основных событий в репродуктивном цикле человека

Необходимо запомнить, что гормоны яичника оказывают разнообразные эффекты на различные части женских половых путей. Так эстроген вызывает увеличение числа реснитчатых клеток в маточных трубах и изменяет содержащуюся в яйцевом жидкость. Эстрадиол отвечает за развитие вторичных женских половых признаков (молочных желез, характер жировых отложений и т.д.). Быстрое снижение уровня эстрадиола непосредственно перед овуляцией стимулирует повышение подвижности гладкой мускулатуры в маточных трубах, перистальтика которых обеспечивает перемещение овулировавшего яйца.

Эстрадиол стимулирует разрастание эндометрия и маточных желез, а прогестерон подготавливает слизистую матки к имплантации зародыша: в случае возможного оплодотворения - слизистая утолщается, возрастает степень ее васкуляризации.

Под действием гормонов также снижается вязкость слизи в шейке матки, что облегчает проникновение в матку сперматозоидов.

Большую роль в сохранении беременности играет секреторная активность желтого тела, выделяющего прогестерон и эстроген. Желтое тело растет и продуцирует гормоны под действием выделяемого внезародышевыми тканями эмбриона гормона - **хориогонического гонадотропина**. Уровень прогестерона в крови беременных самок резко возрастает к моменту имплантации зародыша и обычно снижается перед родами. Важную роль при этом играет активация гормональной функции желтого тела. Поддержание функциональной активности желтого тела обеспечивается действием гонадотропных гормонов и гипофизарного гормона - пролактина.

Несколько слов о большей резистентности женских организмов по сравнению с мужскими. В связи с волнообразной динамикой половых циклов женские особи характеризуются значительными колебаниями адаптационных возможностей по сравнению с самцами. Считается, что женский организм наиболее устойчив на стадиях диэструса и метаэструса (на фоне прогестерона) и менее резистентен в проэструсе и эструсе (фазах повышенной секреции эстрогенов).

Установлено, что во всех случаях, когда организм испытывает те или иные перегрузки, предъявляющие дополнительные требования к адаптации, у

самок происходит задержка половых циклов на стадиях диэструса и метэструса, когда организм наиболее устойчив.

Стрессовые нагрузки могут вызывать выпадение половых циклов - **аме-норею**. Аменорея описана у самок обезьян в Сухумском питомнике (ее легко диагностировать по набуханию половой кожи) после особенно бурных драк и ссор, при общих заболеваниях, при разлуке с близкими обезьянами и т.д. Выпадение менструальных циклов описано у женщин, перенесших сильные отрицательные эмоции, чрезмерные физические нагрузки и т.п.

Вопросы для самоконтроля:

1. Цикличность в функционировании органов половой системы животных.
2. Динамика секреции половых гормонов в онтогенезе и в разные сезоны года.
3. Понятие о моноциклических и полициклических видах животных.
4. Однократный, сезонный, непрерывный половые циклы.
5. Ритмика овуляции.
6. Гормональная регуляция полового цикла.
7. Значение фотопериодичности в цикличности половых процессов.
8. Половые гормоны и органы – мишени. Влияние половых гормонов на ЦНС, на поведение, другие органы и ткани животных.
9. Понятие о «половой доминанте».
10. Стадии полового цикла. Циклические изменения в органах половой системы самок.
11. Гормональная регуляция полового цикла у млекопитающих. Система гипоталамус – гипофиз – гонады.
12. Гормональная функция желтого тела.

ГЛАВА СЕДЬМАЯ

ОСЕМЕНЕНИЕ И ОПЛОДОТВОРЕНИЕ

Оплодотворение, его биологическое значение. Осеменение. Дистантное взаимодействие гамет. Акросомная реакция спермиев и ее роль в соединении гамет. Физиологическая моно- и полиспермия. Активация яйца. Две фазы активации: импульс активации и кортикальная реакция. Образование перивителлинового пространства. Механизмы защиты яйца от проникновения многочисленных спермиев у физиологически моноспермных животных. Сингамия. Биохимические изменения в оплодотворенном яйце-зиготе (дыхание, репликация ДНК, синтез белка). Искусственное осеменение и его значение в рыбоводстве, птицеводстве, животноводстве и медицине. Хранение гамет. Длительность и условия сохранения яйцами и спермиями оплодотворяющей способности.

Гаметы - яйцеклетки и сперматозоиды после созревания живут обычно недолго, как правило, от нескольких часов до нескольких суток.

Но в случае слияния яйцеклетки и спермия образуется зигота, которая является начальным этапом в развитии нового индивидуума, у которого впереди -целая жизнь.

В природе встречается развитие и без оплодотворения, но это исключение. **Партеногенез** - половое, но однополое размножение возник в эволюции у раздельнополых форм. Партеногенез следует различать от бесполого размножения, которое осуществляется всегда при помощи соматических органов и клеток. Различают естественный партеногенез, встречающийся в природе и искусственный, вызываемый экспериментально действием различных факторов на неоплодотворенную яйцеклетку, в норме нуждающуюся в оплодотворении. Часто партеногенетические виды и расы являются полиплоидными и возникают в результате отдаленной гибридизации, обнаруживая ввиду этого гетерозис и высокую жизнеспособность.

Обычным девственным размножением является лишь для некоторых насекомых, низших ракообразных, коловраток, моллюсков, а среди позвоночных - у нескольких видов ящериц (*Lacertia sacculicola*, например). Кроме ящериц, партеногенез в природных популяциях позвоночных обнаружен лишь у костистых рыб *Poecilia* и у саламандр *Ambystoma* (Cuellar, 1974). Существуют линии индюков, неоплодотворенные яйца которых способны развиваться, давая лишь самцов. У балтийской сельди (салаки) способность к партеногенезу отмечена у икры от 56% самок.

Различают облигатный и факультативный партеногенез. При облигатном яйца способны только к партеногенетическому развитию, а при факультативном - могут развиваться и в результате оплодотворения. У пчел, например, из неоплодотворенных яиц развиваются самцы (трутни), а из оплодотворенных -

самки (матки и рабочие пчелы, в зависимости от уровня питания). Многие виды животных, не имеющие самцов, способны к длительному размножению путем партеногенеза - так называемый константный партеногенез. У некоторых видов наряду с партеногенетической женской расой существует обоеполая раса (исходный вид), занимающая иногда другой ареал (географический партеногенез): бабочки чехлоноски, многие жуки, многоножки, а из позвоночных - ящерицы.

По способности давать посредством партеногенеза самцов и самок различают:

1. «**Аррентокию**» - при этом из неоплодотворенных яиц развиваются гаплоидные самцы (у перепончатокрылых), а из оплодотворенных – диплоидные самки. Популяция с таким способом размножения не утрачивает медленно реализующихся эволюционных преимуществ полового размножения.
2. «**Телитокию**» - развитие из неоплодотворенных яиц самок. Этот вариант может встречаться облигатно, циклически, факультативно, или как редкое исключение.
3. «**Дейтеротокию**»- при которой развиваются особи обоего пола.

Различают два типа телитокии – апомиктическую и аутомиктическую с различными генетическими результатами. При апомиксисе мейоз подавлен и происходит лишь одно митотическое деление созревания, в результате чего потомство оказывается генетически тождественно матери. При аутомиксисе мейоз протекает нормально, приводя к формированию четырех гаплоидных пронуклеусов. Диплоидный набор хромосом восстанавливается в результате слияния либо двух пронуклеусов, либо двух ядер дробления. В обоих случаях потомство генетически отличается от матери и является более гомозиготным по сравнению с ней.

В противоположность аутомиксису характерной особенностью апомиксиса является сохранение генетической гетерозиготности, что является более прогрессивным в эволюционном плане. Поэтому апомиксис широко распространен у жуков долгоносиков и является единственной формой размножения.

Существует еще один механизм телитокии, описанный у наиболее преуспевающей группы среди партеногенетических позвоночных. Известно около 30 рас партеногенетических ящериц из пяти родов, в том числе степные ящерицы *Lacerta*, gekkonys *Hemidactylus* и американские вараны *Chemidophorus* (Maqlin, 1971). У *Snemidophorus* (Cuellar, 1971) происходит премейотическое удвоение хромосом (эндомитоз), а затем - внешне нормальный митоз с диплоидным (а в некоторых расах - триплоидным) числом бивалентов, в результате чего ядра яиц получают родительский набор хромосом.

Генетические последствия этого процесса зависят от того, каким образом происходит образование бивалентов. Если (что весьма вероятно) пары образуют только сестринские хромосомы, то этот процесс генетически эквивалентен апомиксису. Потомство остается генетически тождественным своим родителям и при этом сохраняется гетерозиготность. Если же биваленты образуются не-сестринскими хромосомами, то гомозиготность нарастает.

Гиногенез – редкий тип размножения, известный для немногих животных,

генетические популяции которых представлены исключительно самками. Обычно гиногенез является результатом неполноценного оплодотворения, когда спермий проникает в яйцо, но в ооплазме он инактивируется и не соединяется с женским пронуклеусом. Через некоторое время ядро его элиминируется. Роль спермия при данном способе размножения не ясна. Высказываются предположения, что он вносит в ядро centrosому – аппарат клеточного деления или вызывает своеобразный «физиологический гетерозис». То есть лишь побуждает яйцеклетку к развитию. Однако успешное развитие гиногенетических зародышей возможно лишь при сохранении яйцом нередуцированного числа хромосом, что достигается разными видоспецифическими способами (Черфас, 1987).

У серебряного карася на Дальнем Востоке имеются популяции состоящие как из самцов, так и из самок, а в водоемах Урала, Северного Кавказа, средней полосы РФ найдены популяции состоящие исключительно из самок. Показано, что икра у них, тем не менее

оплодотворяется, однако самцами других видов, размножающимися в это же время.

Обычная (двуполая) форма карася имеет в диплоидном наборе 94-100 хромосом, а однополая – 135-146, т.е. она триплоидна. У триплоидной формы в профазе мейоза не происходит конъюгации хромосом и не образуются биваленты. Первое созревательное деление является абортным и не приводит к редукции числа хромосом. Сначала образуется трехполюсное веретено и хромосомы-униваленты распределяются между полюсами этого веретена, затем оно преобразуется в двухполюсное. Таким образом, яйцо овулирует на метафазе второго деления мейоза, но поскольку первого деления не было, то фактически это первое деление. Завершается деление мейоза после проникновения спермия другого вида в яйцо, как и обычно. Однако в этом случае спермий не образует пронуклеуса, окружается мембранами и исключается из развития. Таким образом, фактически онтогенез идет только за счет женского ядра.

Гиногенетическими формами являются три- и тетраплоидные формы щиповки *Cobitis*, триплоидные формы рыб рода *Rutilus* из сем. Карповых (предполагают, что они имеют гибридное происхождение, Collares-Pereira, 1988), триплоидные формы пецилиевых.

В 80-х годах разработаны методы получения гиногенетического потомства у видов, размножающихся обычно половым путем. Для этого, во-первых, не допускают в ооцитах редукции числа хромосом (обычно диплоидизация икры достигается температурным шоком); во-вторых - производят генетическую инактивацию спермиев (действием ионизирующего облучения или химических веществ типа диметилсульфат). Индуцированный диплоидный гиногенез получен у осетровых, лососевых, сиговых, камбаловых, карповых, вьюновых и других семейств рыб.

Андрогенез. При андрогенезе развитие зародыша происходит под контролем лишь мужского ядра, без участия женского. В естественных популяциях позвоночных, размножающихся этим способом не описано. Андрогенетическое потомство получают экспериментальным путем. Для этого проводят гене-

тическую инактивацию женских хромосом облучением яиц рентгеновскими или ультрафиолетовыми лучами, а затем вызывают диплоидизацию мужских хромосом. Последнее достигается объединением хромосом при первом делении дробления или проникновением в яйцо двух спермиев. Андрогенетические диплоидные зародыши были получены в Японии у дальневосточного лосося-симы О. Masu. При этом для диплоидизации использовали гидростатическое давление (Yamazaki, 1983).

У млекопитающих партеногенеза не наблюдается, что обычно связывают с неравнозначностью мужского и женского пронуклеусов (ядер гамет). Считается, что, хотя у многих видов оба эти пронуклеуса эквивалентны, у млекопитающих между ними имеются значительные функциональные различия. Возможно, они обусловлены разными модификациями, претерпеваемыми ДНК в ядрах сперматозоидов и яйцеклетки. В опытах по пересадке пронуклеусов мышей (McGrath, Solter, 1984) были получены зиготы с двумя мужскими и с двумя женскими пронуклеусами. Эти зиготы дробились, но их развитие обычно тормозилось примерно на середине беременности мыши.

Весьма интересен т.н. факультативный партеногенез, встречающийся у пчел, ос, муравьев. Царица-матка у этих видов может откладывать как оплодотворенные, так и неоплодотворенные яйца. Оплодотворенные яйца у пчел развиваются в личинки самок - рабочих пчел или, при обильном кормлении - в цариц, а неоплодотворенные - в личинки самцов (трутней).

Еще в 19 веке было замечено, что возможна искусственная стимуляция неоплодотворенных яйцеклеток к развитию обработкой их различными химическими соединениями, механическим воздействием, нагреванием и т.п. Зоолог А.А. Тихомиров еще в 1886 г. получил гусениц и половозрелых бабочек после активации неоплодотворенных яиц тутового шелкопряда в результате химических и физических воздействий (концентрированной серной кислотой, изменением температуры и т.д.). Академик Б.Л. Астауров в 1930-1960 гг. в результате длительных исследований, ставших классическими, разработал массовый метод активации неоплодотворенных яиц тутового шелкопряда к развитию термическим воздействием, которое одновременно активировало неоплодотворенное яйцо к развитию и блокировало стадию мейоза, т.е. превращение диплоидного ядра яйцеклетки в гаплоидное. При этом развитие заканчивалось вылуплением личинок, точно повторяющих генотип матери, включая и пол.

Несмотря на успех в чисто научном плане, ему пришлось пережить огромное разочарование: партеногенетическое потомство отличалось пониженной жизнеспособностью на эмбриональных и постэмбриональных стадиях развития. Среди гусениц было много уродливых, а их коконы (исходное сырье для шелка) по массе уступали нормальным.

Его ученику, академику РАН В. А. Струнникову (1977 г., 1982 г.) в результате многочисленного отбора удалось накопить в генотипе селектируемых клонов шелкопряда большое число генов, обуславливающих высокие склонности к партеногенезу и жизнеспособность. Однако самые сверхжизнеспособные клоны от лучших гибридных самок оказались непригодны для практического применения, так как самки шелкопряда съедают на 20% больше листа шелко-

вицы, а шелка дают на 20% меньше самцов. В лаборатории Струнникова удалось добиться клонирования самцов тутового шелкопряда. Тем самым, его сотрудники смогли решить проблему массового получения желаемого пола и резко повысить гетерозис путем гибридизации "чистых" линий.

Возвращаясь к половому размножению можно сказать, что в результате оплодотворения все меняется в жизни яйца. До оплодотворения яйцо находится в заторможенном состоянии, метаболические процессы заметно редуцированы. Но в то же время в нем идет накопление питательных веществ в виде желточных включений.

Уже самый первый контакт спермия с поверхностью яйца служит толчком для активации яйца к развитию. Описаны случаи так называемого "незавершенного оплодотворения", когда спермий только контактирует с яйцом, не проникая в него, тем не менее происходит активация яйцеклетки (чаще всего при оплодотворении яиц спермой родственного вида).

Но помимо эффекта активации, спермий вносит в яйцо полный набор хромосом отцовского организма, т.е. в результате оплодотворения происходит объединение родительских генов. Таким образом, в популяции возникает множество новых комбинаций наследственных факторов, создается генетическое разнообразие организмов.

Осеменение

У большинства водных животных осеменение наружное: яйца и спермий выбрасываются непосредственно в воду, где и происходит оплодотворение. При этом, естественно, сперма должна выделяться возможно ближе к яйцекладке и, желательно, одновременно. У неподвижных и малоподвижных животных особи обоего пола образуют большие скопления и синхронно выбрасывают половые продукты в воду, где происходит массовое оплодотворение яиц.

Для большинства подвижных животных характерны различные формы брачного поведения, самец и самка сближаются и одновременно выделяют половые продукты. Процент оплодотворенных яиц при этом достаточно высок. При наружном осеменении очень важно максимальное сближение яиц и спермиев, так как в воде они очень быстро теряют способность к оплодотворению - в морской воде через несколько часов, а в пресной - уже через несколько минут. Что касается способности спермиев к самостоятельному движению, то она очень ограничена, так, например, спермий морского ежа за 1 минуту проплывает около 10 мм, а спермий щуки еще меньше - 6 мм. Следует учесть, что очень часто половые продукты рассеиваются при наружном осеменении токами воды, например течением. Отсюда понятен феномен колоссальной продукции гамет животными с наружным осеменением: самками морского ежа, трески и др.

Причем особенно много спермиев продуцируют рыбы, нерестящиеся в реках с быстрым течением (лососи, белый амур в эякуляте которых содержится порядка 100-200 млрд. спермиев). У водных животных с внутренним осемене-

нием, например у акул, самцы которых вводят сперму непосредственно в половые пути самки, вероятность встречи гамет резко возрастает, и поэтому нет необходимости в их огромном количестве.

Внутреннее осеменение возникло, вероятно, как одна из адаптаций к жизни на суше, поскольку в воздухе семенная жидкость (сперма) быстро высыхает. При внутреннем осеменении сперма с помощью специальных копулятивных органов вводится непосредственно в половые пути самки.

Иногда у видов с внутренним осеменением эякулят представляет собой не взвесь спермиев, а их агрегаты, так называемые сперматофоры и сперматоцейгмы. Сперматофоры - это покрытые снаружи слоем студенистой субстанции клубочки склеенных слизистым веществом спермиев. Агрегаты спермиев без студенистой оболочки, встречающиеся в частности у живородящих рыб, называются сперматоцейгмами. Для большинства рыб с внутренним осеменением характерна способность спермиев чрезвычайно долго сохранять оплодотворяющую способность в половых путях самки (до года и более у акул и гуппи).

Промежуточным способом, между наружным и внутренним осеменением, как показал академик М.С. Гиляров, является наружно-внутреннее осеменение у некоторых низших почвенных наземных членистоногих. Многие почвенные субстраты по водному режиму занимают промежуточное положение между водной и воздушной средой. При этом самец выделяет сперму во внешнюю среду, часто в виде окруженных оболочкой скоплений спермиев - сперматофоров. Сперматофор переносится в половое отверстие или самцом, или самой самкой.

Сходный способ осеменения встречается у некоторых хвостатых амфибий.

Обычно выведение спермы из семенников и их придатков у большинства видов животных происходит порционно, что способствует повышению эффективности оплодотворения. Объем одной порции спермы (эякулята) колеблется обычно между 0,5-150 мл, но может достигать у крупных животных огромных величин - до 18 литров у китовой акулы, например. Продукционные возможности определяются не только объемом спермы, но и концентрацией спермиев в единице объема эякулята. У млекопитающих обычно в 1мл эякулята содержится около 100-150 млн. спермиев (около 130 млн. на 1 мл у человека). Гораздо выше концентрация спермиев у рыб.

Но во всех описываемых случаях из-за больших потерь спермиев при переносе к месту оплодотворения, их количество многократно превышает численность яйцеклеток. Например, у человека из примерно 100 млн. спермиев, содержащихся в эякуляте, до верхней трети яйцевода, где собственно и происходит оплодотворение, доходит всего несколько тысяч. Один из них и оплодотворяет, как правило, единственную овулировавшую яйцеклетку. У морских ежей, которые выделяют за сезон колоссальное число яиц (до 400 млн.), количество спермиев намного больше (до 100 триллионов).

Искусственное осеменение

Актуальность проблем размножения в сельском хозяйстве вызвана в частности тем, что животноводы всегда старались получить максимальный приплод от наиболее выдающихся по своим продуктивным качествам производителей. Присловие: "Добрый бык - половина стада" существует у разных народов. Но естественным путем животные, племенные производители (быки, жеребцы, бараны и др.) в состоянии осеменить относительно небольшое число самок (от нескольких десятков до нескольких сотен, не более). В связи с этим поиск методов повышения эффективности использования спермы ценных животных шел очень давно.

Крупный шаг в разработке этих проблем был сделан во второй половине XVIII века аббатом Лазаро Спалланцани, который с помощью разнообразных, глубоко продуманных опытов доказал, что для развития икры лягушки или жабы необходимо воздействие на нее семенной жидкости самца, которая вырабатывается в семенниках и собирается в семенных пузырьках. Л. Спалланцани установил факт, сыгравший впоследствии колоссальную роль в животноводстве, что для успешного оплодотворения достаточно чрезвычайно малого количества спермы, разбавленного во много раз водой. Иногда разведение спермы было настолько большим, что он не находил под микроскопом сперматозоиды и вследствие этой ошибки, проистекавшей из несовершенства оптической техники, пришел к выводу, что оплодотворяющим действием обладают не сами сперматозоиды, а жидкая часть спермы. Спалланцани удалось получить развитие яиц при искусственном осеменении не только у яйцекладущих животных (амфибий, тутового шелкопряда), но и у живородящего вида, у собаки. Введя в матку шприцем сперму кобеля он получил через 2 месяца трех здоровых щенков, обнаруживающих сходство не только с матерью, но и с отцом.

После блестящих работ Л. Спалланцани прошло много лет, прежде чем метод искусственного осеменения был введен в практику. Раньше это произошло в рыбоводстве.

Искусственное осеменение икры рыб впервые осуществил в 1763г. в Германии Стефан Людвиг Якоби, который еще до работ Л. Спалланцани экспериментально доказал, что оплодотворение у рыб происходит во внешней среде в результате смешивания икры со спермой. Якоби воспроизводил то, что наблюдал в природе: брал зрелых лососей, форелей и рыб других видов (с текучими половыми продуктами), в сосуд с водой сцеживал вначале икру, потом сперму (молоки) и перемешивал их. Этот, так называемый "мокрый" способ искусственного осеменения, не получил широкого распространения, так как он давал непостоянные результаты и очень часто процент оплодотворения был очень низким. Прорывом в рыбоводстве явилась разработка в 1850-х годах в России В.П. Врасским "сухого" способа осеменения, при котором сначала перемешивалась икра со спермой и только потом добавлялась вода. "Сухой" способ на икре лососевых рыб стабильно давал прекрасные результаты и под названием "русского" способа получил мировое признание.

В настоящее время метод искусственного осеменения широко используется в рыбоводстве при разведении осетровых, лососевых и некоторых других видов рыб. При этом для разных видов рыб используют разные способы осе-

менения, что связано с особенностями их половых продуктов. Так у лососевых рыб как яйца, так и сперматозоиды в воде очень быстро (спермии всего за 1 мин.) теряют способность к оплодотворению, чем и объясняется низкая эффективность "мокрого" способа. В то же время у этих рыб спермин хорошо активизируются и длительно сохраняют подвижность в полостной жидкости, окружающей яйца. Вследствие этого для данной группы рыб более эффективным является "сухой" способ осеменения. У осетровых рыб, напротив, полостная жидкость оказывает неблагоприятное действие на спермин, поэтому при осеменении икры осетровых лучшие результаты дает не "сухой", а "полусухой" способ, при котором сперму перед прибавлением к икре разводят водой.

Искусственное осеменение в рыбоводстве позволило организовать промышленное воспроизводство рыб. Во многих странах мира специальные рыбные заводы выпускают огромное количество рыбной молоди ценных видов (в частности, осетровых) в естественные водоемы. В прудовом рыбоводстве для получения мальков обычно используют икру и молоки наиболее ценных производителей.

Основоположником промышленного зоотехнического метода искусственного осеменения стал И.И. Иванов (1870-1932 гг.) - один из тех редких людей, которые свою неугасающую жизненную энергию изливают на самые разнообразные практические дела. Еще в 1901 г. он организовал опытный пункт искусственного осеменения лошадей в Орловской губернии. Позднее, при поддержке академика Павлова И.П., Иванов провел цикл работ по биологии размножения в Петербурге. И.И. Иванов работал также в области межвидовой гибридизации животных. В 1910 году им организована зоотехническая станция в Аскании-Нова. Позднее он организовал научную экспедицию в Западную Африку (можно представить, чего это стоило в конце 20-х годов!), откуда были привезены первые шимпанзе и павианы для Сухумского обезьяньего питомника. В последние годы своей жизни Иванов работал в Казахстане, где возглавлял кафедру физиологии размножения Алма-Атинского зооветеринарного института (ныне Алматинский аграрный университет). Он показал, что сперма сельскохозяйственных животных при благоприятных условиях в течение некоторого времени способна сохранять оплодотворяющую способность. Им были разработаны варианты искусственного осеменения для птиц и млекопитающих в естественной и искусственной среде. В целях решения проблемы длительного хранения спермы млекопитающих им было предложено использование низких температур (близких к 0° С).

Опираясь на результаты своих экспериментов, И.И.Иванов предложил использовать искусственное осеменение для получения возможно большего числа потомков от наиболее ценных производителей. Первые опыты практического применения метода искусственного осеменения были проведены И.И. Ивановым в 1899 г. на лошадях, а на крупном и мелком рогатом скоте - в 1910 году. Впоследствии данный метод получил широкое распространение в животноводстве и птицеводстве Советского Союза, а с 1930 года начал применяться в сельскохозяйственной практике Дании, США, Англии и других стран мира. Огромное практическое значение этого метода обусловлено в первую очередь

тем, что он позволяет в десятки, а иногда в сотни раз повысить эффективность использования спермы племенных животных. Для этого сперму соответственно разбавляют забуференным раствором яичного желтка. В частности, если при естественной случке в год от одного быка-производителя получают 100-150 телят, то при искусственном осеменении - 1500-4000. Это создает большие возможности для массового размножения линий наиболее ценных в продуктивном отношении животных и для улучшения породности скота.

Серьезным препятствием для широкого использования метода искусственного осеменения долгие годы была проблема длительного сохранения спермы без снижения ее оплодотворяющей способности. Революционную роль в решении данной проблемы сыграл метод глубокого замораживания спермы (в твердой углекислоте при -79°C и в жидком азоте при -196°C). Применение этого метода стало возможным после разработки способов защиты спермиев от повреждающего действия смены температуры при замораживании и оттаивании. Такая защита была достигнута добавлением к разбавленной сперме криопротекторов - глицерина, диметилсульфоксида и др. При глубоком замораживании спермии сохраняют оплодотворяющую способность на протяжении многих лет. Описаны случаи получения нормального потомства от животных осемененных спермиями, хранившимися в условиях глубокого замораживания (-79°C и -196°C) более 25-30 лет.

Метод искусственного осеменения довольно широко распространен и в медицинской практике развитых стран. Обычно при этом используется сперма мужчин-доноров, прошедших строгий отбор по состоянию здоровья, коэффициенту интеллектуального развития, возрасту и т.п. По статистике дети, родившиеся в результате такого искусственного осеменения, несколько опережают своих сверстников по физическому развитию, успеваемости и т.п.

Оплодотворение

В процессе оплодотворения можно выделить следующие последовательные этапы: сближение, активацию и слияние гамет. Сближение гамет, как уже указывалось, обеспечивается соответствующими морфологическими адаптациями, синхронизированной поведенческой и физиологической активностью животных. Наиболее оптимальные условия для сближения создаются при внутреннем осеменении, при этом перенос спермиев к месту встречи с яйцом в основном осуществляется за счет деятельности стенок половых путей.

На близком расстоянии и при непосредственном контакте между гаметами устанавливаются связи (т.н. дистантные и, контактные взаимодействия гамет). **Дистантные взаимодействия** обеспечиваются веществами аттрактантами-гамонами. Яйцеклетки выделяют **гиногамоны**. сперматозоиды - **андрогамоны**. Биохимические исследования процесса оплодотворения особенно активно начались после открытия американским ученым Ф. Лилли (1912 г.) в студенистой оболочке яйца морского ежа вещества **фертилизина**, вызывающего агглютинацию спермиев в так называемой "яичной воде" (смысл неопло-

дотворенных яиц). Дальнейшие исследования показали, что фертилизин (гликопротеид по химической природе) вызывает разнообразные реакции сперматозоидов: активизирует и поддерживает их активность, воздействует на акросому, склеивает головки "лишних" спермиев, ускоряя их гибель. Долгое время после этого было принято объяснять взаимодействие гамет при помощи фертилизин-антифертилизиновой системы. Антифертилизином при этом является андрогамон, кислый белок, выделяемый спермиями.

Видоспецифическое привлечение спермиев доказано для многих животных, в частности для кишечнополостных, моллюсков, иглокожих и первичнохордовых (Miller, 1985). Еще в 1978 году Миллер показал, что яйца кишечнополостного *Orthopyxis caliculata* синтезируют и строго в определенное время (после завершения второго деления мейоза) выделяют аттрактант, привлекающий спермии. Примерами веществ - аттрактантов являются выделенные из яиц морского ежа (*Strongylocentrotus purpuratus*) **сперакт**-пептид, содержащий 10 аминокислотных остатков (Hansbrough, Garbers, 1981) и выделенный из студенистой оболочки яиц (*Arbacia punctulata*) **резакт**-пептид, содержащий 14 аминокислотных остатков (Ward et al., 1985). Резакт в морской воде быстро диффундирует, привлекает спермии по градиенту концентрации и обладает видоспецифичностью, то есть не привлекает спермии других видов животных.

При всех вариантах оплодотворения, извергаемые из семенников сперматозоиды, попадая в воду или в половые пути самки, сталкиваются с резкими изменениями среды, что приводит к их активации. Активация спермиев (помимо двигательной активности) охватывает целый ряд разнообразных процессов. Для сперматозоидов млекопитающих в их число следует включить **реакцию капацитации**, выражающуюся в модификации мембраны сперматозоида, перестройку гликопротеиновых молекул на его поверхности, повышение мобильности клеток и т.д. Капацитация наступает в половых путях самки и ее можно вызвать инкубируя сперматозоиды в среде, содержащей жидкость из женских половых путей. Только после капацитации спермии приобретают способность к акросомной реакции. Для капацитации спермиев требуется определенное время (около 1,5 часа у овцы, 5 часов у кролика, 7 часов у человека).

После того, как спермий прикрепляется к яйцеклетке (считается, что при этом большую роль играет локомоторная активность жгутика) начинаются **контактные взаимодействия** между гаметами. Они проявляются в сложной цепи структурно-физиологических преобразований обоих гамет, которые резко активизируются. Активация сперматозоида материалом студенистой оболочки яйца проявляется, прежде всего, в т.н. **акросомной реакции**.

У большинства морских беспозвоночных акросомная реакция протекает в два этапа: разрыв акросомного пузырька и выдвижение акросомного выроста (рис. 23). Акросомную реакцию может инициировать не только контакт со студенистой оболочкой, но и растворенный материал студенистой оболочки (считается, что за счет содержащихся в ней сульфатированных полисахаридов), а также искусственное повышение концентрации кальция в морской воде. Интересно, что акросомная реакция наблюдается при контакте сперматозо-

ида с любой твердой поверхностью и прежде всего затрагивает акросомный аппарат. Считается, что разрыв акросомы происходит в результате кальцийзависимого слияния акросомной мембраны с прилежащей плазматической мембраной спермия.

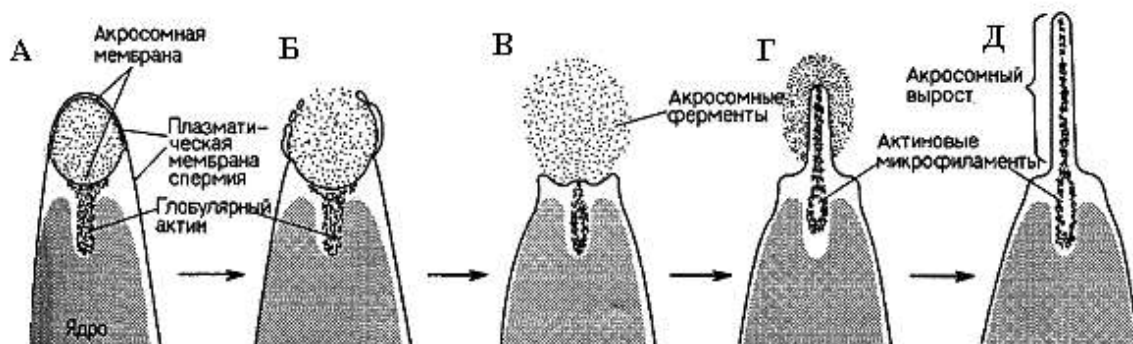


Рис.23. Акросомная реакция спермия морского ежа. А-В. Участок акросомной мембраны, расположенный под плазмолеммой спермия, сливается с ней с выделением содержимого акросомного пузырька. Г-Д. По мере полимеризации молекул актина с образованием филаментов происходит выдвижение вперед выроста (по Saunders, 1970)

У морских ежей разрушение акросомной гранулы сопровождается выделением протеолитических ферментов (спермолизин), которые обеспечивают прохождение спермия через студенистую оболочку к поверхности яйца.

Спермолизины растворяют яйцевые оболочки, а также мембраны и сперматозоида, и яйца, способствуя слиянию содержимого обеих гамет. Акросомный вырост удлиняется, проходит через размягченную область яйцевых оболочек и вступает в контакт с плазматической мембраной яйца. У морских ежей основной этап видоспецифического узнавания осуществляется именно в этот момент, благодаря содержащемуся в акросомном выросте нерастворимому белку **биндину**. Соответственно на желточной оболочке яйца этого же вида морских ежей существуют видоспецифические рецепторы гликопротеиновой природы для связывания биндина.

Плазматические мембраны гамет в месте контакта сливаются, образуя цитоплазматический мостик, с помощью которого вначале объединяются цитоплазмы обоих гамет, а затем в ооплазму перемещаются ядро и центриоль сперматозоида. С этого момента спермий и яйцо являются уже единой клеткой - **зиготой**.

Формирование акросомного выроста происходит очень быстро. Так в спермиях морских звезд оно начинается уже через 1 сек. после инициации этого процесса. Вырост в основном удлиняется в первые 10 сек., а его полное формирование завершается за 60 сек. Акросомный вырост формируется в результате полимеризации глобулярного актина и образования актиновых филаментов (Рис. 22). Одновременно происходит активация динеиновой АТФазы в шейке спермия и резкое увеличение интенсивности дыхания митохондрий.

Длина акросомного выроста сильно варьирует у разных животных и со-

ответствует толщине барьера, который должен преодолеть спермий. Так у морских звезд и голотурий значительной плотностью обладает не только желточная, но и наружная студенистая оболочка и поэтому задерживаясь на поверхности студенистой оболочки, спермий в процессе акросомной реакции выбрасывает акросомный вырост длиной до 90 мкм.

У морских ежей яйцевые оболочки имеют сходное строение, но студенистая оболочка имеет очень рыхлую консистенцию, Спермий свободно прободает ее и, прикрепляясь к внутренней желточной оболочке, выбрасывает акросомный вырост, который в соответствии с малой толщиной данной оболочки очень короткий от 0,5 до нескольких микрометров. У некоторых животных (акуловые рыбы, рептилии, птицы) с плотными лицевыми оболочками, соединение гамет происходит раньше, чем эти оболочки сформируются. В отличие от беспозвоночных и низших позвоночных, акросомная реакция у млекопитающих протекает без образования акросомного выроста (рис.24,25).

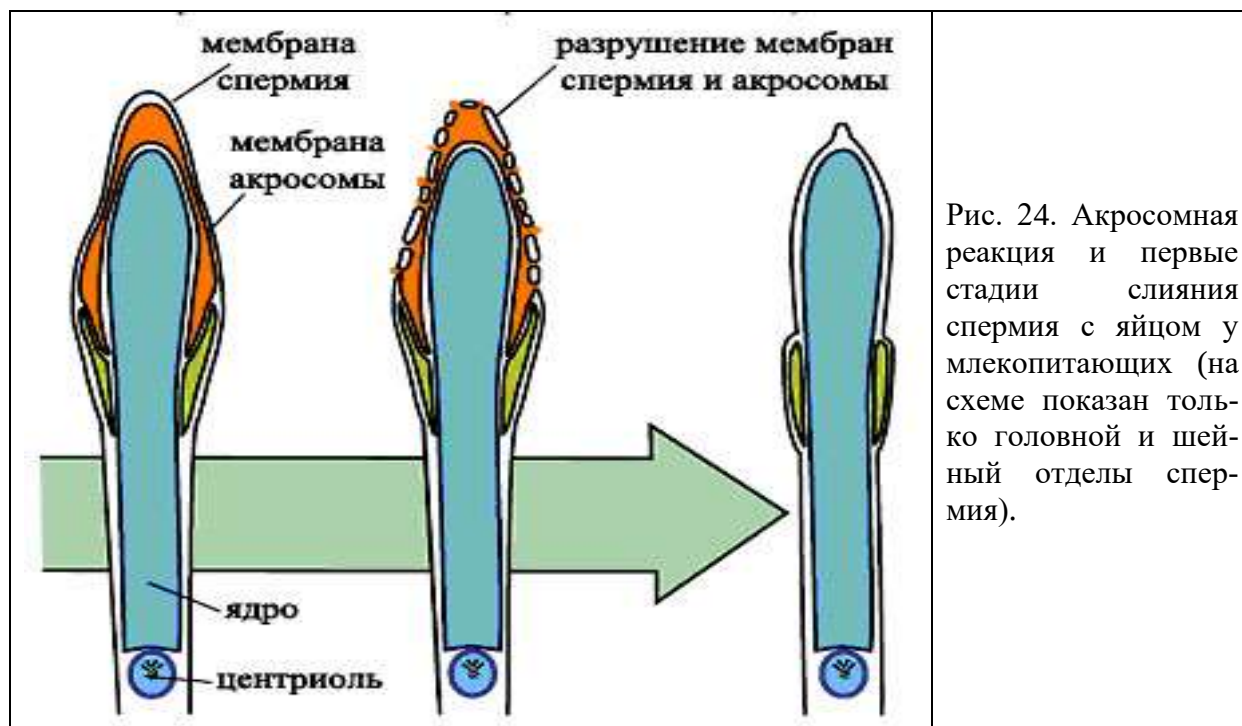


Рис. 24. Акросомная реакция и первые стадии слияния спермия с яйцом у млекопитающих (на схеме показан только головной и шейный отделы спермия).

После встречи спермия с яйцом наружная акросомная мембрана во многих местах слипаются, в этих участках образуются отверстия, через которые наружу выходят ферменты акросомной гранулы (гиалуронидаза; протеиназа; фермент, переваривающий студенистое вещество, которое связывает между собой фолликулярные клетки яйценосного бугорка).

Таким образом спермий прокладывает дорогу к собственной оболочке яйца (к zona pellucida). Затем слипшиеся мембраны распадаются на множество мелких пузырьков (процесс везикуляции) и спермий остается окруженным в передней части лишь внутренней акросомной мембраной (Рис.24,25). Слияние плазматических мембран гамет приводит к активации яйца. При этом, встроившаяся в плазмолемму яйца мембрана сперматозоида (точнее его акросомы) обладает повышенной проницаемостью для ионов Na^+ и играет важную роль в запуске автокаталитической реакции по высвобождению ионов Ca^{2+} из внутри-

клеточных депо. Считается, что именно волна высвобождения ионов Ca^{2+} играет главную роль в активации яйцеклетки. Одновременно происходит деполяризация мембраны яйца и изменение отрицательного заряда на положительный. Эта реакция называется быстрым блоком полиспермии (Gray et al., 1982), и препятствует вхождению в яйцо излишних спермиев. Через несколько минут концен-

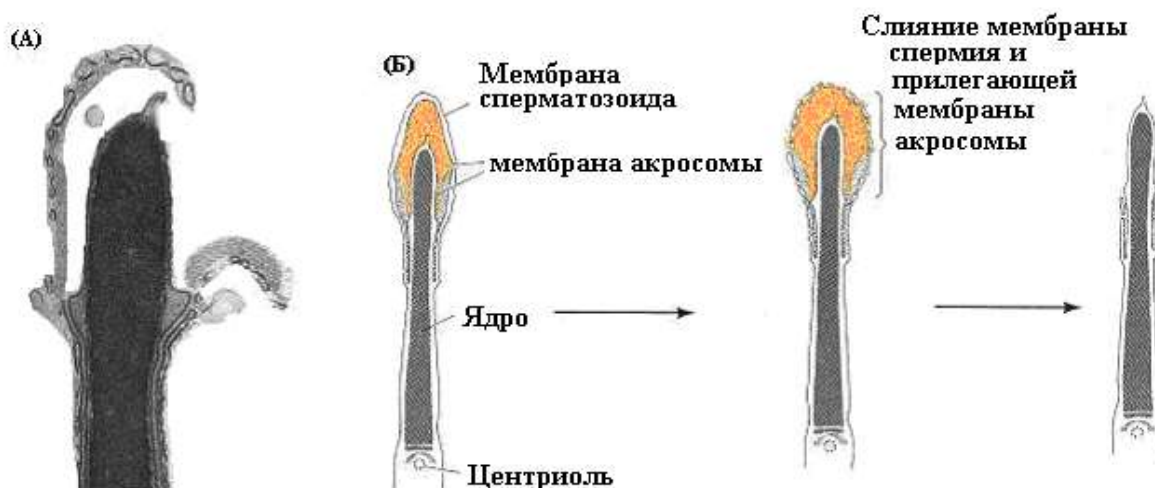


Рис. 25. Акросомная реакция спермия хомячка. А. Микрофотография спермия хомячка во время акросомной реакции. Мембрана образует пузырьки. Б. Пояснительный схематический рисунок, выполненный по электронномикроскопическим фотографиям, демонстрирующий слияние акросомной и плазматической мембран в головке спермия (из Meizel, 1984).

ция Ca^{2+} снижается до прежнего уровня и начинается экзоцитоз кортикальных гранул, распространяющийся центробежно со скоростью 5-25 мкм/сек. От места вхождения сперматозоида. Данный процесс является важным элементом кортикальной реакции клетки, в ходе которой мембраны кортикальных гранул слипаются с плазматической мембраной яйца, в этом месте гранулы раскрываются и их содержимое изливается под оболочку (Рис.26).

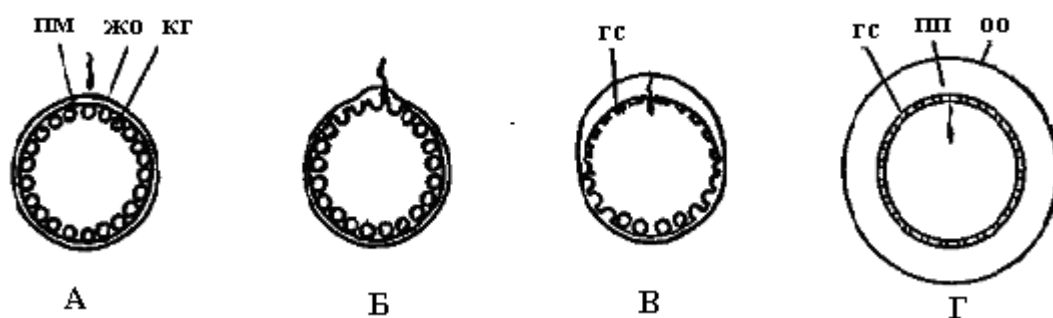


Рис.26. Кортикальная реакция в яйце морского ежа (Saunders, 1970).

А - приближение спермия к яйцу; Б-Г - последовательные стадии кортикальной реакции; показаны волна выделения содержимого кортикальных гранул, распространяющихся от места проникновения спермия, отделение оболочки и образование перивителлинового пространства. Формирование гиалинового слоя; гс - гиалиновый слой; жо - желточная оболочка; кг - кортикальная гранула; оо - оболочка оплодотворения; пм - плазматическая мембрана; пп - перивителлиновое пространство, заполненное перивителлиновой жидкостью.

Из кортикальных гранул высвобождаются вещества, запускающие разнообразные реакции:

1. Протеолитический фермент - вителлиновая деламиназа, разъединяющая желточную оболочку и плазматическую мембрану яйца;
2. Протеолитический фермент - сперморецепторная гидролаза, освобождающая поверхность яйцеклетки от осевших на ней спермиев;
3. Осмотически активный гликопротеид, «насосывающий» воду в образованную, благодаря активности вителлиновой деламиназы, щель между желточной оболочкой и плазматической мембраной;
4. Фактор, способствующий образованию оболочки оплодотворения (затвердевшая желточная оболочка), непроницаемой для сперматозоидов;
5. Структурный белок, участвующий в формировании гиалинового слоя над плазмолеммой яйцеклетки;

Часть выделившегося материала кортикальных гранул оводняется и растворяется, образуя перивителлиновую жидкость, отесняющую желточную оболочку от поверхности ооплазмы (рис. 26 г). Другая часть этого материала сливается с желточной оболочкой, которая при этом утолщается, уплотняется и преобразуется в **"оболочку оплодотворения"**. При участии субстанции кортикальных гранул, кроме того, формируется плотная гомогенная структура на поверхности яйца - **гиалиновый слой** (рис. 26 в,г).

Секреция содержимого кортикальных гранул начинается не сразу после контакта между гаметами, а спустя некоторое время. Продолжительность этого латентного периода составляет в яйцах морского ежа, например, от 17 до 70 сек. (в зависимости от температуры среды). Начавшаяся секреция содержимого кортикальных телец охватывает всю поверхность яйца за 10-90 сек.

Только у немногих изученных животных (несколько видов двустворчатых моллюсков и кольчатых червей) кортикальные гранулы при оплодотворении не разрушаются и сохраняются в цитоплазме до относительно поздних стадий развития.

Таким образом, в ходе кортикальной реакции происходит выделение оплодотворенным яйцом осмотически активных мукопротеидов и образование слоя перивителлиновой жидкости между яйцевой оболочкой и ооплазмой. Биологическое значение этого процесса очень велико: он служит механизмом, препятствующим проникновению в яйцо лишних спермиев. Вместе с тем перивителлиновая жидкость, образующаяся в результате кортикальной реакции, служит специфической средой, в которой протекает развитие зародыша до того момента, когда он покидает яйцевые оболочки.

Вслед за кортикальной реакцией, примерно через 6-8 минут после контакта гамет, начинается активация белкового синтеза в ооплазме. Предполагается, что биосинтез белка стимулируется повышением внутриклеточного рН, вызванного, в свою очередь, изменениями в транспорте некоторых ионов (H^+ , Na^+ и др.). Синтез белка при этом активируется на трансляционном уровне и не

требует участия ядра. Сразу же после оплодотворения активируются все компоненты белоксинтезирующего аппарата (РНК, рибосомы, АТФ и т.п.): молекулы матричной РНК выходят из состава информосом и вступают во взаимодействие с компонентами аппарата трансляции, формируются полирибосомы и т.д.

Слияние гамет. Формирование пронуклеусов. Сингамия.

Если во встрече и соединении гамет активную роль играет сперматозоид, то после контакта и слияния мембраны акросомного выроста и плазматической мембраны яйца, роли меняются: спермий утрачивает подвижность и втягивается в ооплазму за счет активности яйцеклетки. При этом ооплазма стягивается к месту контакта (рис. 27), формируя за счет полимеризации актина т.н. **воспринимающий бугорок** (бугорок оплодотворения высотой у морского ежа в среднем 6,7 мкм и шириной 2 мкм). Затем через бугорок оплодотворения и глубже в ооплазму перемещаются ядро, органоиды средней части и осевой комплекс фибрилл (у некоторых видов жгутик остается на поверхности яйца и отбрасывается).

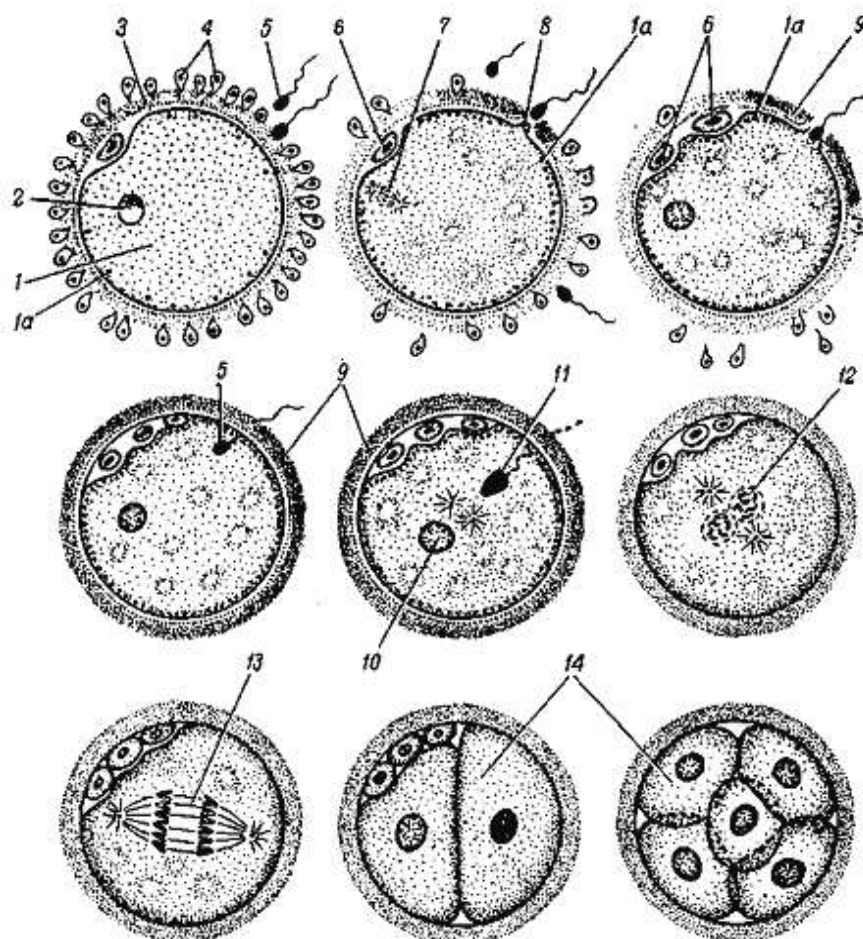


Рис. 27. Стадии оплодотворения и начало дробления (схема).

1-ооплазма; 1а - кортикальные гранулы; 2-ядро; 3-блестящая оболочка; 4-фолликулярный эпителий; 5-спермий; 6- направительные тельца; 7- деление созревания; 8- бугорок оплодотворения; 9- оболочка оплодотворения; 10- женский пронуклеус; 11-мужской пронуклеус; 12-синкарион; 13-первое митотическое деление зиготы; 14-бластомеры.

У морских ежей все области яйца способны сливаться со спермиями, но у многих беспозвоночных и некоторых амфибий узнавание спермия и слияние с ним возможно лишь в специализированных областях плазматической мембраны яйца. Хвостик спермия в последующем существенной роли не играет и дегенерирует. Также постепенно разрушаются некоторые другие органоиды сперматозоида: митохондрии связующего отдела, центриоль, лежащая в основании жгутика, остатки акросомы.

Другие органоиды органично включаются в дальнейшее развитие яйца. Ядро спермия в течение первых часов постепенно трансформируется в мужской **пронуклеус**. Его высококонденсированный хроматин за счет деконденсации нитей ДНП начинает набухать, происходит репликация ДНК, появляются хорошо заметные ядрышки, пронуклеус мигрирует к центру яйца.

Ядерная оболочка мужского пронуклеуса возникает заново из гладкоконтурных пузырьков, которые выстраиваются по поверхности массы хроматина семенного ядра и сливаются, образуя типичную двойную ядерную оболочку.

Преобразования и перемещения семенного ядра обычно совпадают по времени с завершением второго деления созревания, за исключением тех случаев, когда, как у морских ежей, к моменту проникновения спермия женский пронуклеус уже сформирован. Если же спермий сливается с яйцом (точнее овоцитом), находящимся на ранних стадиях мейоза, то он не претерпевает никаких изменений вплоть до наступления второго деления созревания. Вероятно, на этой стадии в ооплазме появляется какой-то фактор, вызывающий преобразование ядра спермия.

После отделения второго полярного тельца вокруг оставшейся в ооплазме группы хромосом женского ядра также формируется ядерная оболочка, хромосомы деконденсируются и возникает округлый женский пронуклеус, который начинает перемещаться вглубь яйца. Микротрубочки, отходящие от центриоли спермия, растут и соединяются с женским пронуклеусом, обеспечивая их последующее сближение. В центре свободной от желточных включений цитоплазмы оба пронуклеуса сближаются и после т.н. "танца пронуклеусов" вступают в контакт друг с другом. У млекопитающих процесс сближения пронуклеусов занимает около 12 часов. На этой стадии они могут быть совершенно подобны друг другу по размерам и структуре, хотя иногда один пронуклеус бывает крупнее другого. Этот момент, момент сингамии, т.е. смешения отцовских и материнских хромосом, объединения двух геномов, иногда очень разных (в случае гибридизации, например), является одним из наиболее удачных для введения в развивающийся организм чужеродной генетической информации. Вновь формирующийся геном зиготы достаточно толерантен к введенным в ооплазму синтезированным *in vitro* генам (опыты с трансгенными животными). Сингамия - это последняя стадия процесса оплодотворения, начинающегося с контакта яйцеклетки и сперматозоида.

Иногда - у морских ежей, некоторых червей - пронуклеусы сливаются,

образуя единое ядро - синкарион (рис. 27-12). Ядерные оболочки пронуклеусов в месте контакта разрушаются, и их содержимое объединяется под общей ядерной оболочкой. Однако, чаще пронуклеусы остаются в тесном контакте, не сливаясь, до наступления первого деления дробления. В последнем случае объединение отцовского и материнского геномов происходит только на стадии метафазы первого митоза, когда формируется экваториальная (метафазная) пластинка. У некоторых животных описаны случаи, когда хромосомные наборы не объединяются и на этой стадии и продолжительное время остаются обособленными в бластомерах дробящегося яйца, образуя две отдельные группировки хромосом (явление **гономерии**).

Во время перемещения мужского пронуклеуса к месту встречи с женским ядром центросома семенной звезды делится, и два возникших клеточных центра расходятся по бокам от соединившихся пронуклеусов. Сама семенная звезда преобразуется при этом в двухполюсное веретено (рис. 27), и зигота начинает дробиться.

Сегрегация ооплазмы в период оплодотворения.

В ходе оплодотворения наблюдаются перемещения не только ядер и семенной звезды, но также и различных компонентов ооплазмы. Этот процесс носит строго упорядоченный, закономерный характер и обуславливает формирование специфической для яйца представителя каждого конкретного вида животных гетерогенности ооплазмы.

Надо сказать, что обычно ооплазма яиц у большинства животных приобретает гетерогенную структуру еще в процессе своего развития в яичнике. Так, например, яйца амфибий морфологически поляризованы из-за дифференциации на анимальную и вегетативную половины. Ближе к анимальному полюсу выше концентрация пигментных и гликогеновых гранул, рибосом, сюда же смещается ядро (зародышевый пузырек) яйцеклетки. Напротив, по направлению к вегетативному полюсу возрастает концентрация желточных пластинок. У хвостатых амфибий краниокаудальная ось будущего зародыша практически совпадает с линией, соединяющей анимальный и вегетативный полюсы.

В результате оплодотворения, помимо кортикальной реакции и в связи с нею, происходит перемещения материала яйца, затрагивающие его как поверхностные, так и глубинные части. При этом определяются не только оси будущего зародыша и приблизительные места будущих закладок органов. Дальнейшее дробление происходит при «молчащем» собственном геноме яйца. К настоящему времени накоплены весьма убедительные данные, доказывающие внеядерную, ооплазматическую локализацию морфогенетических детерминантов, в качестве которых обычно рассматривают и РНК, индивидуальные м РНК актина и гистонов, р РНК, белки кортекса, органоиды. Различия в судьбе частей зародыша могут также частично определяться анизотропией компонентов оолеомы.

Пространственная гетерогенность распределения в ооплазме РНК (РНП), митохондрий, пигментных и кортикальных гранул и других мембранных орга-

ноидов обусловлена их связыванием гелеподобной цитоскелетной сетью, прежде всего сетью актиновых филаментов, уплотненной в кортексе. Опорно-двигательный цитоскелет клетки обеспечивает как фиксацию в яйце морфогенетических детерминантов, так и их перераспределение при оплазматической сегрегации. Таким образом, анизотропия распределения фибриллярного актина в яйце является результатом поляризованного сокращения кортикальной цитоскелетной сети с сопутствующим пассивным перемещением всех связанных этой сетью мембранных органоидов, РНК, что приводит в итоге к поляризации их распределения. Исходя из этого понятно, почему процесс поляризации яйца можно ингибировать цитохалазином, блокирующим актин.

Если анимально-вегетативная ось яйца у большинства видов детерминруется в процессе оогенеза, то дорсо-вентральная ось у разных представителей билатеральных животных устанавливается в разное время до или после оплодотворения и связано с ним. У хордовых детерминация этой второй основной оси сопряжена с проникновением в яйцо спермия. Уже через несколько секунд после контакта со сперматозоидом в ооплазме начинаются биохимические изменения, распад кортикальных гранул и перемещение компонентов цитоплазмы. Последнее визуально проявляется миграцией гранул пигмента. В яйцах амфибий на стороне, противоположной месту проникновения сперматозоида, в области экватора, меняется пигментация: пигмент перемещается вглубь, вследствие чего данный участок поверхности светлеет (становится серым в случае черного пигмента и желтым - в случае бурого), образуя т.н. **серый серп** (полумесяц) (рис. 28). Экспериментально доказано, что средний участок серого серпа

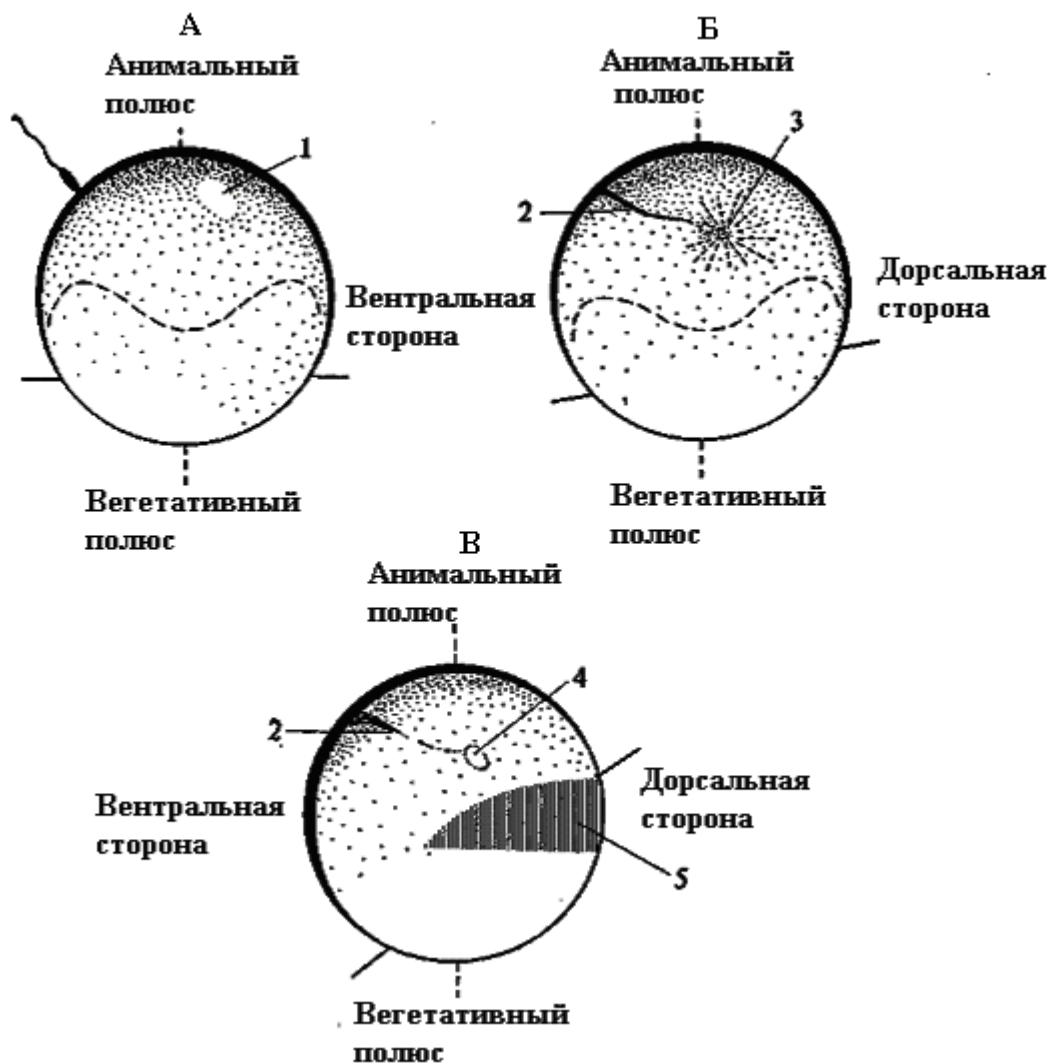


Рис. 28. Схема, иллюстрирующая процесс оплодотворения и формирование серого серпа в яйце амфибий. А. Сперматозоид приходит в контакт с яйцом. Б. Сближение пронуклеусов яйца и сперматозоида и начало кортикальной реакции. В. Формирование серого серпа на дорсальной стороне. 1- ядро серпа; 2- путь сперматозоида; 3- пронуклеуса; 4- ядро; 5- серый серп.

соответствует среднеспинной плоскости тела и определяет дорсо-ветральную ось будущего зародыша. Наложение дорсо-ветральной оси на уже существующую кранио-каудальную ось чисто геометрически определяет положение третьей оси – медио-латеральной. Таким образом, основные оси симметрии будущего зародыша устанавливаются уже в зиготе.

Серый серп имеет важное значение еще и потому, что в последующем развитии в этом участке формируется спинная губа бластопора, которая играет огромную роль в регуляции развития и поэтому получила название зародышевого организатора. Если на стадии зиготы удалить материал серого серпа, то яйцо дробится, но гастрюляция не начинается. Если же разрезать зиготу на две части так, чтобы был разделен надвое материал серого серпа, то развиваются два полноценных зародыша. Для нормального развития достаточно сохранить половину материала серого серпа. Причем, активность материала серого серпа определяет его кортикальный слой, что доказано экспериментами с эксплантацией только одного кортикального слоя серого серпа в другие участки зародыша.

дыша. Серый серп соответствует презумптивной хорде.

Таким образом, в результате оплодотворения происходят радикальные перемещения компонентов ооплазмы, что в значительной степени обуславливает характер последующего развития и, прежде всего, особенности цитодифференцировки. Как уже упоминалось ранее, цитоплазма яйца некоторых видов содержит так называемые **морфогенетические детерминанты**, способные влиять на активность или репрессию специфических генов. Из пространственной структуры распределения детерминантов в ооплазме вытекает специфика их распределения по разным бластомерам при дроблении яйца, что на данном этапе является решающим условием нормального развития.

Моно- и полиспермия.

Обычно эякулят большинства животных содержит огромное число спермиев, сотни и тысячи из которых могут прикрепляться к яйцеклетке (Рис. 29), но сливается с яйцом в процессе оплодотворения лишь один сперматозоид - это т.н. физиологическая **моноспермия**. Она присуща всем группам животных с наружным осеменением и многим видам с внутренним осеменением, имеющим яйца небольшого размера. Физиологической **полиспермией** называется вариант, когда в яйцо проникают несколько (2 -7) или даже много спермиев (25-45).

До настоящего времени такой тип оплодотворения был установлен у членистоногих (насекомые), моллюсков (из класса брюхоногих) и хордовых (акулообразных рыб, хвостатых амфибий, рептилий и птиц). Отсюда принято считать, что филогенетически первичным типом оплодотворения была моноспермия, а физиологическая полиспермия возникла в эволюции позднее. У животных с физиологической полиспермией сначала все проникшие в яйцо спермии изменяются синхронно, но затем только одно семенное ядро сливается с женским пронуклеусом, а остальные не участвуют в развитии и лизируются. Если число спермиев, проникших в ооплазму физиологически полиспермного животного существенно превышает норму, то это может вызвать нарушения развития. Например, у тритона *Triturus palmatus* развитие протекает нормально, если число проникших спермиев меньше 10. Если же это число больше 10, то процесс дробления неизменно нарушается в результате включения сверхчисленных семенных ядер в развитие, что ведет к аномалиям и остановке развития. При количестве спермиев в ооплазме более 20 яйца гибнут еще до завершения первого деления дробления.

Если в яйцо физиологически моноспермных животных проникает несколько спермиев (вследствие слишком высокой концентрации спермиев при осеменении или дефекта яиц), то они все включаются в развитие и уже при первом делении яйцеклетки одновременно возникает не два, а три, четыре и больше бластомеров. В дальнейшем в таком яйце на любой стадии дробления окажется большее число бластомеров. Например, у морских ежей при оплодотворении двумя спермиями возникает триплоидное ядро, в котором каждая хромосома

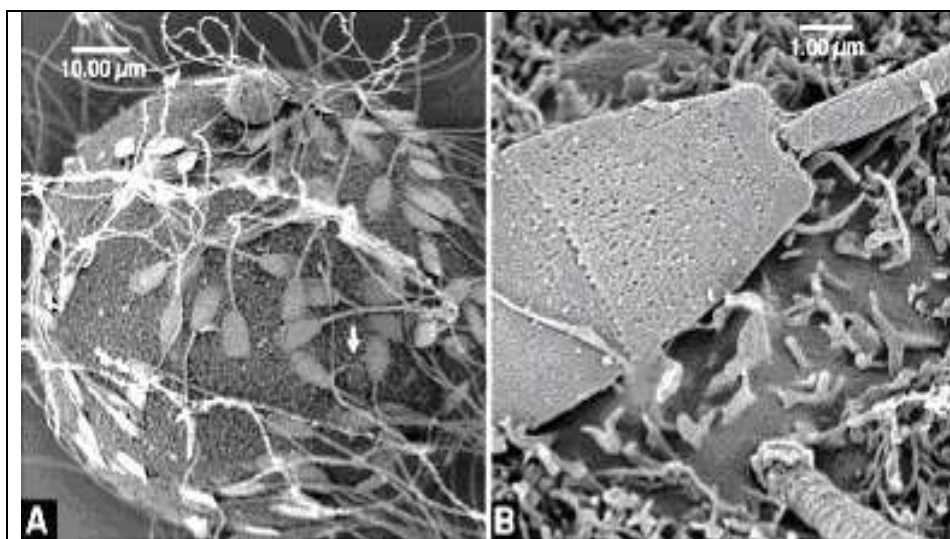


Рис. 29. Яйце-клетка коровы с прикрепившимися к оболочке многочисленными сперматозоидами (А) и отдельный спермий на большом увеличении (В)-растровая электронная микрофотография. (из С.Glabе2005).

представлена не двумя, а тремя копиями. В результате, вместо разделения хромосом с помощью биполярного веретена между двумя дочерними клетками-происходит распределение триплоидного набора между четырьмя клетками. При этом одни клетки получают лишние копии некоторых хромосом, а в других клетках эти хромосомы отсутствуют. Полиспермные зародыши развиваются атипично и оказываются нежизнеспособными (причем, чем сильнее выражена полиспермия, тем значительнее дефекты развития, и тем раньше, наступает гибель). Таким образом, полиспермия у физиологически моноспермных животных -явление патологическое.

В связи с этим в эволюции сформировалось несколько механизмов, блокирующих проникновение в яйцо излишних спермиев, о некоторых из них (образовании оболочки оплодотворения) уже говорилось. Но такой механизм не в состоянии обеспечить полную моноспермию, поскольку образование этой оболочки происходит спустя довольно значительное время после оплодотворения, когда поверхности яйца достигло уже много сперматозоидов. То есть, должен существовать защитный механизм, действующий на более ранней стадии.

Согласно гипотезе английских исследователей Н.М. Ротшильда и М.М. Суона (1952 г.) в яйцах моноспермных животных имеет место двухфазное блокирование полиспермии. В начальной фазе быстрого частичного блокирования полиспермии уже через 1-2 секунды после установления контакта между гаметами по поверхности яйца распространяются какие-то невидимые изменения, которые делают ее менее доступной для спермиев. В более поздних работах было показано, что встраивание мембраны сперматозоида в мембрану яйца в месте вхождения сопровождается деполяризацией мембраны яйца и изменением отрицательного заряда на положительный. Изменение заряда препятствует вхождению избыточных спермиев и лежит в основе быстрого блока полиспер-

мии (Gray et al., 1982г.). За ней следует вторая фаза, которая протекает медленнее и соответствует видимым изменениям кортикального слоя яйца; после ее завершения поверхность яйца становится полностью непроницаемой для спермиев (фаза полного блокирования).

В настоящее время считается, что быстрый блок полиспермии в яйцеклетках морского ежа обеспечивается резким изменением электрического потенциала плазматической мембраны клетки. Известно, что концентрация ионов, особенно натрия и калия, по обе стороны мембраны сильно различается. В результате возникает разность потенциалов примерно в 70 милливольт между отрицательно заряженным содержимым клетки и внешней средой.

В течение одной десятой секунды после прикрепления первого спермия мембрана деполяризуется и мембранный потенциал, в результате поступления в яйцо ионов натрия, достигает положительного уровня (от 0 до +20мВ) Установлено, что спермии неспособны сливаться с мембранами. потенциал которых имеет менее отрицательные значения, чем -10мВ. Быстрое открытие натриевых каналов мембраны яйца вероятно происходит под воздействием особого акросомного белка (Gould, Stefano, 1987).

Исследования показали, что быстрый блок полиспермии действует недолго -около одной минуты. после этого вступает в действие т.н. медленный блок полиспермии- или **кортикальная реакция**.

В яйце морского ежа непосредственно под плазматической мембраной располагается 15000 гранул диаметром около 1мкм, которые при контакте спермия с яйцом сливаются с плазмалеммой и выделяют свое содержимое в пространство между мембраной и желточной оболочкой. Белки, которые связывали желточную оболочку с поверхностью яйца, растворяются высвободившимися протеолитическими ферментами, а выделенные мукополисахариды насыщают воду в пространстве между плазмалеммой и желточной оболочкой. В результате желточная оболочка отделяется от поверхности яйца и с этого момента называется **оболочкой оплодотворения**. По мере формирования этой оболочки спермии отделяются от яйца. Этот процесс начинается примерно через 20 сек после прикрепления оплодотворяющего спермия и завершается к концу первой минуты после этого. При этом воздействие протеаз изменяет свойства биндиновых рецепторов желточной оболочки или их отделение вместе с прикрепленными к ним спермиями. Сама оболочка затвердевает в результате образования поперечных связей между остатками тирозина соседствующих белков. Одновременно происходит выделение **гиалина** - белка, запасенного в кортикальных гранулах. Плазматическая мембрана сливается с этим белком, образуя сплошной слой вокруг яйца. Гиалиновый слой поддерживает бластомеры в период дробления. У морских ежей, благодаря секреции содержимого кортикальных гранул, уже через 1 минуту после осеменения поверхность яйца делается полностью недоступной для спермиев. Как только спермии попадают в перивителлиновое пространство, их поверхность становится клейкой и они слипаются друг с другом как хвостиками, так и головками. Экспериментально показано, что если смыть током воды с поверхности яйца перивителлиновую жидкость и добавить сперму, то в ооплазму проникнет множе-

ство сперматозоидов.

У млекопитающих кортикальная реакция не вызывает образования оболочки оплодотворения, но выделяемые в ходе кортикальной реакции ферменты так изменяют рецепторы спермиев прозрачной оболочки, что они больше не удерживают спермии (**реакция прозрачной оболочки**). Наряду с этим, существуют также другие вспомогательные факторы блокирования полиспермии. У морского ежа заметную роль в предотвращении полиспермии играет студенистая оболочка яйца, пройдя через нее около 80-90% спермиев утрачивают оплодотворяющую способность. Считается, что в студенистой оболочке содержится вещество, идентичное фертилизину Лилли, вызывающее у спермиев акросомную реакцию, а если у сперматозоида выбрасывается акросомный вырост до установления контакта с желточной оболочкой, то он уже не может проникнуть в ооплазму.

По-видимому, такой же фактор элиминации спермиев - фертилизин вырабатывается яйцами многих других животных - морских звезд, кольчатых червей, моллюсков, круглоротых, рыб, бесхвостых амфибий.

У животных некоторых видов, вся поверхность яйца которых доступна для спермиев, барьером для проникновения избыточных спермиев является желточная оболочка, которая отделяется от поверхности ооплазмы в ходе кортикальной реакции. Спермин, которые входят в контакт с яйцом с запозданием по сравнению с первым оплодотворяющим спермием, при этом отторгаются. Отторжение избыточных спермиев, как и отделение оболочки, осуществляется, по-видимому, при участии протеазы кортикальных гранул. В тех случаях, когда к яйцу одновременно прикрепляются несколько сперматозоидов, все они проникают в ооплазму.

Следующим вспомогательным фактором блокирования полиспермии является ограничение поверхности яйца, через которую возможно проникновение сперматозоида в ооплазму. Так, например, яйца костистых рыб одеты непроницаемой для спермиев оболочкой, в которой имеется единственный микропилярный канал, через который мужская клетка может пройти в ооплазму. Диаметр концевой части канала таков, что спермин заполняют весь ее просвет, располагаясь цепочкой друг за другом. После того, как первый оплодотворяющий спермий вступает в контакт и поглощается ооплазмой, последующие спермин блокируются факторами кортикальной реакции (в частности, факторами агглютинации избыточных спермиев). Описанный простой, но достаточно надежный механизм блокирования полиспермии у костистых рыб, обеспечивает нормальное оплодотворение даже в экстремальных условиях (при избыточной концентрации сперматозоидов и неблагоприятном физиологическом состоянии яиц). Обратной стороной такого блокирующего полиспермию механизма является низкий процент оплодотворения (не только в эксперименте, но и в естественных условиях) при пониженных концентрациях спермиев.

В гораздо меньшей степени ограничена поверхность яйца, доступная для спермиев, у круглоротых и бесхвостых амфибий (у последних сперматозоиды проникают только через анимальное полушарие).

Следует заметить, что обычно определенные участки поверхности яйца у представителей разных видов легче вступают в контакт со сперматозоидами и именно через них в большинстве случаев проникает оплодотворяющий сперматозоид.

В целом, вышеописанный механизм блокирования полиспермии, стержнем которого является кортикальная реакция, а также участвуют другие вспомогательные факторы, при оптимальных условиях осеменения оказывается достаточно эффективным.

Вместе с тем, в яйцах некоторых видов животных (например, у листоногого рачка *Artemia salina*, у некоторых асцидий) не находят кортикальных телец. В яйцах других животных, содержащих типичные кортикальные гранулы, процесс оплодотворения не сопровождается выраженной кортикальной реакцией, и гранулы сохраняются в интактном состоянии до поздних стадий развития (некоторые двустворчатые моллюски, кольчатый червь *Chaetopterus*). При этом у одного из видов двустворчатых моллюсков (*Spisula solidissima*) было установлено, что проникновение в яйцеклетку избыточных сперматозоидов полностью блокируется уже через 15 секунд после осеменения. Удаление желточной оболочки у неоплодотворенных яиц не влияло на время установления блока полиспермии, но блок не развивался после обработки яиц слабым раствором цитохалазина В (вещества, действующего на белки плазматической мембраны и подавляющего различные проявления клеточной активности). Высказывается предположение, что блокирование полиспермии у *Spisula* происходит на уровне плазматической мембраны яйца и осуществляется путем быстро наступающих конформационных изменений мембраны.

Исключение сверхчисленных спермиев из развития при физиологической полиспермии.

Поскольку, как уже упоминалось ранее, проникновение в яйцо избыточных спермиев оказывается губительным и для физиологически полиспермных животных, то должны существовать специальные механизмы, ограничивающие число проникающих в ооплазму спермиев. В полном соответствии с универсальным распространением в животных организмах единых механизмов, главным барьером на пути проникновения сверхчисленных спермиев у физиологически полиспермных животных, как и у моноспермных, является секреция кортикальных гранул. Однако у полиспермных животных кортикальные гранулы мелкие и немногочисленные, в связи с чем данный механизм у них действует менее эффективно, хотя все же несколько ограничивает число проникающих спермиев.

К другим механизмам относится гибель сверхчисленных спермиев, проникших в ооплазму, которая у разных видов происходит на различных стадиях развития. Очень рано, еще в ходе оплодотворения, резорбируются сверхчисленные спермин у брюхоногих моллюсков. В остальных случаях головки всех спермиев, проникших в ооплазму, синхронно преобразуются в семенные ядра, но сближается и сливается с женским пронуклеусом только одно, обычно

ближнее, ядро. Затем ядро зиготы вступает в первое деление дробления. Одновременно, или с некоторым запозданием, вступают в митоз и сверхчисленные семенные ядра. Однако их деление обычно не завершается и сверхчисленные семенные ядра резорбируются.

Вопросы для самоконтроля:

1. Оплодотворение, его биологическое значение.
2. Осеменение внешнее и внутреннее.
3. Дистантное взаимодействие гамет. Специфические хемотаксические факторы.
4. Акросомная реакция спермиев и ее роль в соединении гамет.
5. Физиологическая моно- и полиспермия.
6. Активация яйца. Две фазы активации: импульс активации и кортикальная реакция.
7. Образование перивителлинового пространства. Механизмы защиты яйца от проникновения многочисленных спермиев у физиологически моноспермных животных.
8. Сингамия. Биохимические изменения в оплодотворенном яйце-зиготе (дыхание, репликация ДНК, синтез белка).
9. Искусственное осеменение и его значение в рыбоводстве, птицеводстве и животноводстве.
10. Хранение гамет. Длительность и условия сохранения яйцами и спермиями способности к оплодотворению.
11. Партеногенез естественный и искусственный.
12. Факторы, побуждающие к партеногенетическому развитию. Работы Ж. Леба, А.А. Тихомирова, Э. Батайона, Г. Пинкуса, Б.Л. Астаурова.
13. Андро- и гионогенез.
14. Генетическое определение пола.

ГЛАВА ВОСЬМАЯ

ДРОБЛЕНИЕ И ОБРАЗОВАНИЕ БЛАСТУЛЫ

Общая характеристика процесса дробления. Особенности деления клеток в период дробления. Правила клеточного деления Гертвига-Сакса. Типы дробления, их зависимость от распределения в цитоплазме желтка (полное: равномерное и неравномерное; частичное: дискоидальное и поверхностное) и от свойств цитоплазмы (радиальное, спиральное, двусимметричное). Строение бластулы у животных с разным типом дробления. Особенности дробления и образования бластоцисты у млекопитающих. Структура клеточного цикла в период синхронных делений дробления. Биохимия дробления. Синтез ДНК, РНК и белков в период синхронных и асинхронных делений дробления. Смена функции материнского генома зародышевым. Интеграция зародыша в процессе дробления. Мозаичные и регуляторные яйца, условность этой классификации, опыты по разделению и слиянию бластомеров, умерщвлению отдельных бластомеров. Эквивалентность ядер в процессе дробления. Эксперименты Шпемана по перемещению ядер. Опыты пересадки и инактивации ядер. Возникновение однойцевых близнецов.

Процесс оплодотворения резко активизирует метаболизм яйцеклетки, выводя её из анабиотического состояния. Прежде всего, значительно возрастает потребление кислорода, усиливается углеводный и фосфатный обмен, начинается интенсивный синтез белков.

Одним из важнейших результатов оплодотворения является инициация дробления яйца путем последовательных митотических делений на все более мелкие клетки - **бластомеры**. При этом деление клеток происходит с исключительной скоростью. Так, например, яйцо лягушки делится на 37 000 клеток за 34 часа. Дробление обеспечивает образование многоклеточного зародыша и является одним из важнейших этапов онтогенеза всех Metazoa.

Считается, что этап дробления имеет следующие характерные черты: 1) дробящийся зародыш не растет; 2) не меняется его внешняя форма, но внутри образуется первичная полость тела - **бластоцель**; 3) после каждого деления количество ДНК в ядрах удваивается, поэтому суммарное содержание ДНК в зародыше непрерывно возрастает; 4) характер структурной гетерогенности ооплазмы в процессе дробления не меняется; 5) в бластомерах восстанавливается нормальное ядерно-плазменное отношение.

Дробление завершается образованием **бластулы**, состоящей обычно из нескольких сотен, а у некоторых видов и из нескольких тысяч морфологически и функционально неспециализированных бластомеров. Однако у многих животных в этот период в разных бластомерах начинается синтез различных мРНК и бластомеры, несмотря на свою генетическую идентичность, приобретают определенную разнокачественность. Это обусловлено тем, что уже цитоплазма яиц у многих видов животных неоднородна, сегрегирована. Разнокачественные участки цитоплазмы яйца, попадая в ходе дробления в разные бластомеры, по-разному воздействуют на ядра, инициируя активность различных участков генома. Дробление яиц у разных видов животных весьма значительно различается по целому ряду параметров. Большое значение имеет содержание и особенности распределения в

ооплазме желтка, а также филогения данной группы животных.

Существующие системы классификации процесса дробления основаны на учете следующих параметров:

1. Насколько полно дробится на бластомеры цитоплазма яйца. По этому показателю различают **голобластическое** или полное, и **меробластическое** или частичное дробление. При голобластическом дроблении (рис. 31, 36) весь объем ооплазмы разделяется на бластомеры. Желток в той или иной мере тормозит прохождению борозд дробления, поэтому богатые желтком области яйца дают более крупные, но малочисленные бластомеры яйца. Голобластическое дробление характерно для а-, олиго- и мезолецитальных яиц.

При меробластическом дроблении (рис. 30) часть ооплазмы, обычно перегруженная желтком, остается нераздробившейся (такой тип дробления характерен для богатых желтком полилецитальных телолецитальных и центролецитальных яиц). В зависимости от топографии раздробившейся на бластомеры части ооплазмы различают:

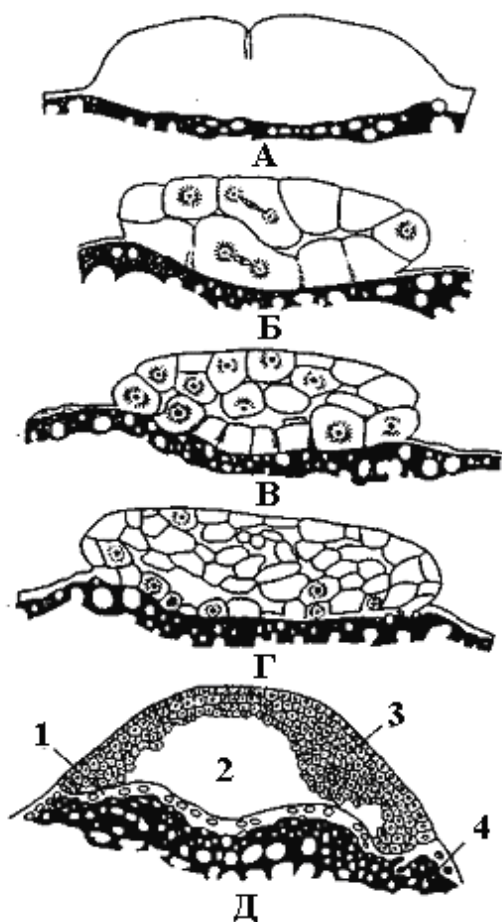


Рис.30. Дискоидальное дробление яйца костных рыб: форели (А-Г, по О.Коршу), мурены (Д, по Г.Букке)

1-перибласт; 2-бластоцель; 3- бластодерма; 4-желток.

а) **поверхностное дробление** - при котором разделяется на бластомеры лишь поверхностный слой цитоплазмы (яйца членистоногих);

б) **дискоидальное дробление** - дробится лишь относительно свободный от желтка тонкий диск цитоплазмы на анимальном полюсе яйцеклетки (полилецитальные, телолецитальные яйца костных рыб, рептилий, птиц, первозверей) (рис. 30);

2. В зависимости от размеров образовавшихся в процессе дробления бластомеров различают:

а) **равномерное дробление** - когда образующиеся бластомеры имеют примерно одинаковые размеры. Таким образом, обычно дробятся изолецитальные яйца иглокожих, ланцетника (рис. 36).

б) **неравномерное** - когда бластомеры значительно различаются между собой (микро-, макромеры и т.п.) По такому типу, в частности, дробятся телолецитальные яйца амфибий (рис. 31).

Но, строго говоря, по настоящему равномерных делений дробления в природе не существует.

3. По тому, насколько одновременно делятся бластомеры данного зародыша различают: а) **синхронное дробление**, когда все бластомеры де-

лятся одновременно. Обычно синхронными бывают только несколько первых "волн" делений, а затем часть бластомеров начинает опережать остальные по темпам делений;

б) **асинхронное дробление**, когда время деления различно в разных бластомерах и синхронизированы лишь профазы, а остальные фазы митоза асинхронны. То есть, синхронность носит весьма относительный характер. Однако яйца многих видов животных с самого начала дробятся асинхронно вследствие того, что более богатые желтком бластомеры делятся медленнее.

4. По характеру взаимного пространственного расположения образующихся бластомеров, "геометрии" дробления выделяют:

а) **радиальное дробление** - полярная ось яйца является осью радиальной симметрии, и бластомеры разных широтных ярусов лежат друг над другом довольно правильными "стопками" (иглокожие, ланцетник, круглоротые, амфибии);

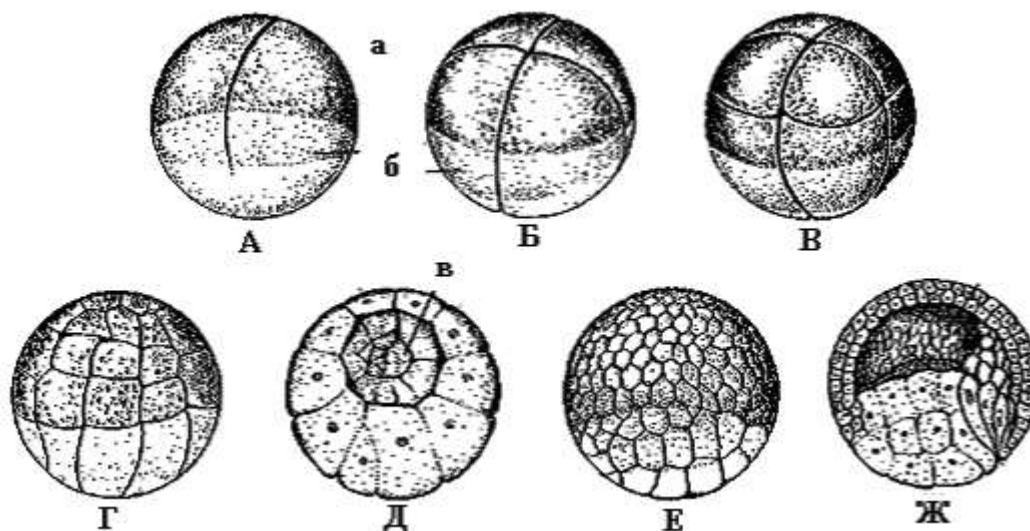


Рис. 31. Дробление и бластуляция амфибий.

А-стадия возникновения двух бластомеров; Б - стадия четырех бластомеров; В - стадия восьми бластомеров (макромеров и микромеров); Г-морула; Д-разрез бластулы с развитым бластоцелем (в), Е - бластула;Ж-разрез бластулы с образующейся ямкой инвагинации.

б) **спиральное дробление** - каждый широтный ярус бластомеров смещен относительно соседнего обычно на половину ширины бластомера. Слои (ярусы) бластомеров зародыша как бы скручены друг относительно друга по спирали. В зависимости от направления смещения различают **дексиотропное дробление**, когда бластомеры вышележащего яруса смещаются по часовой стрелке и **леотропное дробление**, при котором скручивание происходит против часовой стрелки. При этом направление поворота определяется геномом матери. Леотропное дробление характерно для аннелид, немертин и большинства моллюсков;

в) **билатеральное дробление** - бластомеры располагаются зеркально-симметрично по обе стороны от воображаемой оси симметрии (дробление яиц нематод, коловраток, асцидий);

г) **анархическое дробление** - когда не прослеживается определенная закономерность в топографии дробления, особенно беспорядочного после третьего деления. При этом нет видовой специфики в схеме дробления (яйца некоторых кишечнополостных, метагенетических медуз).

Особенности клеточных делений в период дробления.

Известно, что процесс митоза включает в себя деление ядра (кариотомию) и деление цитоплазмы (цитотомию). Цитотомия при дроблении играет особую роль, во многом определяя характер дальнейшего развития и, из-за огромных размеров яйца, отличается рядом особенностей.

Различают два вида цитотомии: **сократительный** и **ростовой**. Сократительный типичен для яиц с небольшим количеством желтка (иглокожие, например) и осуществляется путем образования перетяжки из сократимого кольца микрофиламентов между половинками бластомера. Микрофиламенты состоят из белка актина, локализованного в кортексе яйца в виде кольцевой структуры толщиной около 0,1 мкм. Сократительное кольцо формируется на стадии метафазы митоза под индукционным воздействием митотического веретена и располагается перпендикулярно ему. Сокращение микрофиламентарной перетяжки приводит к тому, что вновь образованные бластомеры остаются связанными между собой общим небольшим участком. Окончательное разъединение бластомеров происходит позже, уже в интерфазе, после формирования клеточных мембран в этом участке. Разделившиеся бластомеры остаются "слипшимися" между собой за счет мембранных контактов. При цитотомии по сократительному типу, как правило весьма значительно изменяется рельеф яйца (рис. 32).

Ростовой тип цитотомии типичен для яиц с большим содержанием желтка (мезо- и полилецитальных), там, где микрофиламентарная перетяжка не в состоянии разделить цитоплазму. В данном случае борозды дробления глубоко врастают в яйцо за счет синтеза новых цитомембран и разделяют его на бластомеры. Пространственная неоднородность яйца при данном типе цитотомии сохраняется.

Реально при дроблении имеет место комбинация обоих типов цитотомии. Так в яйце *Neporus laevis* первая борозда дробления, появляющаяся в анимальной части яйцеклетки, имеет в основе сократительную перетяжку из микрофиламентов, а распространяясь на богатую желтком вегетативную половину, углубляется внутрь яйца по ростовому типу, путем достраивания мембран.

Клеточные циклы при дроблении, особенно синхронном, характеризуются рядом особенностей: 1) ввиду того, что ооплазма содержит огромное количество всех факторов инициации синтеза и репликации ДНК (ДНК-полимеразы, нуклеозидтрифосфатазы, гистоны и т.д.), редупликация ДНК и сборка хромосом может начаться в любом участке ооплазмы; 2) клеточные циклы значительно укорочены за счет сильной редукции G_1 и G_2

периодов и существенного сокращения S-периода и митоза.

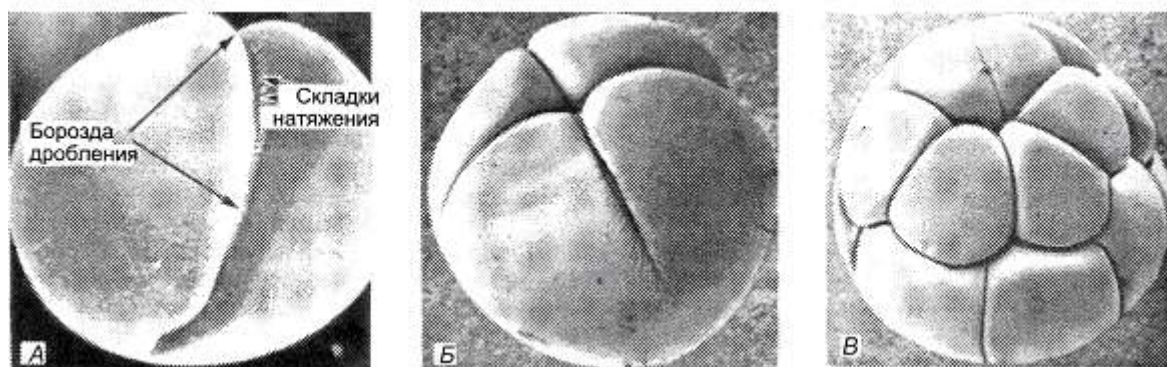


Рис.32 Микрофотографии дробящегося яйца лягушки, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа. Первое (А), второе (Б), и четвертое (В) деление дробления. На последней фотографии (стадии 16 клеток) отчетливо видны различия в размерах анимальных и вегетативных клеток, возникших при третьем делении.

После разделения вновь образованные бластомеры, как это уже отмечалось, не растут, все необходимое для синтеза ДНК в избытке имеется, поэтому G-1 период практически полностью выпадает. Укорочение G₂ - периода также обусловлено тем, что большая часть необходимых для митоза соединений, обычно синтезируемых перед делением, уже присутствует в зрелом яйце. S-период сильно сокращен благодаря синхронизации репликации во всех репликаонах генома. Известно, что клетки эукариот полирепликонны, и каждый репликон может реплицироваться автономно. Продолжительность репликации ДНК генома зависит от числа репликонов, скорости продвижения репликационной вилки (репликации) и степени синхронности репликации в разных репликаонах. Именно одновременность синтеза ДНК в различных репликаонах лежит в основе укорочения S-периода при дроблении. Считается, что полирепликонный геном при дроблении яйца реплицируется как монорепликонный геном клеток прокариот.

При переходе к асинхронным делениям изменяется характер клеточных циклов - возрастает продолжительность S-периода, всех фаз митоза, появляются G₁ и G₂ периоды. Скорость дробления яиц обычно зависит от вида животного. Очень медленно дробятся яйца млекопитающих, промежуток между делениями достигает десяти и более часов. Мезолецитальное яйцо лягушки дробится со скоростью приблизительно одно деление в час и за 43 часа может разделиться на 37000 клеток. Чрезвычайно быстро дробятся яйца членистоногих, у которых продолжительность клеточных циклов составляет около 10 минут. Однако в последнем случае цитотомия разобщена по времени с кариотомией. На скорость дробления яиц (в нормальном для каждого вида животных температурном интервале) влияет температура среды. Изменение ритма дробления при этом обычно подчиняется правилу Ван-Гоффа для химических реакций: повышение или понижение температуры на 10°C соответственно ускоряет или замедляет процесс в 2-3 раза.

Характерной особенностью дробления является ведущая роль цитоплазмы, а еще точнее, её кортикального слоя. Именно цитоплазма определяет темп делений и скорость синтеза белка, которые остаются константными после удаления или инактивации ядра. Так как цитоплазма яйца является производным от материнского организма, развитие зародыша в период дробления идет по материнскому типу, и его особенности определяются генотипом матери (например, дексиотропное или леотропное спиральное дробление). Дробление, хотя и неполноценное, возможно и при удалении или инактивации ядра. Процесс дробления с кариотомией описан и при пересадке в предварительно денуклеированную зиготу ядра из эритроцита травяной лягушки, который в норме не делится.

Синтез белка на стадии дробления

В ядрах яйцеклетки и зиготы синтез РНК обычно не происходит и отмечается лишь на стадии дробления. Причем в яйцах с небольшим количеством резервных органоидов, макромолекул и желтка синтез РНК начинается уже на самых ранних стадиях развития, а в яйцах богатых желтком активный синтез РНК начинается значительно позднее, лишь непосредственно перед бластуляцией. В целом, транскрипционная активность на стадии дробления видоспецифична, и разные классы РНК транскрибируются в определенной последовательности. По современным представлениям активация различных участков генома происходит в результате взаимодействия внешнего фактора (гормона, антигена, медиатора) со специфическими для данного фактора образованиями на клеточной поверхности (рецепторами). В результате происходит запуск внутриклеточных ферментативных процессов (аденилаткиназы - цАМФ - протеинкиназы на периферии клетки).

У зародышей амфибий в период дробления образуется очень мало новой РНК, синтез и м РНК, и р РНК усиливается лишь тогда, когда зародыш вступает в стадию бластулы. В дробящемся зародыше ядрышки отсутствуют и появляются вновь в период гастрюляции.

У зародышей млекопитающих синтез РНК начинается на стадии двух бластомеров, и к стадии четырех бластомеров синтезируются все основные типы РНК. Соответственно, в течение всего периода дробления ядра бластомеров содержат ядрышки.

В процессе дробления ядра бластомеров обычно сохраняют всю полноту генетической информации, но из-за взаимодействия с качественно различающейся в разных бластомерах цитоплазмой в них создаются условия для дифференциальной экспрессии генетического материала. Это реализуется путем синтеза уникальных для различных клеток зародыша видов РНК, белков и создает основу для клеточной дифференцировки.

Правила Ю. Сакса и О. Гертвига.

Характер дробления яйцеклеток животных разных видов, как уже было показано, весьма значительно варьирует. В связи с этим попытки выделить общие закономерности, хотя бы в отношении морфологии прохождения борозд

дробления, представляют большой интерес.

Общие принципы дробления определяются так называемыми правилами немецкого физиолога растений Юлиуса Сакса (1832-1897 гг.), которые были сформулированы в отношении верхушечных меристем растений, однако оказались настолько универсальными, что были использованы в отношении самых разных делящихся клеточных систем. Суть правил Ю. Сакса заключается в следующем:

1. Клетки имеют тенденцию делиться на равные дочерние;
2. Каждая новая борозда деления имеет тенденцию врезаться под прямым углом к предыдущей.

Один из известных немецких биологов, братьев Гертвигов - Оскар (1849-1922 гг.), исследуя особенности разных типов дробления яиц, выдвинул следующие положения (правила):

Первое правило Гертвига: ядро стремится занять центр активной (свободной от желтка) цитоплазмы. Соответственно, в олиголецитальных и гомолецитальных яйцах ядро находится примерно в геометрическом центре, а в телолецитальных яйцах - смещается в анимальное полушарие (рис. 33, А - А¹).

Второе правило Гертвига: длинная ось веретена деления обычно совпадает с направлением наибольшей протяженности цитоплазмы, свободной от желтка, а борозда деления имеет тенденцию разделять цитоплазму клетки по центру, перпендикулярно длинной оси (рис. 33, Б - Б').

Несмотря на ряд исключений (дробление яиц наездников, некоторых ракообразных и др.) правила Гертвига весьма корректно объясняют характер дробления яиц многих видов животных. Рассмотрим это на примере дробления яиц амфибий. У представителей этого класса яйцеклетки классифицируются как мезолецитальные по количеству и телолецитальные по распределению желтка. Ядро располагается в анимальном полушарии, и наибольшая протяженность активной цитоплазмы имеет широтное расположение (параллельное экваториальной плоскости). В этом направлении и лежит веретено первого деления ядра, а перпендикулярная ей первая борозда дробления проходит меридиально.

В каждом из двух образовавшихся бластомеров веретёна дробления, как и при первом делении, имеют широтное расположение, но перпендикулярно к бывшему направлению веретена 1-го дробления, соответственно изменению ориентации наибольшей протяженности активной цитоплазмы. Таким образом, второе дробление перпендикулярно первому и делит оба бластомера меридианально, в результате чего образуются четыре бластомера.

Хотя первые два дробления полные и равномерные, меридианальные борозды возникают на анимальном полюсе и лишь затем распространяются на вегетативное полушарие. В процессе дробления бластомеры вегетативного полушария, будучи перегружены желтком, делятся медленнее и остаются более крупными, чем бластомеры анимального полушария.

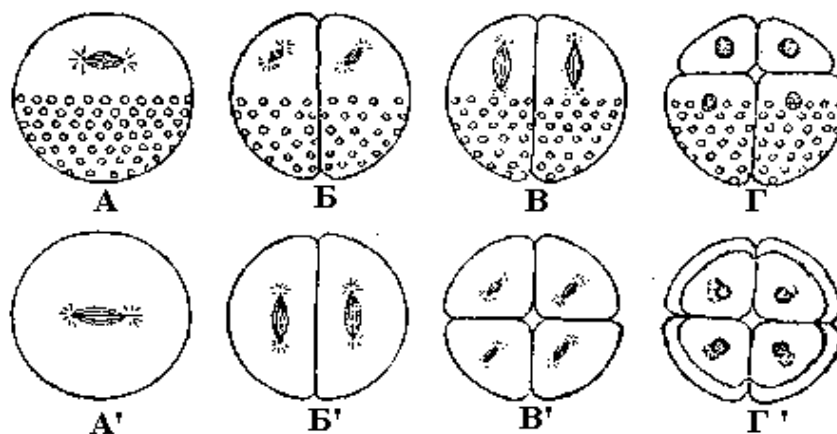


Рис. 33 Положение веретен дробления: верхний ряд-вид сбоку, нижний ряд – вид с анимального полюса. А, А'-начало первого дробления; Б, Б'- начало второго дробления; В, В'-начало третьего дробления; Г, Г' - положение бластомеров после третьего дробления.

После первых двух дроблений наибольшая протяженность активной цитоплазмы и расположение веретен деления всех четырех бластомеров оказывается в направлении анимально-вегетативной оси. Соответственно, борозды третьего дробления проходят в широтной плоскости и разделяют каждый из четырех бластомеров на верхний, анимальный, небольшого размера микромер и нижний, вегетативный, более крупный макромер (рис. 33, Г-Г).

Правила Гертвига также вполне применимы в отношении развития других яиц теллецитального типа - у костистых рыб, рептилий и птиц.

Бластуляция, типы бластул.

Бластуляцией называется заключительная фаза периода дробления яйца у Metazoa. Отличительными особенностями данной фазы являются следующие:

1. Начинается эпителизация стенок зародыша. Составляющие его клетки вступают в более тесное взаимодействие, формируя одно- или многослойную стенку тела - **бластодерму**.

2. За редким исключением, внутри зародыша образуется все увеличивающаяся первичная полость тела - **бластоцель** (Бэровская полость), окруженная бластодермой (рис. 34, 36).

3. Деления клеток становятся все более асинхронными, продолжительность митотических циклов возрастает за счет удлинения интерфазы, а, конкретнее, за счет появления фазы G_1 .

В результате дробления образуется бластула - многоклеточный, анатомически замкнутый зародыш с полостью внутри. Стадию бластулы проходят в своем развитии все Metazoa, что является одним из показателей общности происхождения животного мира. В зависимости от строения различают следующие типы бластул:

Целобластулу - однослойную бластулу с большим бластоцелью сферической (иглокожие, ланцетник) или вытянутой (некоторые кишечнополостные) формы (рис. 34, Б);

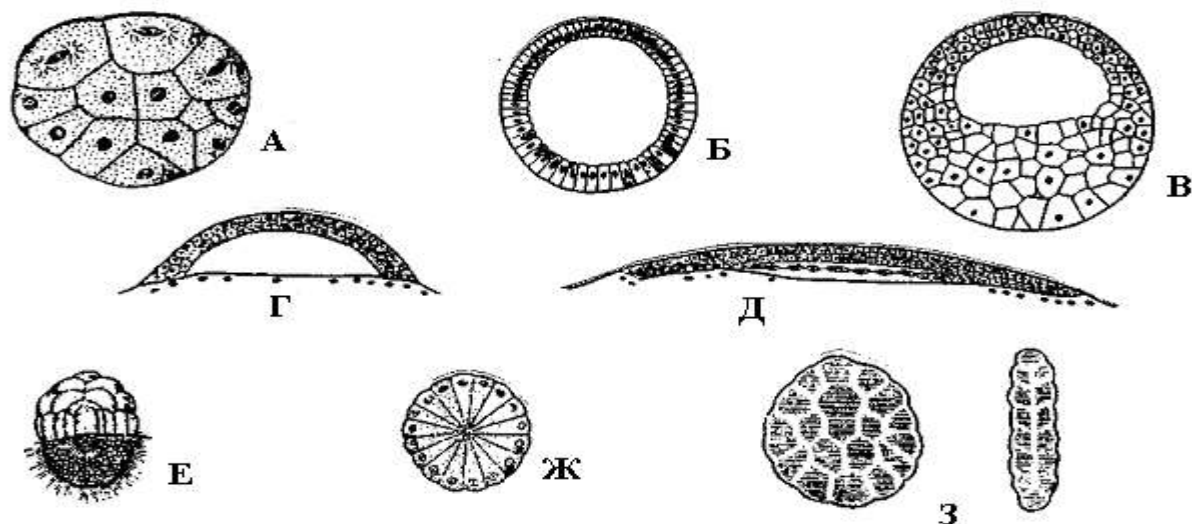


Рис. 34. Типы бластул. А - морула Clava; Б - бластула морского ежа; В - бластула лягушки; Г - бластула костистой рыбы; Д - бластодиск птицы; Е - плавающая амфибластула губки; Ж - стерробластула *Lucernaria*; З - плакула *Cusculanus elegans* (вид сбоку и сверху).

Стерробластулу (рис. 34, Ж) - бластулу с толстыми, равномерной толщины стенками и с очень маленьким, расположенным в центре, бластоцелом (моллюски, черви, плацентарные млекопитающие).

Перибластулу - бластулу с однослойной перидермой, окружающей массу нераздробившегося желтка. В желтке видны ядра. Перибластула формируется в результате поверхностного дробления центролецитальных полилецитальных яиц членистоногих.

Дискобластулу, которая имеет вид диска из нескольких слоев клеток, лежащего на нераздробившейся массе желтка (рис. 34 Г, Д). Образуется в результате дискоидального дробления телолецитальных полилецитальных яиц костных рыб, рептилий и птиц.

Плакулу - бластулу имеющую вид двухслойной пластинки, которая образуется в результате того, что бластомеры при полном дроблении располагаются в двух параллельных плоскостях (Рис 34, З). Встречается в развитии наземных олигохет.

Некоторые эмбриологи выделяют также **амфибластулу** как разновидность целобластулы, но с многослойными стенками (бластодермой), образованными мелкими (в анимальном полушарии) и крупными (в вегетативном) бластомерами. Встречается у губок, малощетинковых червей и амфибий (рис. 32, 34, В).

На стадии бластулы все презумптивные (предполагаемые, будущие) зачатки органов выходят на поверхность зародыша. Их положение и окончательную судьбу можно установить, нанося цветные метки в различные участки бластулы и прослеживая их последующие движения и

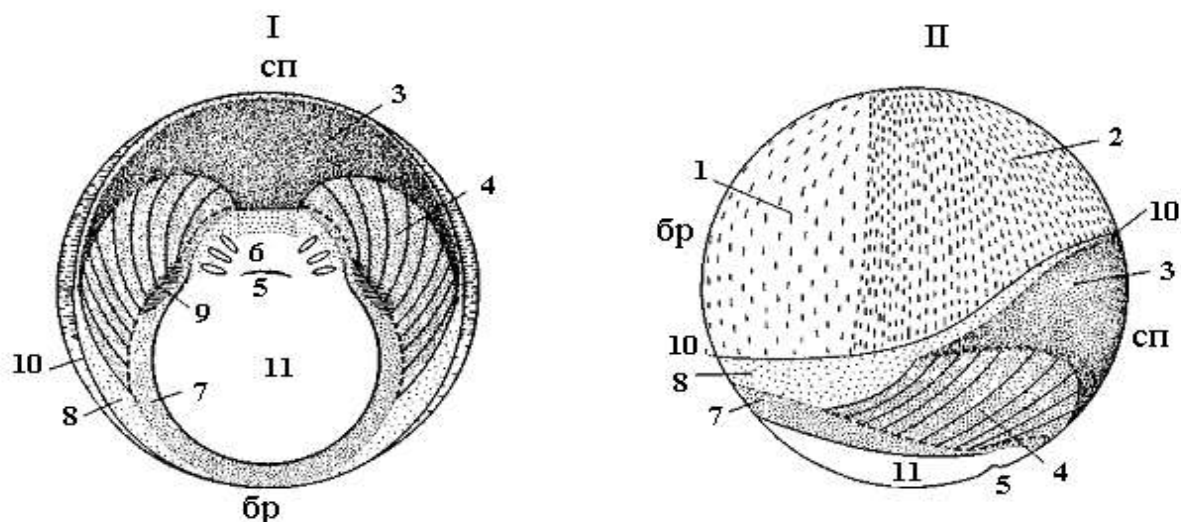


Рис. 35. Карта презумптивных зачатков разных органов у зародышей тритона на стадии бластулы – ранней гастрюлы (по Vogt, 1929). I - Вид со стороны спинной губы бластопора. II - Вид сбоку (правая сторона). 1 - эпидермис; 2 - нервная пластинка; 3- хорда; 4- сомиты; 5 - спинная губа бластопора; 6 - жаберные карманы; 7 - боковые пластинки; 8 - хвост; 9 - передняя конечность; 10 – граница инвагинирующего материала; 11 - энтодерма.

превращения. Первым карты-схемы презумптивных органов составил немецкий эмбриолог Вальтер Фохт (1888-1941 гг.). Он брал предварительно пропитанные малотоксичными витальными красителями кусочки агар-агара и прижимал их к различным участкам поверхности бластулы. Краски диффундировали и окрашивали прилегающую область зародыша. Проследивая дальнейшие перемещения и превращения окрашенных участков, можно было определить, куда переместится каждый участок после гастрюляции и в зачаток какого органа превратится (рис. 35).

Таким образом, бластула - это многоклеточный зародыш, который состоит из разнородных клеток и имеет разнокачественную пространственную организацию, на основе которой разворачиваются процессы последующего развития.

Вопросы для самоконтроля:

1. Общая характеристика процесса дробления.
2. Особенности деления клеток в период дробления (отсутствие роста клеток, малая продолжительность митотического цикла).
3. Правила клеточного деления Гертвига-Сакса.
4. Типы дробления, их зависимость от распределения в цитоплазме желтка (полное: равномерное и неравномерное; частичное: дискоидальное и поверхностное) и от свойств цитоплазмы (радиальное, спиральное, двусимметричное).
5. Бластуляция, типы бластул
6. Строение бластулы у животных с разным типом дробления.
7. Особенности дробления и образования бластоцисты у млекопитающих.
8. Структура клеточного цикла в период синхронных делений дробления.

9. Биохимия дробления. Синтез ДНК, РНК и белков в период синхронных и асинхронных делений дробления.
10. Смена функции материнского генома зародышевым.
11. Интеграция зародыша в процессе дробления.

ГЛАВА ДЕВЯТАЯ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССА ДРОБЛЕНИЯ У НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ХОРДОВЫХ

Дробление яйцеклеток у асцидий. Дробление яйцеклеток ланцетника. Дробление яйцеклеток миноги. Дробление яиц акул и скатов (щележаберных). Дробление яиц костистых рыб. Дробление яиц амфибий. Дробление яиц рептилий. Дробление яйцеклеток птиц. Дробление яиц однопроходных, сумчатых и плацентарных млекопитающих. Явление компактизации. Однояйцевые и разнояйцевые близнецы.

Дробление яиц у асцидий. Яйцеклетки у асцидий олиголецитальные, телolecитальные. Дробление голобластическое (полное). Первые две борозды дробления меридиональные, они делят зародыш на 4 бластомера: 2 крупных и 2 - более мелких; третье и последующие деления дробления неравномерные. Интересно отметить, что плоскость первого деления устанавливает единственную плоскость билатеральной симметрии зародыша. На 32-клеточной стадии формируется небольшая бластоцель и начинается гастрюляция. Клеточные циклы вегетативных бластомеров несколько длиннее, чем у анимальных бластомеров, но примерно до 64-клеточной стадии дробление принято считать синхронным. Позже синхронность клеточных делений резко нарушается, и более высокая митотическая активность бластомеров анимального полушария становится резко выраженной. Гастрюляция начинается после седьмого деления дробления (124 клетки). Яйца и развитие относятся к детерминационному (мозаичному) типу. В яйцах некоторых оболочников, например, у *S. partita*, имеются окрашенные области цитоплазмы. При дроблении они распределяются между разными клетками. В зависимости от того, какую цитоплазму получит тот или иной бластомер, зависит его дальнейшая судьба. Клетки, в которые попадает светлая цитоплазма, образуют эктодерму; те, которым достается желтая цитоплазма - дают мезодерму; клетки с серо-голубыми включениями становятся энтодермой и т.д.

Дробление яиц ланцетника. Яйцеклетки ланцетника олиголецитальные, изolecитальные после первого редукционного деления и телolecитальные перед началом дробления.

Дробление полное, причем первые 7 делений (до стадии 128 бластомеров) почти синхронные, а, начиная с восьмого деления, дробление становится асинхронным. Неравномерное второе деление дробления определяет плоскость билатеральной симметрии. Третье деление, ортогональное первым двум, еще более неравномерное, проходит в широтной плоскости и разделяет 8-ми клеточный зародыш на четыре относительно мелких анимальных и четыре более крупных вегетативных бластомера. Внутренняя полость (бластоцель), заполненная однородным студенистым веществом, появляется на стадии 16-ти бластомеров (Рис.36). На стадии 128 бластомеров зародыш имеет вид типичной, слегка вытянутой однослойной целобластулы. Процесс гастрюляции начинается после увеличения числа клеток бластулы до тысячи.

Дробящееся яйцо ланцетника ранее считалось классическим примером недетерминированного, регуляционного развития. При искусственном разделении двухклеточного зародыша из каждого бластомера может развиваться уменьшенная, но полноценная личинка. Однако результат деления зародыша на 4-х клеточной стадии принципиально зависит от того, в какой плоскости рассекается зародыш. В случае деления зародыша на две половинки по плоскости 1-го деления дробления, как и в варианте с 2-х клеточным зародышем, из каждой половины развивается меньшая по размерам, но вполне полноценная личинка, а в случае деления по плоскости второго деления дробления, из каждой половины развиваются дефективные личинки. Подобная же ситуация наблюдается и на стадии восьми бластомеров. Поэтому яйцо и зародыш ланцетника на стадии дробления принято считать "недостаточно детерминированным" или "частично регуляционным". На стадии 128 бластомеров зародыш имеет вид типичной однослойной, слегка удлинненной целобластулы. Гастрюляция зародыша начинается со стадии примерно 1000 клеток.

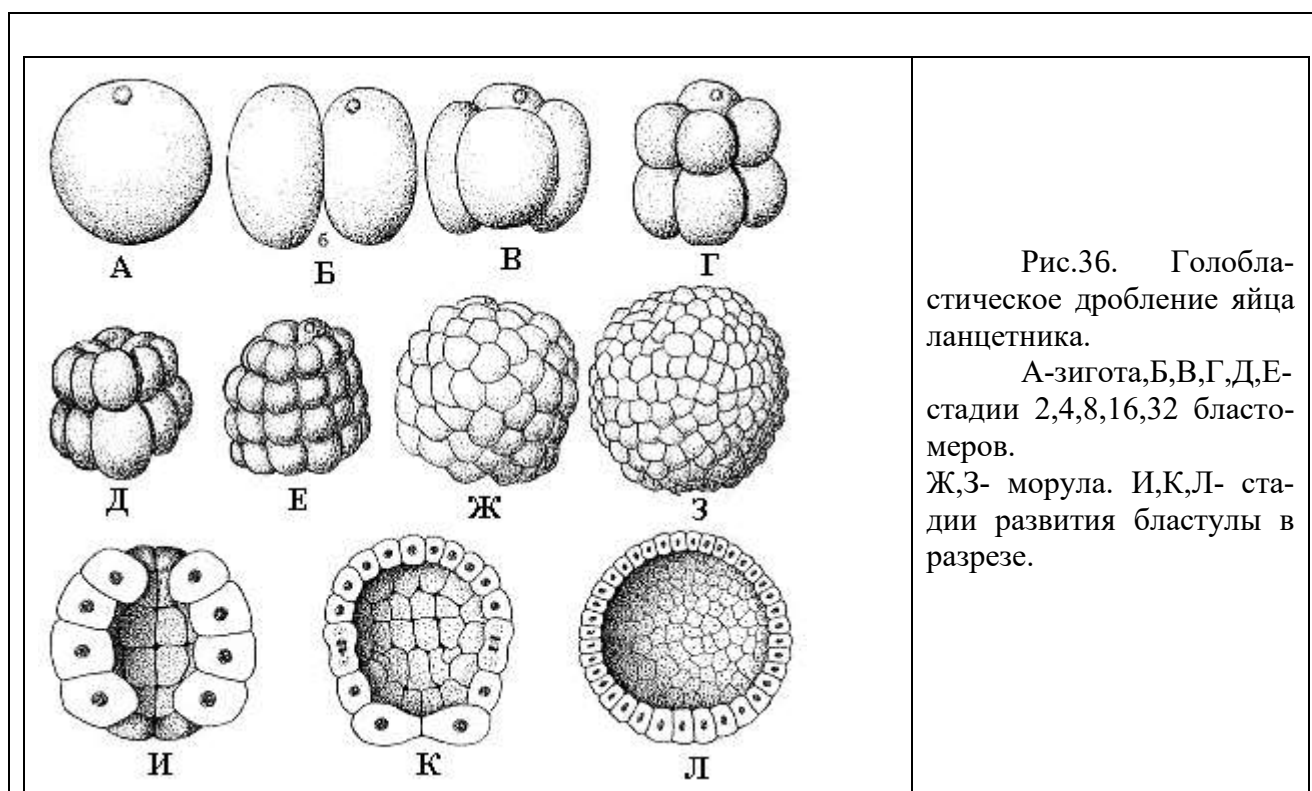


Рис.36. Голобластическое дробление яйца ланцетника.

А-зигота,Б,В,Г,Д,Е-стадии 2,4,8,16,32 бластомеров.

Ж,З- морула. И,К,Л- стадии развития бластулы в разрезе.

Позвоночные

Дробление яиц миноги. Яйца миноги мезолецитальные, телолецитальные. Дробление полное. Первые два деления дробления считаются равномерными, а, начиная с третьего, дробление становится неравномерным и асинхронным. Причем вегетативные бластомеры отличаются от анимальных более удлиненными митотическими циклами. На 8-16-ти бластомерной стадии становится заметной полость дробления. На стадии 128 бластомеров формируется типичная **целобластула** с многослойными стенками. Из-за выраженных разли-

чий в размерах между бластомерами анимального (микромеры) и вегетативного (макромеры) полушария её можно классифицировать и как **амфибластулу**. Наружный поверхностный слой постепенно эпителизируется, клетки уплощаются, соединяются между собой плотными контактами, как в эпидермисе. На стадии поздней бластулы бластоцель имеет значительные размеры, форма зародыша становится неравномерно-удлиненной из-за опережающего роста анимальной половины.

Дробление яиц акул и скатов (щележаберных). Яйца у щележаберных полилецитальные, телолецитальные. При оплодотворении описана полиспермия. Считается, что ядра "избыточных" сперматозоидов долгое время сохраняются в массе желтка рядом с бластодермой и могут участвовать в его утилизации.

Дробление частичное, дискоидальное. Борозда пятого деления дробления отделяет кучку бластомеров от желтка. Краевые бластомеры и слой самых нижних клеток бластодермы сохраняют связь с желтком. Первые шесть делений дробления являются более или менее синхронными. В последующем дробление становится асинхронным. В основании бластодермы формируется перибласт или слой мероцитов. В результате дробления образуется дискобластула, покрытая снаружи слоем плотно соединенных покровных клеток. Со временем щелевидная полость бластулы увеличивается, причем, в большей степени у одного из краев бластодермы. Считается, что структура бластодермы и форма бластодиска определяют оси и билатеральную симметрию будущего зародыша. При этом область расширенного бластоцеля соответствует каудальному концу зародыша.

Дробление яиц костистых рыб. Яйца полилецитальные, телолецитальные. Как и у щележаберных дробление частичное и дискоидальное. После оплодотворения свободная от желтка ооплазма собирается в области анимального полюса, где она поднимается над желтком в виде округлого колпачка. Первые два деления дробления меридиальные. Плоскости третьего деления вертикальные и располагаются таким образом, что образуется кружок из примерно одинаковых по размерам бластомеров. Начиная с четвертого, и, особенно пятого, деления, характер дробления усложняется из-за появления широтных борозд, которые, чередуясь с вертикальными, приводят к образованию многослойного бластодиска (рис. 30,34, Г). В результате образуется типичная дискобластула. Поверхностный слой бластомеров (перидерма) приобретает эпителиальную структуру, а подлежащие клетки формируют **эпибласт**. Самые внутренние бластомеры, находящиеся непосредственно на желтке, образуют желточный синцитий - **перибласт**. Между слоем клеток эпибласта и перибласта формируется масса рыхло расположенных клеток, обладающих способностью к амебоидному движению (гипобласт). Центр бластодиска постепенно приподнимается над желтком и между ними возникает полость - бластоцель. По мере размножения бластомеров бластодиск обрастает весь желток, формируя **желточный мешок**. Последний обеспечивает переработку желтка и характерен для зародышей рыб, рептилий, птиц, млекопитающих. Кроме того, в стенке желточного мешка формируются первые кровяные островки, образующие затем

кровеносные сосуды и клетки крови. Благодаря этому желточный мешок выполняет также дыхательную функцию.

Дробление яиц амфибий. Яйцеклетки у хвостатых и бесхвостых амфибий мезолецитальные, телолецитальные. Дробление протекает очень быстро, обычно завершаясь за 24 часа. Довольно большое количество желтка, сосредоточенного в вегетативном полушарии, затрудняет деление бластомеров вегетативной области. И хотя дробление полное, но оно неравномерное. Первая борозда начинается на анимальном полюсе и делит пополам серый серп. У аксолотля борозда дробления распространяется в анимальной области со скоростью, близкой к 1 мм/мин, а при приближении к вегетативному полюсу, богатому желтком, скорость падает до 0,03 мм/мин. В то время, когда борозда первого деления дробления еще не завершила деления вегетативного полушария, борозда второго деления уже намечается в области анимального полюса.

И первое, и второе деления дробления осуществляются меридианально направленными ортогональными бороздами, в результате чего образуются четыре примерно одинаковых бластомера. Третья борозда проходит в горизонтальной, широтной плоскости, гораздо ближе к анимальному полюсу из-за большой концентрации желтка в вегетативном полушарии. Она разделяет зародыш на 4 более мелких бластомера (**микромера**) в анимальном полушарии и 4 более крупных (**макромера**) - в вегетативном полушарии. В результате возникает область быстро делящихся бластомеров анимальной области и область медленно делящихся, более крупных, богатых желтком бластомеров вегетативной области.

До 64-клеточной стадии, которая обычно называется **морулой** дробление синхронное, а последующие волны митотических делений становятся асинхронными из-за более медленного прохождения борозд дробления в вегетативном полушарии. По окончании стадии морулы, на 128-клеточной стадии в анимальном полушарии между клетками появляется незначительных размеров бластоцель, которая постепенно увеличивается (рис. 31).

Бластоцель, вероятно, выполняет две основные функции. Во-первых, она представляет собой полость, которая дает возможность клеткам при гастрюляции мигрировать внутрь зародыша. Во-вторых, полость разъединяет бластомеры, препятствуя их преждевременному взаимодействию.

Зародыш называется амфибластулой начиная с 128-клеточной стадии до того момента, когда начинаются обширные морфогенетические перемещения клеток, характерные для гастрюляции. К этому времени зародыш состоит из 10-15 тысяч бластомеров, и в нем можно различить три основные области: 1) область вокруг анимального полюса, состоящую из относительно мелких, пигментированных клеток, образующих крышу бластоцеля и примерно соответствующих клеткам будущего эктодермального зародышевого листка; 2) область прилегающую к вегетативному полюсу, которая состоит из крупных, богатых желтком бластомеров - презумптивную энтодерму; 3) краевое кольцо поверхностных клеток в субэкваториальной области зародыша, включая материал серого серпа - будущую хордомезодерму.

Дробление яиц рептилий. Яйца полилецитальные, телолецитальные.

Дробление частичное, дискоидальное. Первая и вторая борозды ортогональны и проходят в меридианальной плоскости. Третья и четвертая борозда также меридианальны, но направление их не связано с расположением первых борозд. Последующие деления дробления направлены как тангенциально, так и меридионально, процесс дробления асинхронен ввиду удлиненных митотических циклов в клетках периферической части зародышевого диска, по сравнению с клетками центральной части. Результатом этого является то, что центр бластодиска состоит из мелких автономных клеток, расположенных в несколько слоев, а по периферии формируется краевой перибласт. В желточном слое, подстилающем бластодиск, образуется многоядерная структура наподобие перибласта у рыб. Под многослойной частью бластодиска формируется полость, получившая название подзародышевой полости, заполненная разжиженным желтком. Центральная светлая часть диска с подлежащей подзародышевой полостью получила название **area pellucida**, а более темная периферическая область с краевым перибластом и прилегающими к желтку клетками - **area opaca**. Периферический перибласт отделяет заполненные желточными гранулами клетки - **мероциты**, которые включаются в основании зародышевого диска по его периферии. Клетки, покрывающие бластодиск снаружи, удлиняются, образуя структуру цилиндрического эпителия.

Дробление яйцеклеток птиц. На анимальном полюсе оплодотворенного яйца виден небольшой (у кур около 3 мм в диаметре) беловатый бластодиск (зародышевый диск), представляющий собой область свободной от желтка ооплазмы. Бластодиск окружен более темной краевой областью - перибластом.

Дробление полилецитальных, телолецитальных яиц птиц дискоидальное, меробластическое, как и у рептилий.

Первая борозда дробления возникает в центре бластодиска и лежит в той же плоскости, что и хромосомная пластинка во время метафазы. У основания борозды обнаружены микрофиламенты. Дробление яиц птиц неравномерное и после третьего деления становится асинхронным. Веретена деления располагаются таким образом, что каждая последующая борозда дробления перпендикулярна предшествующей борозде. Четвертая борозда дробления опоясывает бластодиск, отделяя центральную группу бластомеров от периферических клеток.

Отличительной особенностью образованных в результате первых делений дробления бластомеров является то, что они окружены плазматическими мембранами только с верхней и боковых поверхностях, а снизу их цитоплазма переходит в подлежащий желток.

Дальнейшие деления клеток в этом диске, который превращается в **бластодерму**, приводят к радиальному росту зародыша.

Помимо делений на поверхности бластодиска у 32-клеточного зародыша происходит деление клеток в плоскости параллельной поверхности, в результате чего образуется поверхностный слой обычных клеток и лежащий под ним слой клеток, переходящих в желток. Последующие подобные деления приводят к образованию многослойной бластодермы. Борозды дробления, начавшись в центре диска, идут в центробежном направлении, но не доходят до его краев. Периферическая часть бластодермы, соприкасающаяся с перибластом, остается

однослойной, и её клетки не обособлены от желтка. Образование подзародышевой полости совпадает со стадией примерно 100-клеточного зародыша.

Как и у рептилий, центральная часть бластодермы с подлежащей подзародышевой полостью, называется **area pellucida**, а периферическая, в которой клетки бластодермы непосредственно примыкают к желтку - **area opaca**.

Очень рано с нижней поверхности бластодермы, начиная с её каудального конца, происходит отделение клеток и их скоплений (деляминация). Ко времени откладки яйца (яйцо курицы состоит к этому моменту примерно из 60000 бластомеров) отделившиеся клетки объединяются в тонкую дисковидную структуру - **первичный гипобласт**. Особенно ярко выражен данный процесс на заднем конце зародыша. Наружный слой бластодермы (эпибласт) отделен от первичного гипобласта узкой полостью - **бластоцелом**. Впоследствии первичный гипобласт дает внезародышевую энтодерму, а эпибласт - ткани собственно зародыша. Первичный гипобласт обладает полярностью, которую он передает раннему эпибласту и которая определяет локализацию и направление будущей **первичной полоски**.

Считается, что двухслойная бластодерма птиц соответствует уплощенной бластуле амфибий. При этом эпибласт сопоставляют с анимальным, а первичный гипобласт - с вегетативным полушариями зародыша амфибий, в частности, из-за наличия полярности и способности индуцировать образование мезодермы из раннего эпибласта под влиянием гипобласта.

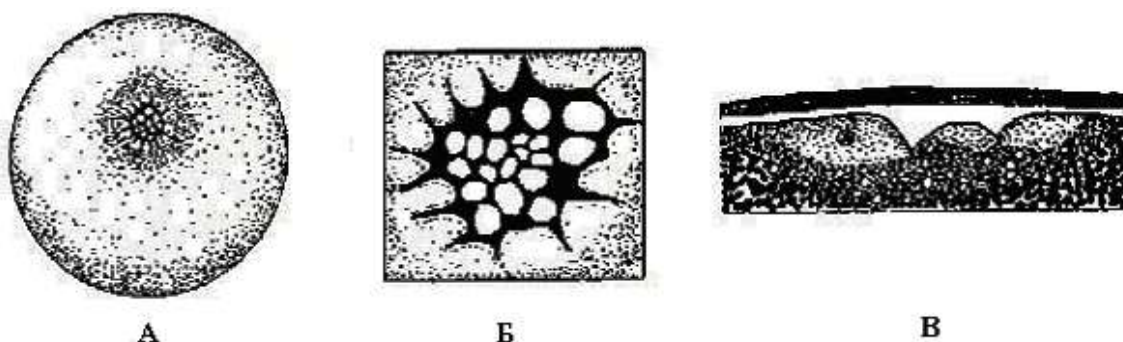


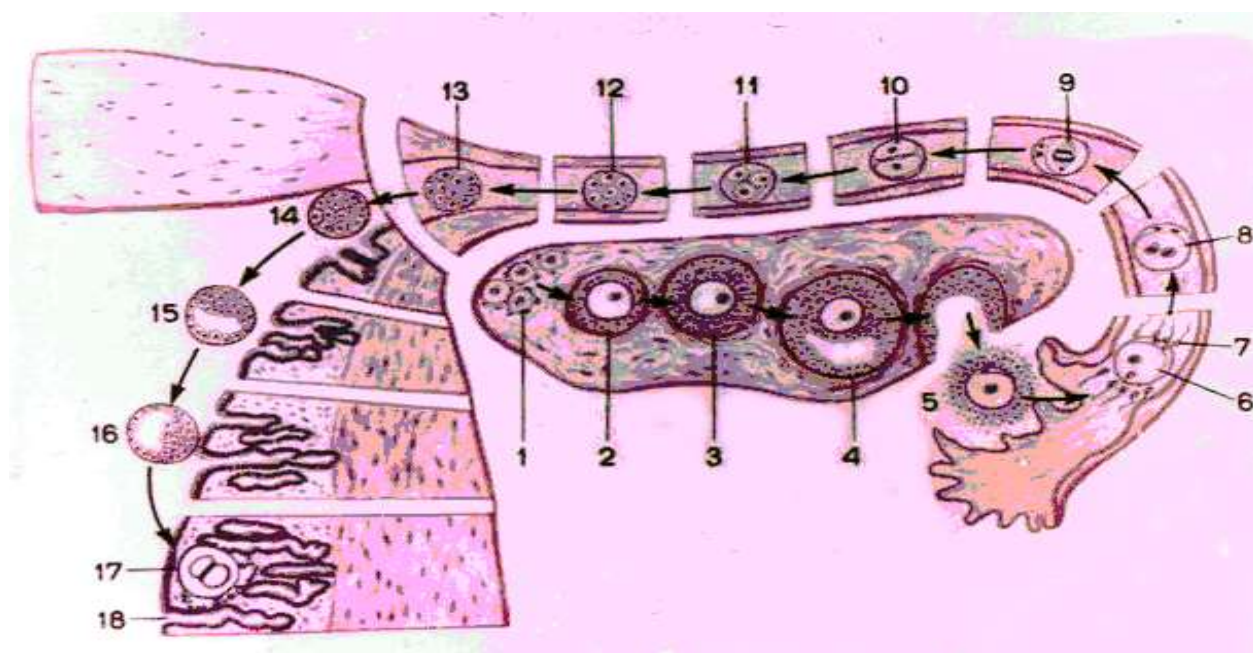
Рис. 37. Дробление яйцеклетки у яйцекладущих (утконос, ехидна). А. Общий вид дробящегося яйца, в центре видны бластомеры; Б. Зародыш на стадии 32 бластомеров; В. Срез через бластодиск на 48-клеточной стадии;

Дробление яиц млекопитающих. У однопроходных яйца полилецитальные, телолецитальные. Дробление дискоидальное, похожее на дробление яиц рептилий (рис. 37). Снаружи бластодиск ограничен одним слоем клеток, в подлежащем слое клетки расположены рыхло.

У сумчатых яйца олиго- или мезолецитальные, телолецитальные. Дробление полное, но у некоторых видов несет черты частичного дискоидального. Бластомеры формируют шаровидную структуру, полость которой заполнена "разжиженным" желтком. В процессе дробления желток выделяется в межклеточное пространство из бластомеров в виде гранул (дегрануляцией).

У плацентарных млекопитающих яйца алецитальные, а потому чрез-

вычайно мелкие. Зигота человека имеет диаметр всего около 100 мкм. Дробление полное, первоначально равномерное, затем выражено неравномерное, асинхронное. Обычно процесс дробления у млекопитающих протекает гораздо медленнее, чем у большинства других позвоночных. Первое деление дробления занимает более 24 часов, а последующие - около 12 часов каждое. Во время первых делений дробления реснички слизистой яйцевода медленно перемещают оплодотворенное яйцо по яйцеводу в матку (рис.38). После 4-5 делений дробления зародыш представлен плотным скоплением клеток (морула) внутри *zona pellucida* (рис. 35 е,ж). Переход от морулы к бластуле происходит очень быстро и заключается в радикальной перестройке морфогенетической организации зародыша. Бластула, состоящая примерно из 58 клеток, называется **бластоцистой**. Клеточный материал бластоцисты дифференцируется на светлые клетки, образующие однослойный полый шаровидный **трофобласт** и внутреннюю массу темных клеток - **зародышевый узелок**, или **эмбриобласт** (рис. 39).



Р

ис. 38. Развитие зародыша человека от оплодотворения до имплантации в слизистой матки. 1-примордиальные фолликулы; 2-4. Растущие фолликулы; 5-овуляция овоцита, окруженного фолликулярными клетками; 6-7. оплодотворение спермием в верхней трети яйцевода; 8-13. Дробление яйца до стадии морулы в ходе движения по яйцеводу; 14-16. Образование в матке бластоцисты; 17-18. Имплантация бластоцисты в слизистую матки на 6-8 сутки после овуляции;

Дальнейшие процессы формирования зародыша сосредоточиваются в зародышевом узелке. Начиная примерно с 16-клеточной стадии скорость дробления увеличивается, а в центре зародыша путем секреции образуется большая, заполненная жидкостью полость - **бластоцель**. Удержанию жидкости способствует образование плотных контактов между клетками трофобласта. Кроме того, для популяции клеток трофобласта характерна способность вызывать специфические изменения в слизистой оболочке матки в ходе имплантации за-

родыша. Впоследствии трофобласт участвует в формировании плаценты.

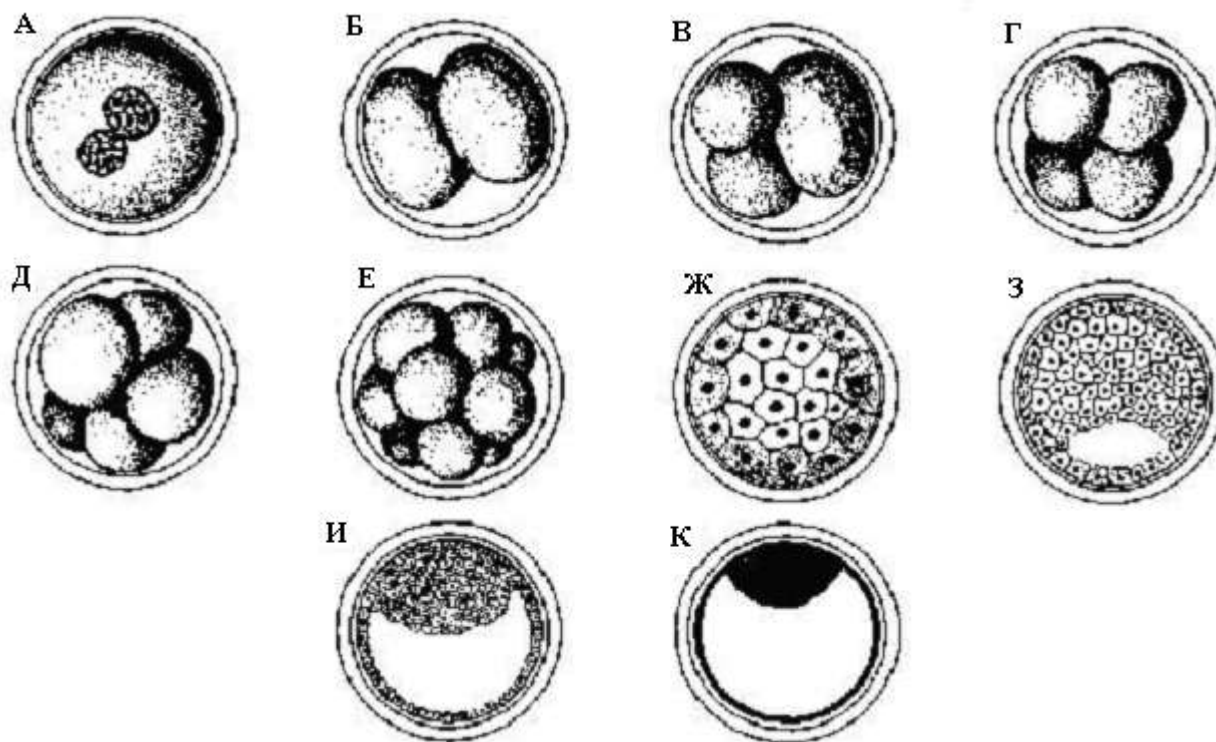


Рис. 39. Дробление человеческой яйцеклетки и возникновение бластоцисты (схематическая реконструкция по известным работам в соответствии с процессом дробления у обезьяны *Macacus rhesus*). А - оплодотворённая яйцеклетка, Б-Е возникновение морулы, Ж - разрез морулы, клетки, образующие трофобласт, З-И возникновение бластоцисты, К - схема бластоцисты с дифференциацией на трофобласт и эмбриобласт.

Одной из характерных особенностей дробления у млекопитающих является процесс **компактизации**. На 8-ми клеточной стадии (Рис. 40) бластомеры располагаются рыхло и между ними остаются большие пространства. После третьего деления бластомеры внезапно сближаются, площадь контакта между ними максимально возрастает и они формируют компактный клеточный шар. (Рис.39)



Рис.40. Схематический рисунок компактизации и образования бластоцисты. А,Б. 8-клеточный зародыш. В-морула. Г-бластоциста.

Эта тесная упаковка стабилизируется плотными контактами, которые образуются между клетками, расположенными на поверхности шара и изолируют

лежащие внутри клетки. Между клетками внутри шара возникают щелевые контакты, которые позволяют малым молекулам и ионам переходить из клетки в клетку.

При этом, во-первых, перед компактизацией в каждом из восьми бластомеров происходит явление **поляризации** - упорядоченное перемещение гликопротеинов клеточной поверхности к наиболее удаленным от центра зародыша полюсам.

Во-вторых, важную роль в компактизации играют специфические белки клеточной поверхности, в частности **увоморулин** - гликопротеин с молекулярной массой 120 000 дальтон, функционирующий на соединяющих соседние клетки микроворсинках в качестве медиатора межклеточной адгезии.

В-третьих, плазматическая мембрана при компактизации также значительно изменяется вследствие реорганизации цитоскелета при перестройках актина.

Клетки компактизированного зародыша делятся и образуют 16-клеточную морулу. Она состоит из небольшого числа внутренних клеток, окруженных слоем более многочисленных наружных клеток. В последующем большая часть потомков наружных клеток становятся клетками **трофобласта**, который преобразуется в хорион, являющийся частью плаценты. То есть эти клетки образуют временную вспомогательную ткань, которая отбрасывается при рождении. А внутренние клетки, формирующие **эмбриобласт**, дают организм со всей его неповторимой судьбой. При этом, из всей внутренней клеточной массы лишь три бластомера данной стадии непосредственно формируют будущий организм.

Интересно, что развитие клеток зародыша в том или ином направлении, их дальнейшая судьба определяется просто тем, в каком месте оказалась данная клетка в соответствующий момент: снаружи или внутри клеточной массы.

Близнецы

На основании огромного статистического материала в различных странах считается, что примерно на 100 обычных родов приходятся одни роды близнецов (около 1%). При этом, наибольшая частота рождения близнецов обнаружена среди негров Африки (4,5%), а наименьшая - среди монголоидных популяций, особенно в Японии. Близнецов человека разделяют на две основные группы: монозиготные (однояйцовые, идентичные) и дизиготные (двуяйцовые, неидентичные) близнецы. Монозиготные близнецы развиваются из одного зародыша, клетки и части которого почему-то разъединились, а дизиготные - развиваются в результате двух независимых процессов оплодотворения разных яйцеклеток разными же спермиями. В экспериментах показано, что изолированные бластомеры способны к развитию в полноценный взрослый организм. Более того, даже один бластомер 8-ми клеточного зародыша может успешно развиваться в полноценную взрослую особь. Эту способность части клеток давать целый организм называют эмбриональной **регуляцией**. Инъекция клеток внутренней клеточной массы в бластоцисту показала, что они способны принимать участие в образовании нового организма. То есть, идентичные близнецы

(у человека они встречаются в среднем в 1 случае из 400) возникают в результате деления бластомеров на ранних стадиях эмбриогенеза. Развитие эмбриона происходит в специальном внезародышевом органе - **хорионе**, участвующим в образовании **плаценты**, через которую осуществляется связь с материнским организмом. Хорион образуется на пятые сутки, а к девятым суткам формируется другой внезародышевый орган - **амнион**, заполненный амниотической жидкостью, которая окружает зародыш, защищая его от высыхания и последствий различных толчков и резких движений матери. Примерно 67% - идентичных близнецов имеют общий хорион, а 33% - два полноценных независимых хориона. Небольшой процент однояйцевых близнецов имеют общий хорион и общий амнион, что означает, что их разделение произошло после 9 суток беременности. В этом случае возникает риск появления сросшихся между собой новорожденных ("сиамских близнецов"). К слову сказать, близнецы в некотором отношении составляют группу риска из-за повышенной смертности в родах (по данным итальянских ученых из числа dizygotных близнецов мертворожденных и гибнущих вскоре после родов - 8%, а из числа monozygotных - 21%), недоношенности, задержке соматического развития и его аномалий (Б.Коган, 1993).

Вопросы для самоконтроля:

1. Общая характеристика процесса дробления.
2. Особенности деления клеток в период дробления (отсутствие роста клеток, малая продолжительность митотического цикла).
3. Правила клеточного деления Гертвига-Сакса.
4. Типы дробления, их зависимость от распределения в цитоплазме желтка (полное: равномерное и неравномерное; частичное: дискоидальное и поверхностное) и от свойств цитоплазмы (радиальное, спиральное, двусимметричное).
5. Строение бластулы у животных с разным типом дробления.
6. Особенности дробления и образования бластоцисты у млекопитающих.
7. Структура клеточного цикла в период синхронных делений дробления.
8. Биохимия дробления. Синтез ДНК, РНК и белков в период синхронных и асинхронных делений дробления.
9. Смена функции материнского генома зародышевым.
10. Интеграция зародыша в процессе дробления.
11. Мозаичные и регуляторные яйца, условность этой классификации, опыты по разделению и слиянию бластомеров, умерщвлению отдельных бластомеров.
12. Эквивалентность ядер в процессе дробления. Эксперименты Шпемана по перемещению ядер. Опыты пересадки и инактивации ядер.
13. Возникновение однояйцевых близнецов.

ГЛАВА ДЕСЯТАЯ

ГАСТРУЛЯЦИЯ

Гаструляция. Различные способы гаструляции и особенности строения гаструл у хордовых. Значение исследований А.И. Ковалевского и И.И. Мечникова в создании теории зародышевых листков. Образование двух- и трехслойного зародыша: эктодерма, энтодерма, мезодерма. Способы образования мезодермы (телобластический, энтероцельный). Производные зародышевых листков. Гаструляция у ланцетника, амфибий рыб, птиц и млекопитающих. Опыты маркировки. Карты презумптивных зачатков на стадии ранней гастролы. Морфогенетические движения (инвагинация, эпибolia, иммиграция, деляминация). Механизмы морфогенетических движений клеток (явления слияния и отталкивания клеток, неравномерность клеточных делений, направленные движения клеток). Опыты разделения и рекомбинации частей зародыша, удаление, пересадка и эксплантация презумптивных зачатков на разных стадиях гаструляции. Индукция нервной системы. Понятие компетенции зародышевого материала. Теория зародышевых листков и ее современное состояние.

С завершением процесса дробления и формированием многоклеточной бластулы заканчивается цитотипический и начинается органотипический период развития. В зародыше, наряду с митотическими делениями клеток, начинаются интенсивные **морфогенетические движения**, включающие перемещение отдельных клеток, а чаще клеточных пластов, взаимообусловленные изменения клеточной формы, вселение и выселение сотен и тысяч клеток. В ходе гаструляции эти клетки приобретают новых соседей и вступают с ними во взаимодействие, что приводит к формированию первичных зародышевых листков (наружного - **эктодермы** и внутреннего - **энтодермы**). В процессе гаструляции (иногда позже) у всех Metazoa, за исключением двухслойных губок и кишечнополостных, начинает обособляться третий, средний зародышевый листок - **мезодерма**, который располагается между уже образованными экто- и энтодермой и поэтому называется вторичным.

Процесс дифференциации сравнительно однородного зародыша на различные зародышевые листки называется **гаструляцией** а многослойный зародыш - **гастролей**. В ходе гаструляции органообразующие участки бластулы перемещаются и перестраиваются таким образом, что становится возможным следующий этап развития - формирование основных зачатков органов в результате индукционных взаимодействий органообразующих компетентных участков.

Все многообразие морфогенетических перемещений клеточного материала, лежащее в основе гаструляции можно свести к процессам **эмболии** и **эпиболии**.

Эмболия включает такие виды перемещений, как: инволюция, инвагинация, конвергенция, дивергенция, деляминация, растяжение и сокращение бластопора. Все перемещения клеточного материала внутрь зародыша от бластопора и ниже осуществляется путем эмболии.

В процессе **инволюции** клетки, расположенные по краю губ бластопора, перетекают через губы бластопора внутрь зародыша, разворачиваются и движутся на другом уровне.

Конвергенция - это движение клеток к губам бластопора. **Инвагинация** - это впячивание участка бластодермы с образованием новой полости, окруженной клетками данного участка. **Полиинвагинация** - это множественное попадание клеток внутрь в разных точках бластодермы. **Деляминация** - это расщепление пластов или клеточных масс на отдельные слои. **Дивергенция** - это расхождение клеток в стороны. **Экстензия** (растяжение) - это удлинение презумптивной нейральной эктодермы и эпидермиса, материала хорды и мезодермы после их погружения в бластоцель. Экстензия обладает большой автономией и является важным компонентом гастрюляции хордовых, играющей большую роль в становлении формы зародыша.

Эпиболия - включает преимущественно поверхностные перемещения клеточного материала вдоль передне-задней оси будущего зародыша и в обе стороны от неё.

В зависимости от типа исходной бластулы и от того, какое из морфогенетических движений преобладает, различают несколько основных способов образования двухслойного зародыша (гастрюляции).

Относительно простой способ **инвагинация** - впячивание части стенки бластулы (бластодермы) внутрь зародыша в бластоцель, что приводит к образованию гастрюлы с полостью - гастрюцелом, ограниченной двухслойной стенкой (первичной энтодермой внутри и первичной эктодермой снаружи). Гастрюцель называют ещё **архентероном** (первичным кишечником), а отверстие, которым он сообщается с внешней средой, - **бластопором** или первичным ртом (рис. 41 Д₁, Д₂), края которого, в зависимости от расположения, принято именовать дорсальной, вентральной и латеральными губами. Те животные, у которых бластопор после некоторой перестройки и усложнения превращается в дефинитивное ротовое отверстие, образуют группу первичноротых (Protostomia), а те, у которых бластопор в ходе развития превращается в анальное отверстие или (у хордовых) в нервно-кишечный канал, относятся к вторичноротым (Deuterostomia). Ротовое отверстие у последних формируется на переднем конце тела, на брюшной стенке, путем впячивания эктодермы, прободения стенки средней кишки и других формообразовательных процессов. Инвагинационный тип гастрюляции распространен достаточно широко среди животных с маложелтковыми яйцами (высшие кишечнополостные, иглокожие, ланцетник и др.).

Процесс вворачивания дна бластулы при инвагинации сопровождается усиленным размножением и поверхностным перемещением клеток боковых стенок в вегетативном направлении (**вегетопетально**). Как уже указывалось, поверхностные вегетативные движения клеток называют эпиболией.

Гастрюляция путем инвагинации возможна, естественно, лишь при наличии хорошо выраженного бластоцеля. Если же бластоцель имеет небольшие размеры, а вегетативные макромеры из-за перегруженности желтком инертны в митотическом и двигательном отношении, то гастрюляция может происходить путем эпиболии – например у некоторых малощетинковых червей интенсивно

размножающиеся микромеры обрастают богатым желтком вегетативные макромеры (рис. 41, Е).

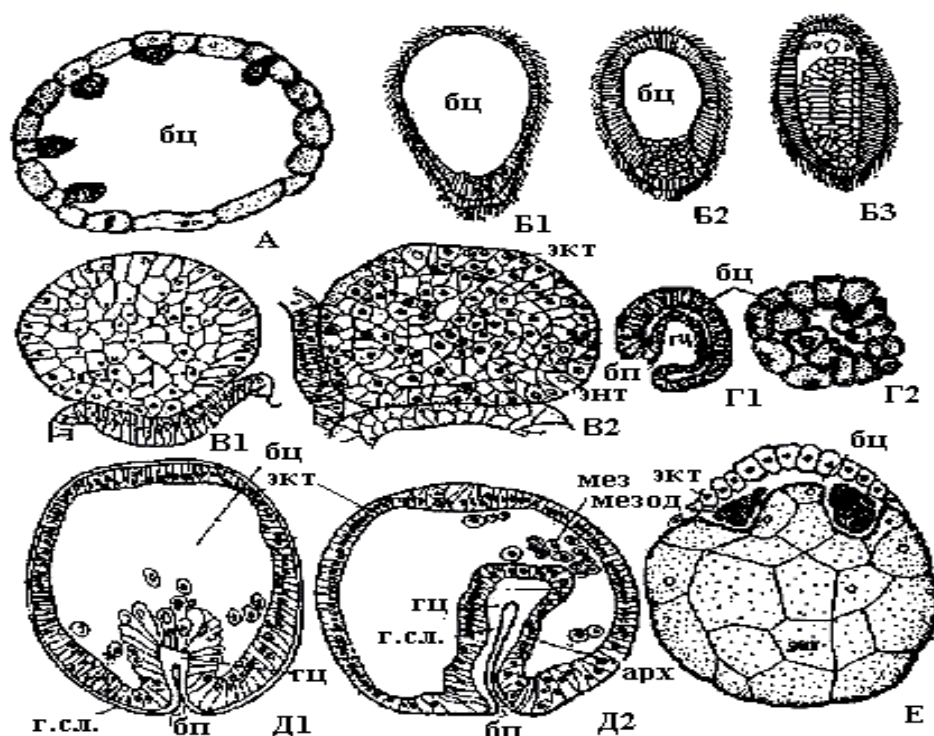


Рис. 41. Типы гастрюляции (по П.П. Иванову, 1937). А - мультиполярная иммиграция, Б1- Б2 - последовательные стадии униполярной иммиграции, В1, В2 - деляминация у гидроидного полипа *Clava multicornis*, Г1 - гастрюляция у сцифомедузы *Aurelia flavidula*, Г2 - у *Aurelia marginalis*, Д1, Д2 - последовательные стадии гастрюляции у морского ежа, Е - эпиболия у малощетинкового червя *Rhynchelmis*. арх - стенка архентерона, бп - бластопор, бц - бластоцель, г.сл. - гиалиновый слой, покрывающий зародышей морского ежа, гц - гастрощель, мез - эмбриональная мезенхима, мезод - целомическая мезодерма, экт - эктодерма, ант - энтодерма.

По мнению выдающегося русского ученого, нобелевского лауреата И.И.Мечникова, эволюционно наиболее древним типом гастрюляции является **иммиграция**, когда внутренний зародышевый листок образуется за счет выселения (иммиграции) в бластоцель части клеток бластодермы (рис. 41,А,Б). Обычно клетки выселяются из какого-то одного, определенного участка бластодермы (униполярная иммиграция у гидромедуз), реже из двух противоположных участков (биполярная иммиграция). Иногда выселение клеток происходит по всей поверхности бластулы (мультиполярная иммиграция, открытая И.И.Мечниковым у зародыша медузы *Solmundella*).

В тех случаях, когда морфогенетические перемещения клеток сильно ограничены, в частности, из-за отсутствия бластоцели, или по каким-то иным причинам, имеет место расслоение (деляминация) однослойной бластодермы на экто- и энтодерму (рис. 41, В₁, В₂). И.И. Мечников описал деляминационный тип гастрюляции при развитии яиц сцифомедузы *Geryonidae*.

Бластомеры на 32-клеточной стадии делятся таким образом, что борозда дробления проходит параллельно поверхности зародыша, и слой клеток делит-

ся на два: слой внутренних и слой наружных бластомеров. Затем слой внутренних бластомеров дробится еще раз бороздами, параллельными поверхности бластулы и в результате образуется гастрולה из эктодермального (64 клетки) и энтодермального (32 клетки) слоев.

У некоторых кишечнополостных, бластула которых представляет собой плотное скопление клеток без полости (морулу), клетки наружного слоя формируют эпителиоподобную однослойную эктодерму, отделяющуюся от внутренней массы клеток мембраной.

В обоих вышеописанных вариантах деляминационной гастрюляции клеточные перемещения не выражены.

Реально процесс гастрюляции редко идет строго по одной какой-то определенной схеме в чистом виде. Чаще имеет место сочетание нескольких способов образования зародышевых листков.

Так, например, гастрюляция у амфибий представляет собой сложный, многокомпонентный процесс, включающий в себя элементы **инвагинации**, **иммиграции** и **эпиболии**. Инвагинация клеток в ходе гастрюляции вначале ограничена областью, расположенной дорсально по отношению к желтку, и верхний край углубления известен под названием **дорсальной губы бластопора**. По мере развития инвагинации растущие внутрь края бластопора постепенно растягиваются, приобретая кольцевидную форму и заворачиваются внутрь, обрастая желток (рис. 42, А-В).

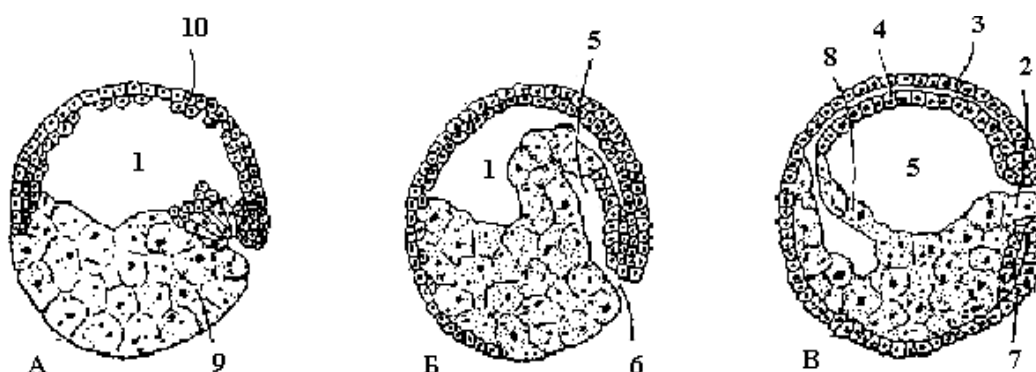


Рис. 42. Гастрюляция у амфибий- животных с мезолецитальными, телеолецитальными яйцами. 1 - бластоцель, 2 - желточная пробка, 3 - эктодерма, 4 - будущая хорда, 5 - гастрюцель, 6 - бластопор, 7 - мезодерма, 8 - энтодерма, 9 - желток, 10 - бластодерма.

По мере того, как одни клетки вворачиваются и мигрируют внутрь через губы бластопора, к последнему смещаются по поверхности бластулы, особенно активно в анимальном полушарии к дорсальной губе, новые клетки. Это движение клеток по сферической наружной поверхности растущего зародыша классифицируется как **эпиболия**. Клеточный материал, перетекший через дорсальную губу бластопора называют **хордомезодермой**, так как из него впоследствии образуется хорда и головная мезодерма.

Клетки, расположенные вокруг большей части внутреннего и боковых краев бластопора и растущие внутрь, где они выстилают соответствующие

области гастроцеля (первичной кишки), составляют **перспективную энтодерму**. Морфогенетические перемещения клеточного материала через губы blastopora внутрь зародыша включают в себя элементы **миграции** и **пролиферации** (размножения) клеток.

В некоторых формообразовательных процессах заметную роль играет согласованное изменение формы клеток. В изменении формы любой клетки принимают участие элементы цитоскелета и, прежде всего, такие структуры, как **микротрубочки**, **микрофиламенты**, промежуточные филаменты, а также **микротрабекулярная сеть**. Из перечисленных элементов цитоскелета наибольшее значение для морфогенеза имеют микрофиламенты и микротрубочки. Цитоскелет не только определяет форму клеток, но также участвует в их движении и в клеточном делении. Формирование в онтогенезе сложной структуры ткани или органа во многом определяется ультраструктурными особенностями цитоскелета входящих в их состав клеток.

Процесс гаструляции включает в себя как миграцию отдельных свободных клеток, так и перемещение клеточных пластов. Направление миграции обусловлено дистантными и контактными взаимодействиями. Дистантные взаимодействия в обычных морфогенезах, особенно ранних, настолько редки и маловероятны, что ими можно пренебречь, тогда как контактные, хорошо моделируемые в клеточных культурах, в эмбриогенезе довольно широко распространены. Ориентирующим субстратом в процессе морфогенеза могут служить натянутые фибриллы межклеточного вещества и соседние клетки. Для миграции клеток по внеклеточному матриксу важное значение имеют два белка: **фибронектин**, высокомолекулярный (400 000 дальтон) гликопротеин, который является одним из компонентов базальных мембран и **сульфатированные гликопротеины**, обнаруженные на поверхности выселяющихся в blastocoel клетки. Во время гаструляции резко возрастает сродство микромеров к фибронектину, а их двигательная активность связана с наличием сульфатированных гликопротеинов.

Многочисленными опытами, проведенными в начале 90-х годов, по механическому воздействию на эмбриональную мезенхиму из области закладки вентральных кровяных островков, было показано, что её 50-минутное сдавление между двумя покровными стеклами ведет к образованию тонкостенных сосудоподобных трубок и кольцевых структур. Ориентация фибрилл межклеточного матрикса, окружающих клетку, обычно совпадает с ориентацией микрофиламентов и, иногда, микротрубочек.

Для оценки значимости биологии клеток в морфогенетических процессах вообще и гаструляции в частности, сохраняют большое значение опыты, проведенные еще в 30-х годах Дж. Гольтфретером. Помещая кусочки ранних зародышей амфибий в безкальциевую и безмагниевою среду он добился их диссоциации на отдельные клетки. При добавлении в среду кальция происходила реассоциация этих клеток и формирование клеточных конгломератов. При диссоциации гаструл амфибий в реассоциированных конгломератах воссоединение клеток шло в соответствии с их происхождением из того или иного листка. То есть, клетки эктодермы соединялись с клетками эктодермы, мезодермальные с

клетками мезодермы, энтодермальные клетки - с аналогичными. В конечном счете в реассоциированном конгломерате восстанавливалось нормальное положение зародышевых листков.

Считается, что процесс реассоциации и сегрегации стохастический, основанный на случайных контактах клеток друг с другом, а потому восстановление прежней структуры обусловлено избирательной адгезией их мембран при контактных взаимодействиях. Согласно гипотезе Т. Роземана узнавание клеток основано на механизме типа фермент - субстрат. На поверхности взаимодействующих клеток расположены субстрат и фермент, которые обеспечивают соединение клеток. Кроме того, клетки гастрюлы амфибий обладают способностью к изменению формы и к амебоидному движению.

Клетки различных зародышевых листков различаются между собой адгезивными свойствами и подвижностью, так, клетки эктодермы при контакте друг с другом образуют непрерывный пласт, т.е. эпителизируются. Они имеют тенденцию обрастать мезодерму и энтодерму.

Мезодермальные клетки обладают склонностью инвагинировать в любое расположенное поблизости скопление клеток. Клетки энтодермы относительно неподвижны.

Избирательное сродство у зародышевых клеток амфибий проявляется на стадии поздней бластулы, когда возникает определенная разнокачественность клеток. Характерно оно, естественно, не только для зародышей амфибий, но и для других групп животных. В данном случае достаточно способности клеток ползать, узнавать и избирательно соединяться друг с другом, а в более сложных видах морфогенезов проявляются дополнительные качества, природа которых еще не изучена.

У некоторых видов животных, как правило, с крупными (более 300 мкм в диаметре) яйцами, с этапом гастрюляции связывают начало экспрессии генов зиготы. Это выражается в возникновении различий в клетках и ранней дифференцировке зародыша.

Дифференциальную активность генов в процессе гастрюляции отражают понятия **компетенция** и **детерминация**.

Компетенцией называется способность клеток зародыша реагировать на влияние других частей зародыша образованием соответствующих структур или дифференцировкой в нескольких определенных направлениях.

Детерминация (латентная дифференцировка) - это состояние, когда клетка уже вступила на путь определенной дифференциации, но морфологически это еще не различимо (таким образом, четкой границы между детерминацией и дифференцировкой нет).

По признаку ранней (после первых делений) экспрессии генов начало гастрюляции у млекопитающих следует отнести к периоду самых ранних стадий дробления, и поэтому данные процессы можно классифицировать как пример гетерохронии - неравномерности в темпах развития различных частей зародыша. Это свидетельствует о сложном характере гастрюляции и относительной независимости осуществляющих ее процессов.

Во многих случаях нормальное течение гастрюляции зависит от сегрега-

ции цитоплазмы в оплодотворенном яйце и ее распределении по бластомерам в ходе дробления. Как уже упоминалось, описанный ещё в 1888 году В. Ру серый серп яйцеклетки амфибий, представляющий собой узкий поверхностный участок ооплазмы, необходим для нормального развития. Г. Шпеман показал, что на двухклеточной стадии изолированный бластомер, не содержащий материала серого серпа дробится, но не способен к гастрюляции. Содержащий хотя бы половину материала серого серпа бластомер развивается нормально. Активность материала серого серпа определяет его кортикальный слой. Если пересадить только кортикальный слой серого серпа в другой участок того же зародыша, то образуется два серпа, два инициальных центра гастрюляции, а впоследствии - две нервные трубки. На основании этих свойств серого серпа Г. Шпеман назвал его **первичным организатором развития**.

Однако позднее экспериментально была показана возможность нормального развития после экстирпации (удаления) в амфибластуле презумптивной мезодермы и материала серого серпа. П. Ньюкуп (1969г.) удалил субэкваториальный пояс бластулы лягушки, включающий презумптивную мезодерму и материал серого серпа. Затем, соединив оставшиеся апикальную и базальную части, он добился их сращения и восстановления утраченного материала. Удаленный эмбриональный материал восстанавливался из материала презумптивной эктодермы под индукционным влиянием материала презумптивной энтодермы. Из этого эксперимента был сделан вывод о вторичности первичного организатора.

Огромное значение для любого морфогенеза, в том числе и для гастрюляции, имеет подвижность клеток, лежащая в основе процессов иммиграции клеточного материала при гастрюляции, в частности, у зародышей амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих.

В начале гастрюляции у морских ежей чрезвычайно активны клетки первичной мезенхимы. Они перемещаются от внутренней стенки зародыша в области бластопора в бластоцель и с помощью псевдоподий мигрируют к тому месту, где впоследствии сформируют скелет.

В составе энтодермы (первичной кишки) гастрюлы морского ежа активных в двигательном отношении клеток сравнительно немного. Выселяясь из энтодермы, они образуют вторичную мезенхиму. Если клетки первичной мезенхимы дают скелет личинки морского ежа, то материал вторичной мезенхимы образует дефинитивную мезодерму взрослого организма. Выделение вторичной мезенхимы из состава первичной кишки завершает процесс гастрюляции (у морских ежей). Двигательная активность клеток в процессе гастрюляции дополняется их избирательной адгезией. Так, клетки вторичной мезенхимы морских ежей прилипают к эктодерме и обособляются от энтодермы.

Таким образом, особенности процесса гастрюляции зависят от количества клеток в зародыше, их подвижности, характера межклеточных взаимодействий, избирательной адгезии, поляризации, способности образовывать пласты и пролиферативной активности клеток.

Образование мезодермы

После образования двухслойного зародыша у всех Metazoa, за исключением губок и кишечнополостных, наступает вторая фаза гастрюляции, в ходе которой происходит формирование среднего зародышевого листка - мезодермы. Клеточный материал мезодермы располагается между экто- и энтодермой, а, значит, в видоизмененном бластоцеле.

Мезодерма образуется либо независимо от первичных зародышевых листков, либо первоначально входит в состав одного из них и обособляется позже. У всех беспозвоночных животных, за исключением иглокожих, она образуется из двух или нескольких исходных крупных клеток – **мезотелобластов**, расположенных в бластоцеле в области губ бластопора (рис. 43, А). От мезотелобластов в результате серии делений отпочковываются более мелкие клетки, формирующие парные скопления мезодермального материала.

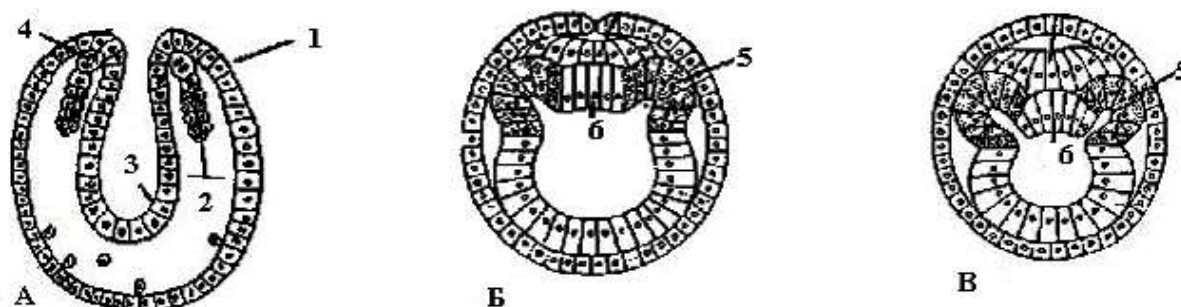


Рис. 43. Схема образования мезодермы у первичноротых (А) и вторичноротых (Б, В - последовательные стадии). 1 - эктодерма, 2 - мезенхима, 3 - энтодерма, 4 - мезотелобласт (А), 5 - целомическая мезодерма (Б, В - энтероцельный способ), 6 - нервная пластинка, 7 - хорда.

У ланцетника мезодерма вычленяется в бластоцель из крыши гастроцеля, из стенки первичного кишечника в виде двух карманообразных выростов, между которыми находится материал хорды (рис. 43, Б). Обособляясь от кишечника, выросты приобретают вид мешочков, полость которых преобразуется впоследствии во вторичную полость тела - так называемый **целом**. Стенки целомических мешков позднее могут сегментироваться.

У земноводных материал мезодермы и хорды образует спинную часть первичного кишечника или крышу гастроцеля, дно которого образовано энтодермальными клетками. В процессе гастрюляции энтодермальные клетки начинают подрастать под крышу гастроцеля, а клетки мезодермы врастают между эктодермой и энтодермой. Окончательное обособление мезодермы от энтодермального материала происходит у амфибий позже, на стадии нейруляции. У пресмыкающихся, птиц и млекопитающих в процессе гастрюляции мезодермальные клетки выселяются из **эпибласта** (первичной эктодермы) и мигрируют в полость между экто- и энтодермой через т. н. **первичную полосу**. Клетки презумптивной хорды инвагинируют у зародышей амниот в области гензеновского узелка.

Производные зародышевых листков

Образование зародышевых листков рассматривается как первый признак дифференцировки зародыша. Зародышевые листки различаются между собой не только взаиморасположением в теле зародыша, но также и рядом морфофункциональных особенностей. Так, согласно Г.А. Детлафу (1983г.), наружный слой эктодермы и хордомезодермы у зародышей бесхвостых амфибий составляет монослой эпителиальных клеток, объединенных плотными контактами. Внутренний слой эктодермы не имеет эпителиоидной структуры и образован большим числом взаимопроникающих, рыхло расположенных, связанных друг с другом отростками клеток. Между этими слоями в процессе эпиболии, как было установлено методами прижизненной маркировки, нет обмена клетками.

Наружный монослой клеток презумптивной эктодермы, когда он подстилается мезенхимными клетками, образует правильный однослойный эпителий. В составе зачатка нервной системы клетки наружного слоя эктодермы превращаются в эпендимные клетки.

Внутренний слой первичной эктодермы включает области эпидермиса, нервной пластинки, хордомезодермы. В окружении мезенхимы клетки внутреннего слоя дифференцируются в структуры хорды и мозга.

В норме, взаимодействуя между собой и с факторами внешней среды, зародышевые пласты дифференцируются в определенном направлении и дают в ходе органогенеза зачатки строго определенных органов.

Производные эктодермы выполняют в основном покровную и чувствительную функции. Из эктодермы образуется: покровный эпителий, кожные железы, производные эпидермиса (чешуи, перья, пух, волосы, когти, ногти, копыта, рога и т.п.), эмаль зубов, роговица глаза, передняя кишка (stomodeum), задняя кишка (proctodeum) и вся нервная система.

Производные мезодермы обеспечивают связи между частями зародыша, двигательную, опорную и трофическую функции. Среди них можно перечислить все мышечные ткани, все виды соединительных тканей, включая хрящ и кость, органы кровеносной и лимфатической систем, каналы выделительных органов, часть тканей гонад, перитонеум полости тела, основные структуры органов дыхания, стенки пищеварительной трубки (за исключением выстилки) и т.д. Разнообразные ткани образуются из эмбриональной соединительной ткани - **мезенхимы**, являющейся частью мезодермы (Рис 44). Производные энтодермы связаны с функциями питания и дыхания. Они представлены эпителием средней кишки и ее пищеварительными железами, эпителием дыхательной системы (жаберного отдела и легких).

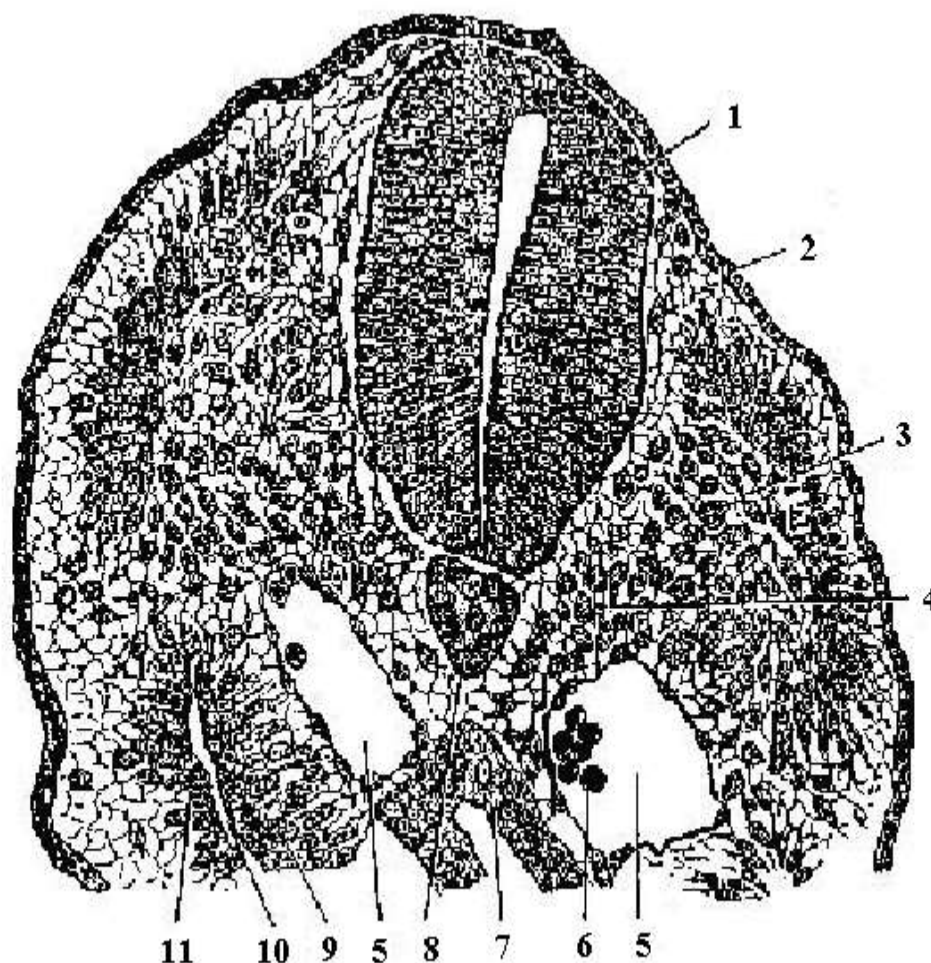


Рис. 44. Мезенхима у зародышей морской свинки в стадии 12 сомитов (по А.А. Максиму). 1 - нервная трубка, 2 - эктодерма, 3 - сомит, 4 - мезенхима, образовавшаяся из медиальной части сомита, 5 - аорта, 6 - кровяные клетки, 7 - стенка кишки, 8 - хорда, 9,11 - висцеральный и париетальный листки мезодермы, 10 - целомическая полость.

Вопросы для самоконтроля:

1. Гастрюляция как этап онтогенеза по формированию многослойного зародыша.
2. Различные способы гастрюляции.
3. Особенности строения гаструл у хордовых.
4. Значение исследований К.М. Бэра, А.И. Ковалевского и И.И. Мечникова в создании теории зародышевых листков.
5. Теория зародышевых листков и ее современное состояние.
6. Образование двух- и трехслойного зародыша: эктодерма, энтодерма, мезодерма.
7. Способы образования мезодермы (телобластический, энтероцельный).
8. Производные зародышевых листков.
9. Опыты маркировки. Карты презумптивных зачатков на стадии ранней гастрюлы.
10. Морфогенетические движения (инвагинация, эпиболия, иммиграция, деляминация).
11. Механизмы морфогенетических движений клеток (явления слипания и отталкивания клеток, неравномерность клеточных делений, направленные движения клеток).

ГЛАВА ОДИННАДЦАТАЯ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССА ГАСТРУЛЯЦИИ У НЕКОТОРЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ

Стереоморфология расположения презумитивных зачатков органов перед гастрულიей у рыб. Источники развития зародышевого щитка и его значение. Роль зародышевого узелка у рыб. Гастрულიия у амфибий, классификация типов морфогенетических движений. Особенности гастрულიии у птиц. Первичная полоска, первичная бороздка с гензеновским узелком. Особенности гастрულიии у плацентарных млекопитающих. Дифференциация зародыша на эмбриобласт и трофобласт. Дифференциация зародышевых листков.

Гастрულიия у костных рыб. Стадия бластулы относительно короткая, но не означает какой-то паузы в развитии. Напротив, на этой стадии в зародыше идут активные морфогенетические движения и продолжается процесс дробления. Внесший особенно большой вклад в изучение развития костных рыб д-р Баллард (США) особо подчеркивает трехмерность расположения презумитивных зачатков органов перед началом гастрულიии в бластодиске костных рыб: под материалом будущей мезодермы, который расположен по всему бластодиску лежит материал хорды, а еще глубже - материал энтодермы. Над презумптивной мезодермой находится материал нервной системы (рис. 45). А над всеми областями лежит клеточная оболочка - паренхима, состоящая из одного слоя очень плотно соединенных клеток полигональной формы.

Гастрულიия у костных рыб начинается с обрастания желтка перибластом и бластодермой по типу эпиболии. Ведущую роль в этом процессе играет синцитий перибласта, который распространяется по поверхности желтка к вегетативному полюсу. Бластодерма, с небольшим отставанием, следует за перибластом. В конце обрастания на поверхности зародыша сохраняется лишь небольшой круглый участок желтка у вегетативного полюса - **желточная пробка**, но и она закрывается стягивающимся кольцом бластодермы.

В связи с вышеуказанной ярусной разнокачественностью бластодиска в ходе гастрულიии бластомеры различных слоев участвуют в разных морфогенетических перемещениях. Когда эпиболия только начинается, внутренние, рыхло расположенные бластомеры, активно передвигаясь в контакте с перибластом, достигают края бластодермы, где образуют зародышевое кольцо. Одновременно часть внутренних бластомеров скапливается в одном из квадрантов бластодиска, образуя здесь различимый снаружи зародышевый щиток, из которого впоследствии формируется собственно зародыш.

На переднем краю зародышевого щитка, в плоскости билатеральной симметрии зародыша, образуется скопление клеток. Этот участок соответствует будущему головному концу зародыша. П.П. Иванов предложил называть данный участок зародышевым узелком. Зародышевый узелок остается неподвижным относительно других участков яйца, и от него в заднем направлении, к вегетативному полюсу идет формирование осевых органов зародыша: хорды, го-

ловного и спинного мозга. Материал для образования этих органов поступает из участков все утончающегося зародышевого кольца, расположенных по сторонам от эмбриональной оси.

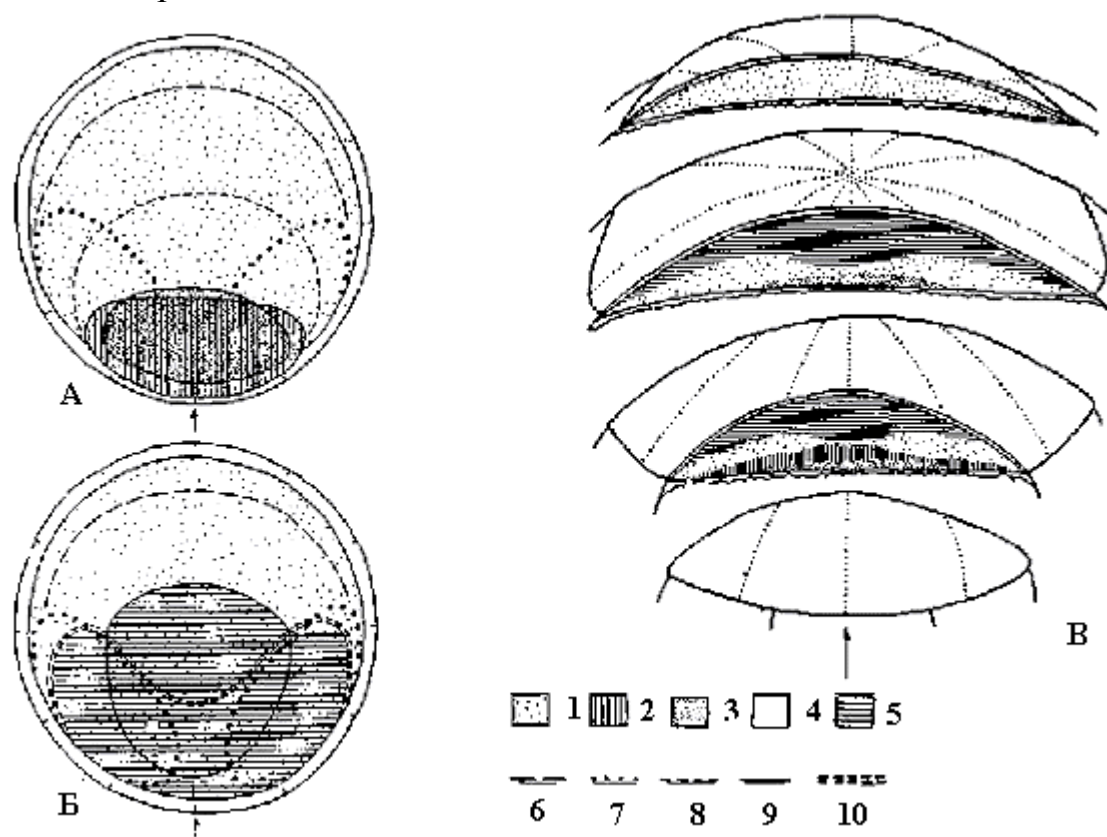


Рис. 45. Карта расположения презумптивных зачатков органов на стадии ранней гастрюлы (перед появлением или непосредственно после появления краевого узелка) в бластодиске радужной форели (по Ballard, 1973). А - вид снизу, Б - вид сверху, В - карта расположения презумптивных зачатков на серии поперечных разрезов через бластодиск той же стадии развития радужной форели. Стрелки - ось симметрии. 1 - презумптивная мезодерма, 2 - презумптивная хорда, 3 - презумптивная энтодерма, 4 - поверхностная клеточная оболочка, или перидерма (на позициях А, Б - по краю бластодиска), 5 - презумптивная нервная система, 6-8 передние границы материала: 6 - сомитов задней части тела, 7 - сомитов передней части тела, 8 - мезодермы головы, 9,10 - границы материала: 9 - переднего и среднего мозга, 10 - заднего мозга.

Центральная нервная система у костных рыб образуется своеобразно: нервная трубка формируется не сворачиванием нервной пластинки, а в результате образования полости в плотном клеточном тяже.

Баллард (1973г., 1982г.) показал, что у костистых рыб движения клеток в период гастрюляции к месту их окончательного расположения заключаются в эпиболии и конвергенции. Поверхностный слой зародышевого щитка участвует лишь в эпиболических движениях и в дальнейшем формирует покровы. Внутренние бластомеры вначале перемещаются радиально, но затем начинают конвергировать к заднему полюсу и к медиальной линии, где закладываются будущие осевые органы зародыша. Обособление зачатков осевых органов происходит путем деламинации.

Гастрюляция у амфибий - представляет собой сложный комплекс мор-

фогенетических движений, включающий элементы, в первую очередь, эпиболии, инвагинации, а также иммиграции и деламинации.

Показано, что судьба клеток бластулы шпорцевой лягушки определяется тем, в каких - в глубоких или в поверхностных слоях зародыша они находятся. Клетки поверхностных слоев дают мезодерму, а более наружные слои формируют эктодерму и энтодерму.

Среди основных факторов, определяющих морфологический характер гастрюляции, можно выделить следующие два:

1) смещение хорошо выраженной внутренней полости (бластоцеля) к анимальному полюсу, где находятся мелкие, активные в морфогенетическом и митотическом плане бластомеры; 2) преобладание в вегетативном полушарии крупных, заполненных желтком, относительно пассивных макромеров.

У зародышей лягушки гастрюляция начинается на будущей спинной стороне зародыша, чуть ниже экватора в области серого серпа. Первый внешний признак гастрюляции - появление слегка изогнутой бороздки - бластопора, возникающей из-за погружения внутрь субэкваториальной области зародыша некоторых богатых желтком наружных макромеров. Образование бороздки связано с тем, что часть клеток серого серпа в области будущего бластопора сильно вытягиваются внутрь, увлекая за собой все новые клетки с поверхностного слоя бластулы, что и приводит к образованию бороздки. Верхний край бороздки называется спинной или дорсальной губой бластопора.

Процесс инвагинации идет особенно активно в области дорсальной губы бластопора. При этом края бластопора растягиваются и заворачиваются внутрь, принимая колбовидную форму. Оставшуюся снаружи и заполняющую бластопор массу желтка, называют желточной пробкой. Как и у рыб, в ходе гастрюляции зародыша амфибий бластопор постепенно уменьшается и, смыкаясь, принимает вид вытянутой в анимально-вегетативном направлении полоски.

В процессе гастрюляции наибольшее значение имеет перемещение поверхностных клеток к бластопору и их вворачивание через его края внутрь, где клетки продолжают двигаться и делиться. Связанная с бластопором и выстланная этими клетками полость называется архентероном - первичной кишкой.

Клетки анимального полушария наиболее активно размножаются и это способствует эпиболии. Перемещаясь к бластопору они подворачиваются через его дорсальную губу и инвагинируют внутрь, продолжая движение под слоем поверхностных клеток к анимальному полюсу (рис. 42). В результате этих активных морфогенетических перемещений клеточных пластов дорсальная губа бластопора как бы подтягивается кверху, в направлении анимального полюса. Первыми инвагинируют эндодермальные клетки, которые позже войдут в состав передней кишки. Затем инвагинируют клетки презумптивной головной мезодермы. Следом вворачивается через дорсальную губу клеточный материал **хордомезодермы**, т.к. из него впоследствии образуется хорда и мезодерма.

Крупные, богатые желтком клетки, расположенные вокруг вентральной губы бластопора также инвагинируют внутрь зародыша, но здесь этот процесс выражен несравненно слабее, чем в области дорсальной губы. Совокупность этих клеток называют **перспективной энтодермой**, так как впоследствии она

образует эпителиальную выстилку гастроцеля (первичной кишки).

Перспективная латеральная мезодерма вначале располагается вентрально, на довольно большом расстоянии от губ бластопора. В процессе перемещения будущей энтодермы по наружной поверхности к бластопору и вворачивания её внутрь, перспективная мезодерма следует за ней и также инвагинирует внутрь (рис. 42). Внутри они перемещаются вперед, располагаясь между энтодермой и самым наружным клеточным слоем зародыша. В конечном счете, передние края мезодермы с обеих сторон зародыша встречаются по медиальной линии вентральной стороны. Впоследствии из этого участка мезодермы образуется сердце.

Самый наружный слой клеток зародыша амфибий на первых этапах гастрюляции включает клеточный материал всех трех будущих зародышевых листков. После того, как из наружного слоя зародыша в процессе гастрюляции выселяются внутрь клетки презумптивной хорды, энтодермы и мезодермы, его можно называть эктодермой. Во время гастрюляции презумптивная эктодерма претерпевает ряд изменений. Часть её, в результате индуцирующего воздействия хордомезодермы, превращается в нервную пластинку, а затем в ЦНС. Из остальной эктодермы формируется эпидермальная часть кожи (эпидермис), а также специализированные производные кожи (когти, железы и т.п.), поэтому она получила название общей кожной эктодермы. К концу гастрюляции вся наружная поверхность зародыша покрыта нейтральной и общей кожной эктодермой.

Втянувшийся внутрь зародыша через бластопор клеточный материал стенки первичной кишки перемещается пластом по внутренней поверхности стенки гастроцеля, вытесняя бластоцель в вентральном направлении, вплоть до его полной утраты. Если на поверхности зародыша на стадии гастрюляции доминируют процессы эпиболлии, то среди морфогенетических движений внутри зародыша, наиболее отчетливо выражена инвагинация. Первоначально инвагинация клеток идет через узкую щель бластопора и бластомеры втягиваются внутрь продвигаясь через плотное клеточное скопление. При этом имеют место элементы иммиграции клеток. Во второй фазе инвагинации происходит быстрое перемещение клеточного материала по внутренней поверхности стенки гастроцеля.

Обширные морфогенетические движения в процессе гастрюляции составляют лишь часть событий, совершающихся на этом этапе. В результате активных перемещений тканей, ранее удаленные друг от друга участки зародыша вступают в индукционные взаимодействия. В частности, как показал Г.Шпеман, клетки дорсальной губы бластопора обладают способностью в значительной мере “организовывать” дальнейшее развитие зародыша.

Гастрюляция у птиц. У зародышей птиц дробление приводит к образованию бластодиска, лежащего на огромной и пассивной в морфогенетическом отношении массе желтка. Как уже указывалось, дискобластула у птиц имеет двухслойную структуру и состоит из верхнего слоя – **эпибласта** и нижнего слоя – **первичного гипобласта**. Между ними располагается узкая полость – бластоцель. Собственно зародыш занимает приподнятый над желтком прозрач-

ный центральный участок бластодермы дискобластулы – *area pellicula* (светлое поле). Последняя окружена периферическим кольцом бластодермы, плотно прилежащим к желтку и переходящим в него – *area opaca* (темное поле). Границей между *area pellicula* и *area opaca* является уже известное нам зародышевое кольцо (зародышевый валик). От заднего (по отношению к ориентации будущего зародыша) сектора зародышевого кольца к центру *area pellicula* протягивается круглая область многослойной бластодермы – **зародышевый щиток**.

Далее на заднем конце зародыша образуется узкая серповидная масса клеток – серп Коллера. От него вперед распространяется второе поколение клеток гипобласта, которое совместно с первичным гипобластом образует **вторичный гипобласт**. Считается, что ни первичный, ни вторичный гипобласт не принимают участия в развитии зародышевых листков. Вместе с тем, в первичном гипобласте возникают первичные половые клетки, а вторичный гипобласт участвует в формировании внезародышевой энтодермы, главным образом желточного стебелька.

Образование первичного и вторичного гипобласта можно рассматривать как явление, предшествующее гастрюляции. Собственно гастрюляция начинается с появления скопления клеток в задней части эпибласта куриного зародыша на 3-4 часы инкубации (рис. 46). Затем это скопление постепенно вытягивается в краниальном и каудальном направлениях и к концу первых 12-ти часов инкубации утолщенная область приобретает специфическую форму, из-за которой она получила название **первичной полоски**.

Появление первичной полоски является результатом индукционного взаимодействия между эпибластом и гипобластическим слоем, а ее ориентация отражает полярность гипобласта. Наличие полярности убедительно продемонстрировал Уоддингтон. Изменив положение гипобласта по отношению к эпибласту, он наблюдал изменение ориентации первичной полоски. Образование первичной полоски связано с активными морфогенетическими движениями клеток эпибласта, конвергирующими из боковых участков к медиальной линии бластодиска. Первоначально перемещение клеток наблюдается на большей части задней области бластодермы, где они стягиваются с боков к формирующейся

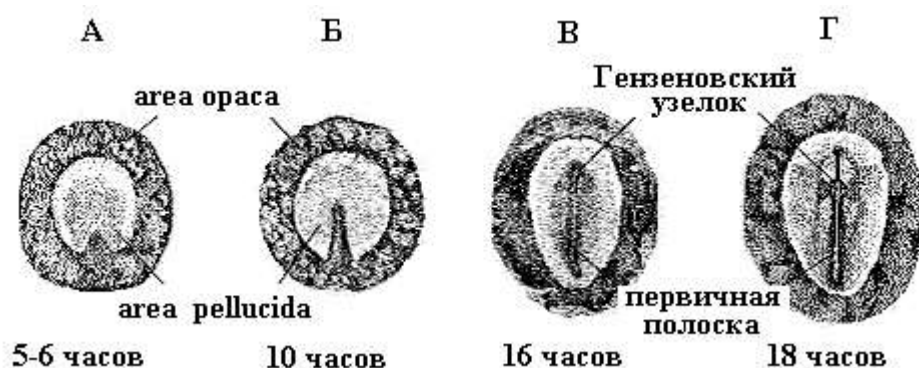


Рис. 46. Четыре стадии образования первичной полоски у куриных зародышей (по фотографиям Спратта). А - после 5-6ч. инкубации. Б - после 10ч. инкубации. В - после 16ч. ин-

кубации. Г - после 18ч. инкубации

первичной полоске. Постепенно за счет вхождения в состав полоски все большего числа клеток, она все более утолщается и вытягивается по направлению к головному концу (рис.45), достигая 60-75% общей длины светлого поля. Вытягивание первичной полоски в головном направлении происходит одновременно с разрастанием лежащего под ней вторичного гипобласта. Несколько смещаясь в каудальном направлении, первичная полоска заходит в ареа ораса.

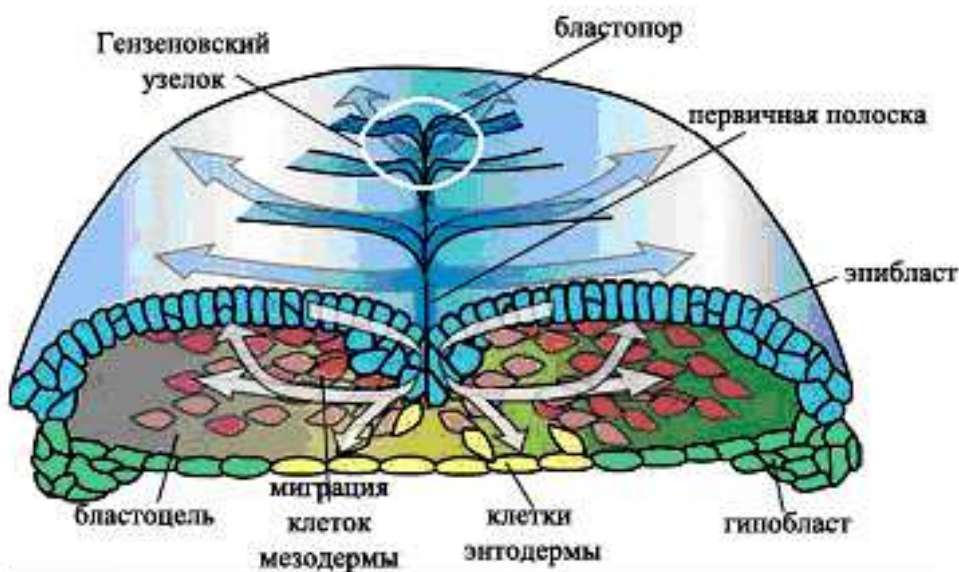
После инкубации куриного яйца в течение 16 часов первичная полоска становится настолько хорошо выраженной, что данную стадию развития зародыша называют **стадией первичной полоски**.

На переднем конце первичной полоски формируется особенно плотное клеточное сгущение - **гензеновский узелок**. В центре его находится углубление, через которое клетки могут проходить в бластоцель. Гензеновский узелок является функциональным эквивалентом спинной губы бластопора амфибий.

После того, как первичная полоска достигает своей полной длины, что у куриного зародыша соответствует 18-му часу инкубации, ее головной конец за счет продолжающегося движения клеток начинает рассасываться, оставляя после себя структуру, обычно называемую **головным отростком**.

Клеточный состав первичной полоски непрерывно обновляется за счет того, что к ней с обеих сторон по касательной спереди и сбоку мигрируют все новые и новые клетки эпибласта. В этом отношении первичная полоска соответствует сомкнутым губам бластопора у зародышей амфибий, куда активно перемещаются поверхностные слои клеток, а затем, подворачиваясь через губы бластопора, уходят внутрь, формируя впоследствии хордомезодермальный материал и эндодерму. Клетки эпибласта зародыша птиц также не задерживаются в первичной полоске, а мигрируют через нее вглубь, в пространство между эпибластом и гипобластом (рис. 47), формируя в дальнейшем эндодерму и хордомезодерму. Проходя через первичную полоску, клетки эпибласта утрачивают связи между собой, диссоциируют и расползаются по внутренней поверхности эпибласта.

Особенно активное вытягивание клеток эпибласта внутрь происходит



направления морфогенетических движений клеток.

Рис. 47. Схема объемной модели раннего куриного зародыша. Стрелками показаны

на переднем конце первичной полосы и вдоль ее средней линии. Вследствие этого происходит как бы проседание данных участков, и на месте гензеновского узелка образуется **первичная ямка**, а вдоль первичной полосы возникает небольшой желобок - **первичная бороздка**. Края бороздки постепенно утолщаются, формируя **первичные валики**.

Часть *area pellucida*, примыкающая к первичной полоске, начинает утолщаться и образует **зародышевую область**, или **зародышевый щиток**. Вытягивание первичной полосы сопровождается соответствующим изменением формы *area pellucida*, которая также удлиняется и из округлой становится грушевидной. Ориентация осевых органов будущего зародыша соответствует расположению первичной полосы.

Миграция клеток эпибласта после подворачивания зависит от того, через какой участок первичной полосы они проходят вглубь зародыша. Клеточный материал, проходящий через переднюю часть первичной бороздки и первичную ямку, перемещается затем преимущественно вперед от первичной ямки. Первыми через переднюю часть первичной полосы проходят клетки будущей зародышевой энтодермы. Через 8-10 часов инкубации более 80% этих клеток обнаруживаются в энтодерме. Оставшиеся клетки мигрируют в средний, мезодермальный листок. В дальнейшем все больший процент клеток, проходящих через гензеновский узелок, включается в мезодерму и все меньший - в энтодерму. Образующиеся энтодермальные клетки включаются в первичный гипобласт и смещают клетки гипобласта кнаружи и к головному концу, к краям *area* *opaca*. Основная масса будущего энтодермального материала проходит через область узелка во время ранних формообразовательных стадий развития первичной полосы. Примерно к 22-24 часам инкубации, когда начинается регрессия первичной полосы, почти все клетки презумптивной энтодермы выселяются из эпибласта.

Материал презумптивной мезодермы начинает мигрировать позднее, лишь примерно на 15-м часу инкубации, когда становится отчетливо различима первичная бороздка. В курином зародыше на ранних стадиях развития имеются две основные области инвагинации и образования мезодермы. Вначале через первичную ямку и переднюю часть первичной бороздки переходит клеточный материал, который перемещается между эпибластом и зародышевой энтодермой к головному концу. Его центральная часть дает начало головной мезодерме и медиальное палочковидное скопление в виде отростка, занимающее место регрессирующей первичной полосы. Впоследствии мезодермальный головной отросток превращается в хорду, которая по мере регрессии первичной полосы и гензеновского узелка, постепенно удлиняется (рис. 48). Оба процесса идут в направлении хвостового конца зародыша. В конечном счете гензеновский узелок оказывается на заднем конце зародыша. При сравнении гастрюляции у птиц и амфибий, гензеновский узелок, через который идет наиболее активное перемещение клеток, обычно сравнивают с дорсальной губой зародыша амфибий. Более латеральные области описываемого клеточного материала дают начало

мезодерме будущих сомитов (рис. 48).

Вторая, более обширная инвагинация клеток презумптивной мезодермы проходит вдоль первичной полоски, через ее центральные части. Подворачивающийся материал разрастается параллельно лежащему под ним слою эндодермы и дает мезодерму боковой пластинки. Через каудальный участок первичной полоски инвагинирует материал внезародышевой мезодермы, который затем разрастается в стороны до края обрастания.

Мигрирующие клетки продвигаются, вытягивая и сокращая филоподии. В этой миграции важную роль играют внеклеточные сложные полисахариды и, прежде всего, гиалуриновая кислота, продуцируемая в бластоцель эктодермальными клетками. Благодаря своей способности сильно разбухать в воде, гиалуриновая кислота поддерживает мезенхимные клетки во время миграции в диспергированном состоянии.

Направление миграции мезенхимных клеток коррелирует с присутствием фибронектиновой сети во внеклеточной базальной мембране клеток эпибласта.

Клетки - предшественники эктодермы движутся снаружи, обрастая желток. Эти клетки соединены между собой плотными контактами и перемещаются, как единое целое.

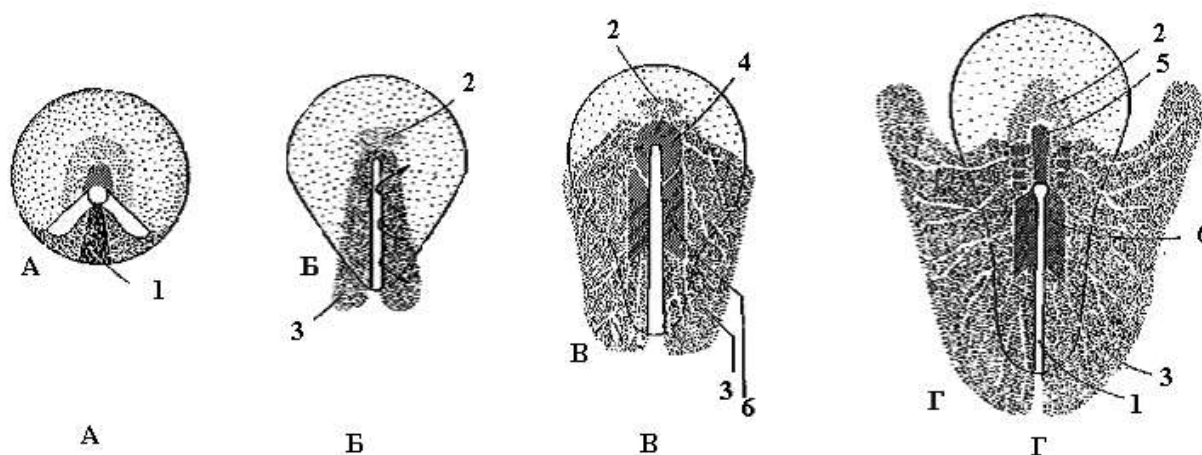


Рис. 48. Последовательные стадии образования мезодермального листка у куриного зародыша. 1 - первичная полоска, 2 - прехордальная мезодерма, 3 - будущая латеральная мезодерма, 4 - будущая хорда, 5 - хорда, 6 - сомиты.

Одновременно идет развитие внезародышевых частей гипобласта и эпибласта, которые обрастают желток, формируя желточный мешок. Как и в собственно зародышевой части, в щелевидную полость между гипобластом и эпибластом мигрируют мезенхимоподобные клетки внезародышевой мезодермы. Позднее они обрастают кровяные островки, а затем заполненные кровью кровеносные сосуды внезародышевой системы кровообращения. Последняя обеспечивает ряд жизненно важных функций развивающегося зародыша: газообмен, транспорт питательных веществ желтка, удаление продуктов обмена.

Гастрюляция у плацентарных млекопитающих. В развитии млекопитающих, как и у всех позвоночных, процессы собственно гастрюляции, т.е. обособления первичных зародышевых листков, очень тесно переплетены с дру-

гими эмбриологическими процессами. Гастрюляция у млекопитающих во многом сходна с гастрюляцией у рептилий и птиц, несмотря на то, что яйца плацентарных млекопитающих содержат мало желтка и претерпевают полное дробление. Обычно это объясняют феноменом рекапитуляции рептильного происхождения млекопитающих.

Ни у проходных, ни у сумчатых млекопитающих процессы, происходящие в фазе гастрюляции в зародышевом щитке, детально не изучены. У плацентарных млекопитающих, как уже говорилось, стадия дробления завершается образованием пузыревидной бластоцисты, состоящей из **эмбриобласта** и **трофобласта** (рис. 38). Различают участок полярного трофобласта, покрывающего клетки зародышевого узелка, и внезародышевый трофобласт. В дальнейшем внезародышевый трофобласт дифференцируется на наружный синцитиальный и внутренний клеточный слои. Лизируя и переваривая материнские ткани, этот отдел трофобласта обеспечивает внедрение бластоцисты в слизистую оболочку матки. Полярный трофобласт у некоторых млекопитающих сохраняется над зародышевым узелком, полностью отделяясь от последнего (ежи, летучие мыши, многие грызуны, приматы). У тупайи, оленей, свиньи и овцы полярный трофобласт над зародышевым узелком разрушается и последний как бы "оголяется", оставаясь соединенным с внезародышевым трофобластом лишь по периферии. В некоторых случаях полярный трофобласт дегенерирует, и длительное время сохраняется лишь в виде слоя плоских клеток - **рауберова слоя** (некоторые насекомоядные и грызуны).

Вслед за образованием трофобласта происходит и обособление первичной энтодермы. Большинство авторов считает, что это происходит путем деления из внутренней клеточной массы тонкого слоя клеток - **гипобласта**. Его считают эквивалентом гипобласта куриного зародыша, из него образуется только внезародышевая энтодерма, а еще точнее - выстилка будущего желточного мешка.

После выделения первичной энтодермы оставшиеся клетки эмбриобласта организуют более упорядоченную уплощенную структуру и получают название **зародышевого щитка** или диска. Его нижний или внутренний слой - это первичная энтодерма, а наружный слой - эпибласт, в состав которого входит клеточный материал будущей эктодермы, мезодермы и вторичной энтодермы. Ярко выраженных органообразующих областей, подобных тем, которые описаны в развитии амфибий, у млекопитающих, вероятно, нет (Snow, 1977г.).

Образование первичной полоски у зародышей млекопитающих очень сходно с образованием её у зародышей птиц и сопровождается морфогенетическими перемещениями клеточных масс, как и у зауропсид. Вначале происходит сгущение клеток и формируется утолщение в хвостовом конце зародыша. Постепенно это утолщение, имеющее первоначально серповидную форму начинает распространяться вперед. Одновременно задняя часть зародышевого щитка сжимается с боков и вытягивается назад. Сочетание указанных морфологических изменений приводит к образованию вдоль длинной оси зародыша утолщения - **первичной полоски** (рис. 49, 50). Когда полоска достигает своей максимальной длины, на её переднем конце образуется узелок Гензена.

Морфогенетические движения клеток в области первичной полоски у зародышей млекопитающих исследованы в гораздо меньшей степени, чем у амфибий и птиц. Но определенно известно, что именно через полоску, особенно в области гензеновского узелка, идет массовая миграция клеток в промежуток между наружным слоем - эпибластом и первичной энтодермой. За счет этого клеточного материала формируются осевые органы зародыша: хорда и сомиты. Часть выселяющихся клеток образуют крышу первичной кишки (архентерона). Клетки как зародышевой, так и внезародышевой мезодермы проходят через заднюю часть первичной полоски. При этом большая часть ранней мезодермы выходит за пределы зародышевого щитка и становится внезародышевой мезодермой. Позднее в результате миграции клеток эпибласта в направлении первичной полоски возникает зародышевая мезодерма. Подворачиваясь через первичную полоску эти клетки перемещаются затем в латеральных направлениях под эпибластом (рис. 50). По мере формирования закладок осевых органов первичная полоска сокращается, начиная от переднего конца в каудальном направлении.

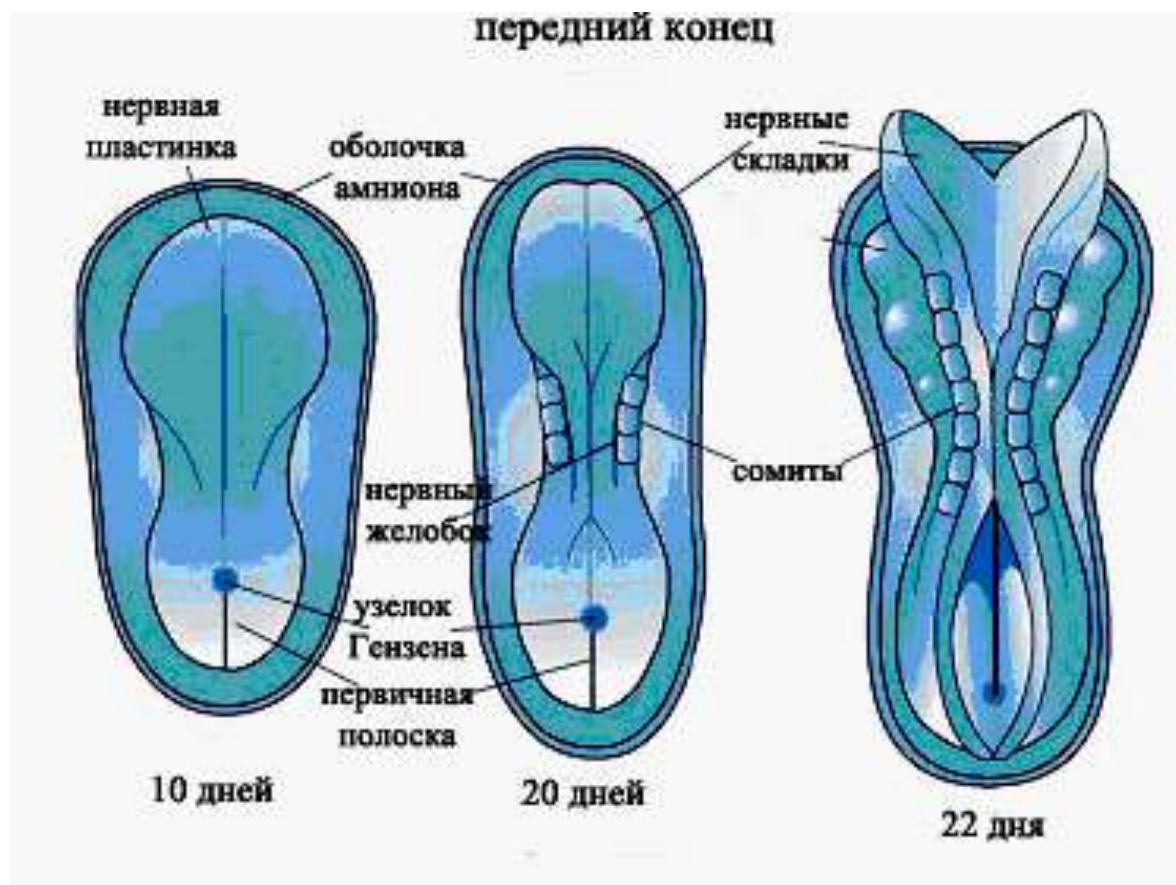


Рис. 49. Схематическое изображение человеческих эмбрионов (вид с дорсальной стороны) с 10-го по 22 –е сутки развития. Гастрюляция продолжается, но первичная полоска в заднем конце еще сохраняется. Идет смыкание нервных валиков и формирование сомитов.

Таким образом, в развитии млекопитающих гастрюляционные процессы заключаются в последовательном обособлении двух зачатков энтодермы: первичной (внезародышевой) и вторичной (зародышевой). Первичная энтодерма обособляется делением или иммиграцией клеток зародышевого узелка и,

возможно, из слоя трофобласта. Вторичная энтодерма образуется путем высе- ления клеток из первичной полоски. Предполагается, что клетки энтодермы детерминированы уже на стадии ранней бластоцисты (Gardner, Papanicolaou, 1975г.). Однако чрезвычайно раннее появление энтодермальных клеток в эм- бриогенезе сумчатых позволяет сделать предположение о детерминации этих клеток еще на стадии дробления.

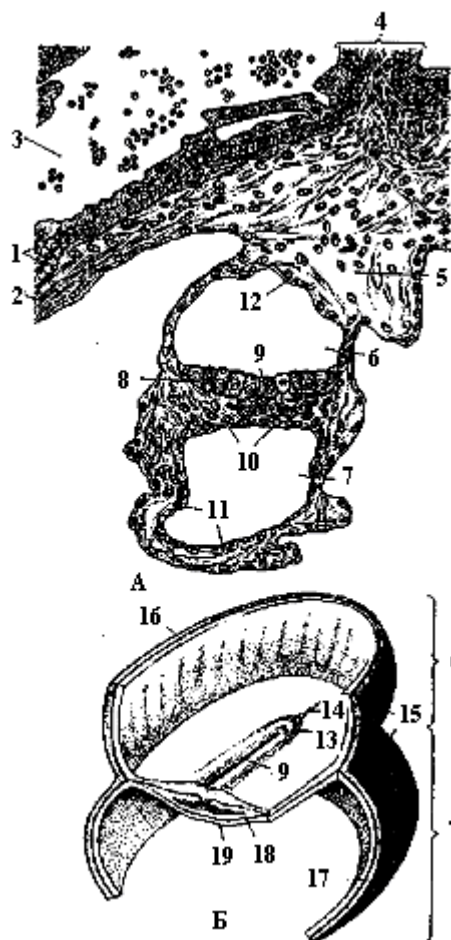
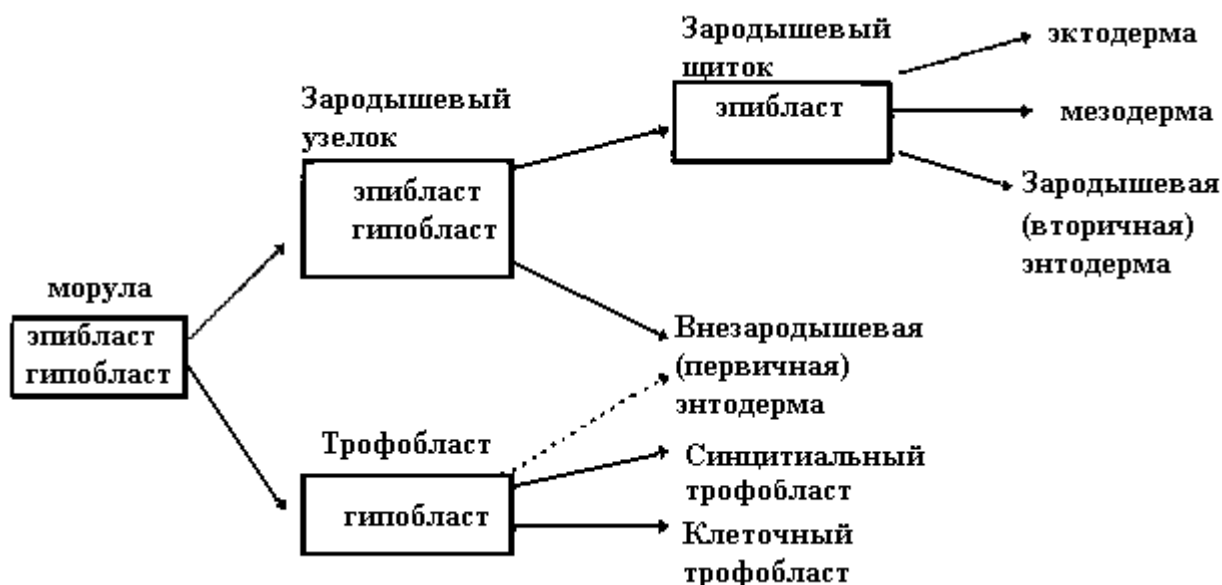


Рис. 50. Схема строения двух- недельного зародыша человека. Вто- рая стадия гаструляции. А - попе- речный срез зародыша, Б - зародышевый щиток. Вид со стороны амниотическо- го пузырька. 1 - хориальный эпителий, 2 - мезенхима хориона, 3 - лакуны, заполненные материнской кровью, 4 - основание вторичной ворсины, 5 - ам- ниотическая ножка, 6 - амниотический пузырёк, 7 - желточный пузырёк, 8 - зародышевый щиток в процессе га- струляции, 9 - первичная полоска, 10 - зачаток кишечной энтодермы, 11 - желточный эпителий, 12 - эпителий амниотической оболочки, 13 - первич- ный узелок, 14 - прехордальный отро- сток, 15 - внезародышевая мезодерма, 16 - внезародышевая эктодерма, 17 - внезародышевая энтодерма, 18 - зародышевая эктодерма, 19 - зародышевая энтодерма.

Спорным остается вопрос о природе трофобласта. В большинстве совре- менных руководств трофобласт рассматривается, как производное эктодермы. Эта точка зрения впервые была высказана Губрехтом (Hubrecht, 1909г.) на ос- новании факта поверхностного расположения трофобласта. Однако существуют данные, указывающие на образование трофобласта за счет бластомеров вегета- тивной части яйца млекопитающих, т.е. тех бластомеров, которые у всех позво- ночных дают начало энтодерме. Отсюда возникло предположение об энто- дермальной природе трофобласта (Ю.С. Бочаров, 1988г.). Более того, тро- фобласт млекопитающих можно рассматривать, как гомолог перибласта зауро- псид, с которым его сближают топографическое положение в бластоцисте от- носительно зародышевого узелка, склонность к формированию синцития и раннее начало функционирования как органа, обеспечивающего питание зародыша на самых ранних стадиях эмбриогенеза.

Дифференциацию зародышевых листков и их преемственность с морфологическими структурами раннего зародыша млекопитающих можно представить следующей схемой (по Ю.С. Бочарову, 1988 г.):



Резюмируя вышесказанное необходимо подчеркнуть, что у всех позвоночных процесс гаструляции носит двойственный характер: в течение этой стадии происходят процессы собственно гаструляции — образования многослойного зародыша, формирования первичной кишки - и почти одновременно происходит образование осевых органов: нервной трубки, хорды, сомитов. Что касается механизма образования гаструлы, т.е. двуслойного зародыша, то у форм с полным дроблением он включает два основных процесса: эпиболию и инвагинацию, характеризующихся перемещением клеточных пластов на фоне сохранения целостности, что обусловлено прочным соединением (адгезией) клеток друг с другом.

Напротив, у позвоночных с частичным дроблением наряду с эпиболией ведущее значение в механизме гаструляции приобретают интенсивные процессы самостоятельной миграции обособленных клеток.

Вопросы для самоконтроля:

1. Особенности гаструляции у костных рыб.
2. Понятие о зародышевом узелке, его роль в морфогенезе, типы морфогенетических движений у костных рыб.
3. Особенности гаструляции у амфибий.
4. Специфика морфогенетических движений в зародышах амфибий.
5. Роль бластопора в морфогенетических гаструляционных перемещениях зародышевого материала у амфибий.
6. Особенности гаструляции у птиц. Строение дискобластулы. Образование первичного и вторичного гипобласта и формирование первичной полосы с гензеновским узелком.
7. Механизмы миграции клеток при гаструляции у птиц.

8. Особенности гастрюляции у плацентарных млекопитающих.
9. Дифференциация зародышевых листков у млекопитающих.

ГЛАВА ДВЕНАДЦАТАЯ

НЕЙРУЛЯЦИЯ И ОБРАЗОВАНИЕ СОМИТОВ. ПОНЯТИЕ О ДЕТЕРМИНАЦИИ И ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ИНДУКЦИИ

Нейруляция. Образование нервной трубки и детерминация ее отделов. Нервный гребень, его происхождение, миграции и дифференцировки клеток. Расчленение хордо-мезодермального зачатка (хорда, ооцит, сомитная ножка, боковая пластинка, парие-тальный и висцеральный листки и образование вторичной полости тела); градиентные соотношения в пределах хордо-мезодермального зачатка. Особенности процессов нейруляции при голобластическом и меробластическом типах развития.

Морфологически наиболее важным результатом гастрюляции представляется то, что зародыш становится многослойным, дифференцируется на три зародышевых листка. Но для последующего развития не меньшее значение имеет тот факт, что сближаются различные группы клеток, обладающие определенным перспективным значением, которые в бластуле располагались далеко друг от друга. Дальнейшее развитие зародыша зависит от индукционных взаимодействий между некоторыми из этих групп клеток.

Примером одного из первых и важнейших индукционных воздействий является индукционное влияние материала хордомезодермы или хорды на лежащую над ней эктодерму. В результате этой, так называемой **первичной эмбриональной индукции**, плоский слой неспециализированных эктодермальных клеток превращается в зачаток центральной нервной системы - нервную пластинку, которая затем, изгибаясь, трансформируется в продольный желобок, а в конечном итоге - в полую нервную трубку. Отсюда название данной стадии развития - **нейруляция**. Первичная эмбриональная индукция была открыта немецким эмбриологом Г.Шпеманом и его ученицей Г.Мангольд в 1921 году.

В эктодерме образуются клетки трех типов: 1) клетки нервной трубки, 2) клетки эпидермиса кожи, 3) клетки нервного гребня. Однако содержание этой стадии, следующей за этапом гастрюляции, не исчерпывается образованием нервной трубки, одновременно формируются осевые органы позвоночных: хорда, мезодермальные сомиты, первичная кишка превращается во вторичную. Зародыш на данной стадии развития называется **нейрулой**.

Эктодермальные клетки, расположенные на границе между нейральной и общей покровной эктодермой образуют парные сегментированные агрегации, дающие впоследствии **нервный гребень**. Будучи слабо связанными между собой и, обладая исключительной подвижностью, клетки нервного гребня прodelывают обширные и разнообразные миграции по всему организму зародыша и дифференцируются в различных направлениях. Обычно рамки стадии нейруляции определяют с момента появления первых признаков формирования нерв-

ной пластинки до замыкания нервной трубки включительно.

На протяжении всей нейруляции имеют место интенсивные формообразовательные перемещения клеточного и неклеточного материала. Особенно активно происходит движение материала эктодермы и мезодермы в вентродорсальном направлении, от брюшной и боковых областей конвергентными потоками к средней спинной линии зародыша. При этом спинная часть зародыша несколько сжимается в поперечном и удлиняется в кранио-каудальном направлении. Перемещения клеточного материала особенно выражены в области туловища и малозаметны в головной области зародыша.

Образование нервной трубки из материала нейральной эктодермы является частью этих морфогенетических движений. Ещё в процессе гастрюляции хордомезодермальный материал, вворачивающийся внутрь в области дорсальной губы бластопора у амфибий (рис. 42), и головной отросток, образующийся у птиц и млекопитающих из клеток, проходящих через гензеновский узелок, продвигаются по направлению к будущему головному концу зародыша непосредственно под эктодермой. В результате этих перемещений материал хорды оказывается в таком контакте с лежащими над ним клетками дорсальной эктодермы и оказывает на них индукционное воздействие. Образование нервной пластинки вначале происходит на переднем конце зародыша, а затем смещается в каудальном направлении. Данный процесс называется **первичной эмбриональной индукцией**, при этом хордомезодерма играет роль индуктора, а нейральная эктодерма является индуцируемой или реагирующей тканью.

Более широкое определение эмбриональной индукции подразумевает изменение направления своего морфогенеза и дифференцировки какой-либо части (т.н. «реагирующей» части) зародыша на воздействие другой части («индуктора» в процессе развития).

Естественно, что с самого начала работ по изучению эмбриональных индукций, исследователей стала интересовать природа индуктора. Оказалось, что индукционные эффекты вызываются не только живыми, но и убитыми тканями индуктора, что наводило на мысль о химической природе индуктора. Начались поиски химического состава индуктора и расшифровки всех стадий индукционных процессов. Благодаря прогрессу молекулярной биологии в последние 20 лет удалось связать клеточную дифференцировку в целом, и индукционные процессы в частности, с активацией (экспрессией) или подавлением (репрессией) работы определенных участков генома, ответственных за синтез специфических белков. Некоторые из вновь синтезированных белков могут регулировать работу других генов, таким образом, в развитии формируются целые каскады генов, активирующих или репрессирующих друг друга. Процессы эмбриональной индукции, как оказалось, также представляют собой такой каскад. По современным данным, материальные основы для последующих индукционных процессов закладываются еще в оогенезе.

В процессе роста ооцита амфибий вблизи его вегетативного полюса синтезируется большое количество белков, впоследствии участвующих в индукционных процессах. Среди них: гликопротеины семейства Wnt-1 и комплекс, состоящий примерно из 30 белков, объединяемых в А надсемейство

Tg F- β (от англ. tumor growth factors- факторы роста опухолей; у взрослых организмов эти белки стимулируют рост раковых опухолей)

Другим важным элементом индукционного каскада является белок β -катенин, более или менее равномерно распределенный в цитоплазме зиготы. Вскоре после оплодотворения он расщепляется ферментами, сохраняясь лишь на дорсальной стороне зародыша, где активность расщепляющего фермента подавлена белком dishevelled.

Именно β - катенин становится одним из факторов ньюкуповской индукции. В частности, он активирует другие гены: ген notal (определяющий билатеральную симметрию), ядерный белок – goosecoid, являющийся регуляторным белком, воздействующим на гены, кодирующие белки, которые являются непосредственными факторами шпемановской индукции.

В надсемейство Tg F- β входит также белки семейства BMP (bone morphogenetic proteins – морфогенетические белки) концентрация которых наивысшая на вентральной стороне зародыша. Связываясь с мембранными рецепторами эмбриональных клеток данные белки «запрещают» им дифференцироваться в нервную ткань и «разрешают» дифференцировку в сторону покровной эктодермы.

Это открытие привело к коренному пересмотру традиционных представлений о шпемановской индукции. Если раньше считалось, что «базисным» путем дифференцировки эмбриональных клеток, который не требует никаких индукционных воздействий, является их развитие в покровную эктодерму, то теперь таким направлением считается дифференцировка в сторону нейтральных производных. Ее еще называют «индукция по умночению», поскольку данная дифференцировка нуждается лишь в блокировании BMP.

В отсутствие материала хорды, клетки дорсальной эктодермы не образуют нервной ткани, а дифференцируются в кожную эктодерму. Это было показано в экспериментах по пересадке небольших участков презумптивной нейтральной эктодермы, не испытывавшей воздействия хорды, на вентральную сторону зародыша. Из таких эксплантантов нервная ткань не образуется. Однако проведенный по описанной схеме эксперимент с поздней гастролой дает иной результат - пересаженная эктодерма образует нервную пластинку, как бы это происходило в норме, когда она оставалась на месте. То есть, проспективное значение дорсальной эктодермы на стадии поздней гастролы уже **детерминировано** (предопределено) и даже при пересадке в другую область, с иным окружением, уже не меняется.

Одним из центральных вопросов в эмбриологии, является вопрос о факторах определения судьбы эмбриональных клеток или частей зародыша в ходе эмбрионального развития. Основатель механики развития В.Ру и другие исследователи полагали, что список причин, определяющих судьбу всех клеток зародыша, можно определить экспериментальным путем. Этот подход соответствовал методологии однозначного **детерминизма** (редукционизма). К слову сказать, действительность оказалась сложнее...

Детерминация – это процесс определения судьбы данной части зародыша.

Части зародыша с уже определенной судьбой называются детерминированными. По смысловому значению к термину «детерминация» близок термин «коммитация» (или «коммитирование»), обычно применяемые в отношении отдельных клеток, дифференцирующихся на сравнительно поздних стадиях развития, например, клеток крови в процессе гемопоэза.

В опытах на живых зародышах (удаление и пересадка частей зародыша в необычное место, а также культивирование их в солевых растворах со стадии, предшествующей возникновению в них морфологически различимых признаков, получены данные о сроках детерминации зачатков разных органов и тканей и о детерминирующих факторах в эмбриогенезе и при регенерации. Процесс детерминации включает как автономные изменения свойств клеток на основе ооплазматической сегрегации и взаимодействия ядер с цитоплазмой, качественно различающейся в разных бластомерах, так и влияние отдельных групп клеток друг на друга в процессе индукции. У беспозвоночных сильнее выражена ооплазматическая сегрегация и детерминация частей тела у них выявляется уже на стадиях дробления, а у хордовых большее значение имеют индукционные взаимодействия между частями развивающегося зародыша и детерминация ярко проявляется на стадии органогенезов. По этому признаку условно различают животных с детерминированным типом развития, имеющих по терминологии В. Ру мозаичные яйца, и животных с недетерминированным типом развития, яйца которых называют регуляционными.

При нормальном развитии в компетентном (способном адекватно реагировать на воздействие индуктора) материале под влиянием индуктора происходит сначала неустойчивая (лабильная) детерминация, а затем - необратимая, стабильная детерминация. Только после этого наступает морфологически различимая дифференцировка и возникает зачаток ткани или органа. ***Поэтому детерминацию обычно называют латентной дифференциацией***, в процессе которой возникающие качественные различия между частями развивающегося организма морфологически не различимы.

В основе детерминации лежит, по-видимому, избирательная экспрессия генов на уровне транскрипции, дифференциальный процессинг РНК, образование альтернативных и генерация новых белков в разных клетках в разное время.

Что касается морфологической картины процесса нейруляции, то различают две формы первичного обособления зачатка центральной нервной системы позвоночных. У зародышей миног, костных ганоидов и костных рыб он дифференцируется на дорсальной стороне зародыша в виде плотного клеточного тяжа (рис. 51), в котором позже появляется полость. А у зародышей хрящевых рыб, амфибий и всех амниот закладка центральной нервной системы вначале имеет вид пластинки, клетки которой отличаются от клеток соседних участков эктодермы высокоцилиндрической формой (рис. 52). Затем края нервной пластинки начинают подниматься над дорсальной поверхностью, образуя нервные валики, а центральный участок пластинки, напротив, прогибается, образуя нервный желобок и вступая в контакт с хордой. Постепенно валики становятся все более высокими, сближаются сначала в срединной части, а затем в

задней и, наконец, срастаются, в результате чего образуется нервная трубка (рис. 52,53), приблизительно равномерной толщины по всей длине, за исключением расширенного краниального отдела.

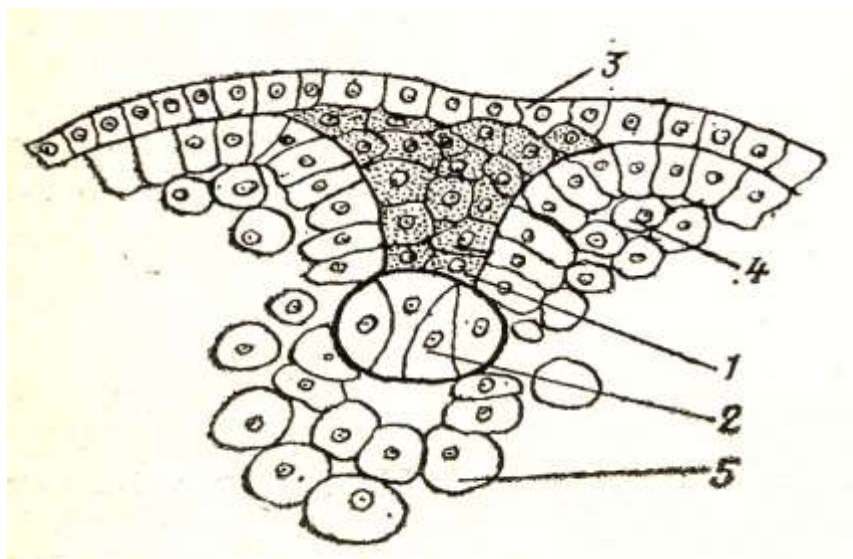


Рис. 51. Дорсальная сторона раннего зародыша миноги. Зачаток центральной нервной системы (по В.Н. Львову, 1893). 1 - плотный зачаток ЦНС, 2 - хорда, 3 - эктодерма, 4 - мезодерма, 5 - энтодерма.

Формирование нервной трубки обусловлено изменениями формы клеток, в которых принимают активное участие микротрубочки и микрофиламенты. При этом микротрубочки ориентируются вдоль апикально-базальной оси клеток, участвуя в их удлинении. В свою очередь, актиновые микрофиламенты образуют сократимое кольцо в апикальном отделе удлиняющихся клеток, которые, благодаря этому, постепенно заворачиваются в трубку (рис.52).

Несмотря на морфологическую непрерывность ранней закладки нервной трубки, ЦНС с самого начала развивается как два самостоятельных отдела: зачатки головного и спинного мозга. Полость нервной трубки - **невроцель** заметно расширена в переднем головном отделе. Концы нервной трубки некоторое время остаются незамкнутыми и называются соответственно: передним и задним **невропорам**. Из последнего развивается передний и средний мозговые пузыри, а впоследствии - головной мозг. По мере развития нервная трубка целиком обособляется от покрывающего её презумптивного эпидермиса. Пограничный между ними материал, как уже говорилось, идет на формирование нервного гребня (ганглиозной пластинки). При смыкании нервной трубки материал нервного гребня лежит дорсальнее, над нервной трубкой, а затем разделяется на две симметричные полоски, которые залегают дорсолатеральнее нервной трубки (рис. 53). Уже в процессе замыкания нервных валиков клетки нервного гребня выселяются из нейроэктодермы и мигрируют в разных направлениях. Часть из них перемещается в вентральном направлении и, располагаясь посегментно, образует скопления медуллобластов, дифференцирующихся позднее в биполярные нейроны. Мигрирующие вглубь тела зародыша медуллобласты формируют ганглии симпатической и парасимпатической нервной системы и клетки олигодендроглии (шванновских оболочек). Кроме того, они принимают участие в образовании большей части висцерального скелета, мозгового вещества надпочечников (хромаффинные клетки), паутинной и мягкой оболочек мозга, клеток микроглии.

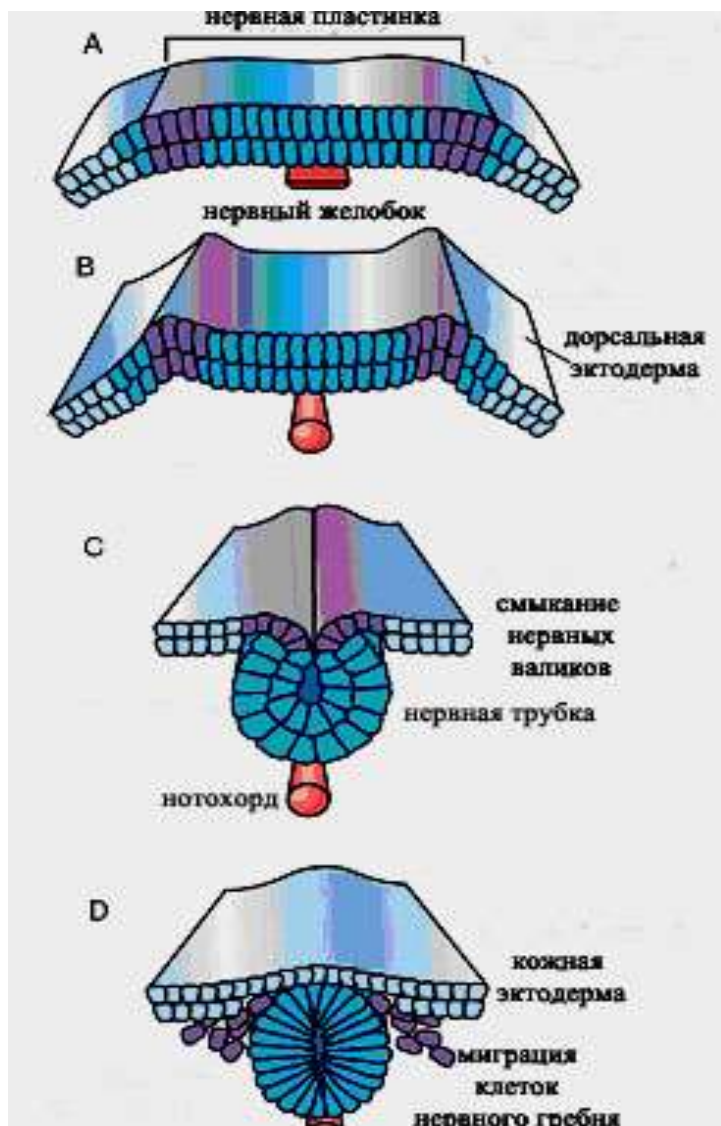


Рис. 52. Схема нейруляции. А, В, С, Д - четыре последовательные стадии от выделения нервной пластинки из дорсальной эктодермы (а), образование нервного желобка (в), формирования нервной трубки (с), миграции клеток нервного гребня и обособления нервной трубки от кожной эктодермы (д).

Некоторые клетки нервного гребня распределяются между клетками эктодермы, превращаясь впоследствии в первичные пигментные клетки - **меланобласты**, обуславливающие пигментацию покровов. Те участки покровов животного, куда меланобласты не смогли дойти, или дошли в незначительном количестве, остаются депигментированными (обычно белыми) или слабоокрашенными (кончик хвоста у лисиц, брюхо у многих рыб, у оленей, белые «чулочки» у лошадей и т.п.). В краниальном отделе клетки нервного гребня

трансформируются в хрящевые, мышечные и соединительнотканые структуры, входят в состав тканей аденогипофиза, паращитовидных желез и мякоти зуба.

Поразительное разнообразие морфологической дифференцировки производных нервного гребня или ганглиозной пластинки (рис. 54) сопровождается столь же разнообразной биохимической дифференцировкой. Так некоторые нейроны, происходящие из нервного гребня, в качестве основного медиатора вырабатывают ацетилхолин, тогда как другие - адреналин и норадреналин, являющиеся катехоламинами. К последнему близок пигмент меланин, синтезируемый в меланоцитах. Клетки ганглиозной пластинки активно мигрируют по

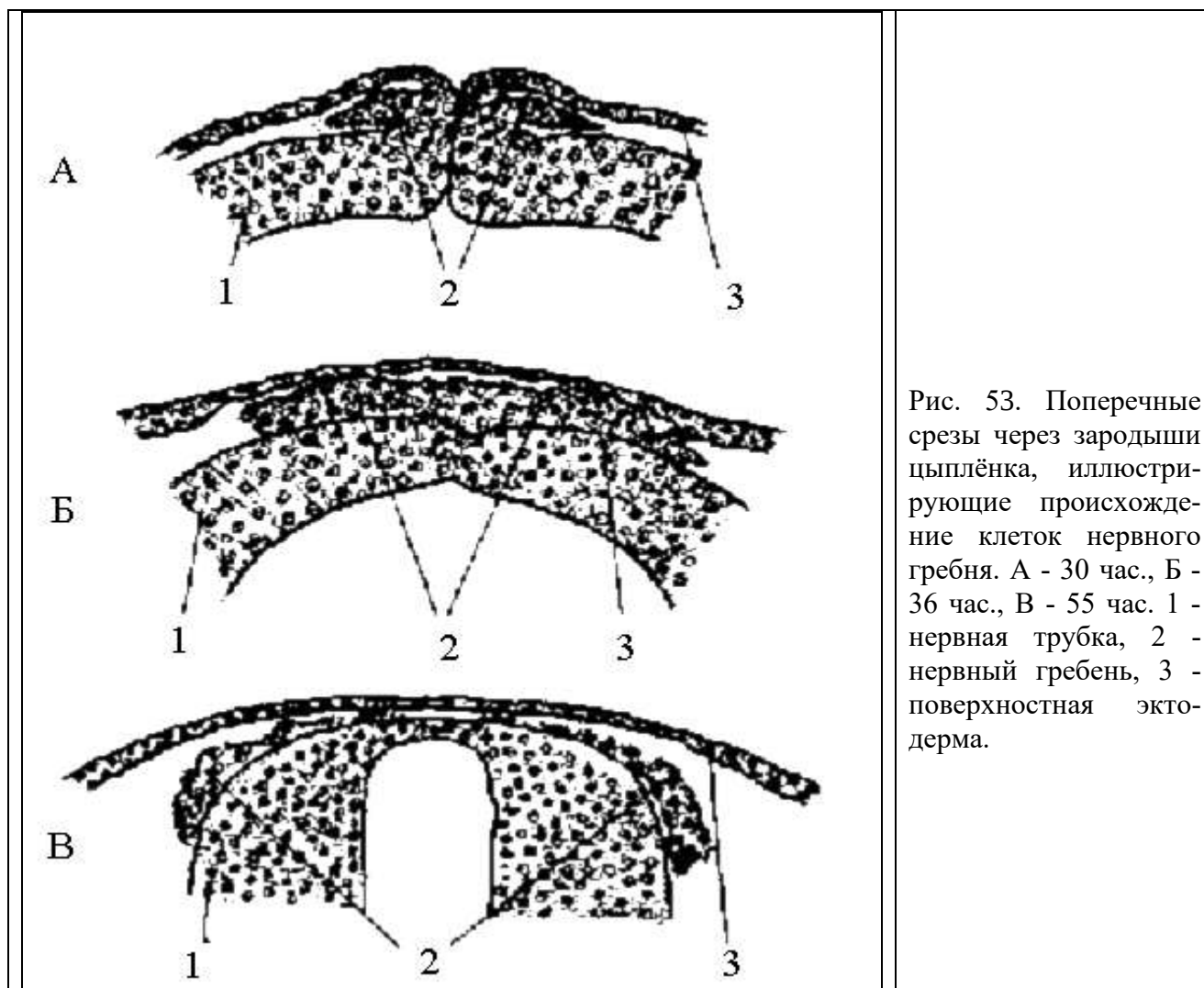


Рис. 53. Поперечные срезы через зародыши цыплёнка, иллюстрирующие происхождение клеток нервного гребня. А - 30 час., Б - 36 час., В - 55 час. 1 - нервная трубка, 2 - нервный гребень, 3 - поверхностная эктодерма.

всему организму, главным образом между мезодермой и эпидермисом, но также перемещаются и между мезодермой и нервной трубкой. Они являются родоначальниками громадного числа типов клеток, включая нейроны и клетки нейроглии, меланоциты, клетки надпочечника, синтезирующие адреналин, скелетные и соединительнотканые компоненты головы. Дальнейшая судьба клеток нервного гребня зависит от того, куда они мигрируют и где поселяются.

Миграция клеток нервного гребня чрезвычайно целенаправленна и, по-видимому, в определенной мере регулируется внешними факторами. Хотя, очевидно, способность к миграции является имманентным (внутренне присущим) свойством самих этих клеток. Известно, в частности, влияние на направление миграции клеток нервного гребня нервной трубки. Если нервную трубку развернуть на 180° относительно её дорсальной оси, то происходит соответствующее изменение и путей миграции клеток ганглиозной пластинки.



Рис. 54. Судьба клеток ганглиозной пластинки.

Используя метод мечения флуоресцирующими антителами, исследователи из нескольких лабораторий установили три главных пути, по которым эти клетки мигрируют в разные области. Первый путь проходит в вентральном направлении через передний отдел сомита. Параллельно с нейруляцией у всех метамерно организованных животных идет процесс обособления и дифференцировки мезодермы - **метамеризация**. Метамеризация мезодермы, а точнее, ее утолщенной дорсальной части - эпимера - это один из самых универсальных процессов в индивидуальном развитии. Он встречается, начиная с членистоногих беспозвоночных и, кончая всеми позвоночными животными. Микроскопически процесс разделения достаточно однородного мезодермального пласта на сомиты исследован И.И. Наумиди. Она обнаружила в дорсомедиальной области осевой мезодермы зародыша курицы, поблизости от заднего края последнего сформировавшегося к данному моменту сомита, особые веерообразные группировки из небольшого числа клеток - "клеточные вееры". Эти клеточные вееры растут за счет вовлечения в себя все новых клеток с заднего конца. По мере роста веер загибается назад (а иначе клетки вынуждены были бы менять свою форму, перерастягиваться). Загибание веера означает формирование задней границы каждого последующего сомита. По мнению В.А. Голиченкова (1991 г.), возможно, что такой механизм лежит в основе сегментации мезодермы и у других позвоночных.

Морфологически выраженным волнам веерообразования предшествует невидимая "волна", обуславливающая компетентность данной области осевой мезодермы к эпителизации и, в частности, к образованию веера. Последовательность сегментации осевой мезодермы имеет кранио-каудальный вектор и обособление сомитов происходит сначала в головном конце тела.

Способ закладки и дифференцировки сомитов в разных классах хордовых неодинаков. Например, у ланцетника сомит формируются в виде энтероцельных выпячиваний архентерона, и с самого начала содержит участки целомической

полости. А у большинства позвоночных закладки сомитов первоначально представляют собой сплошные клеточные скопления мезодермы, а целомические полости возникают в них вторично, путем расхождения клеток - **шизоцельным способом**.

Сегментированная (дорсальная) мезодерма дифференцируется на три основные закладки: **дерматом, склеротом и миотом** (рис. 55). Наружный участок сомита, подстилающий кожную эктодерму и формирующий впоследствии с эпидермисом покровы и их производные, называется дерматомом. Основная масса клеточного материала дерматома превращается в фибробласты, а из дерматома в целом развивается соединительнотканная основа кожи - **собственно дерма**.

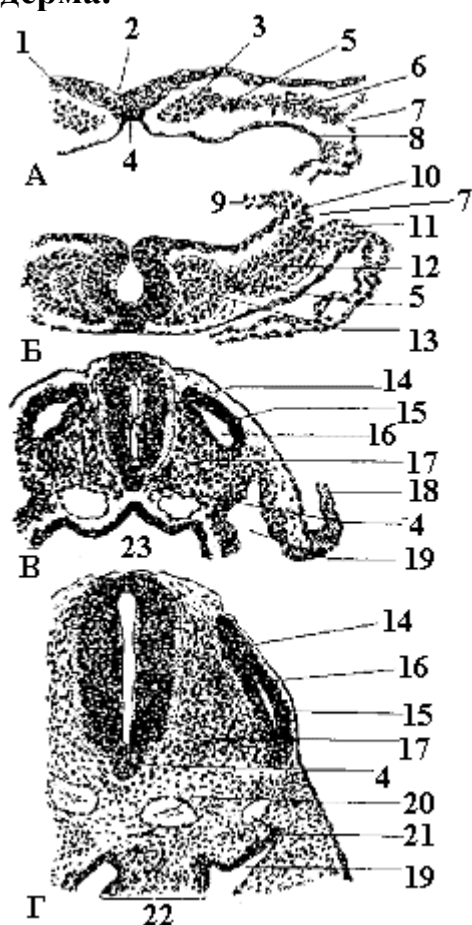


Рис. 55. Поперечные срезы (x150) зародышей свиньи разного возраста, на которых видно образование сомитов и начало их дифференцировки (по серийным срезам из коллекции Карнеги). А - начало образования сомитов. Б - Стадия 7 сомитов. В - Стадия 16 сомитов. Г - стадия 30 сомитов. 1 - эктодерма нервной пластинки, 2 - нервная бороздка, 3 - дорсальная мезодерма, 4 - хорда, 5 - промежуточная мезодерма, 6 - боковая пластинка, 7 - внезародышевый целом, 8 - энтодерма, 9 - амнион (разрезан), 10 - соматическая мезодерма, 11 - спланхническая мезодерма, 12 - внутризародышевый целом, 13 - сомит, 14 - миотом, 15 - дерматом, 16 - миоцель, 17 - склеротом, 18 - амнион, 19 - целом, 20 - спинная аорта, 21 - задняя кардиальная вена, 22 - дорсальная брыжейка, 23 - кишка.

Внутренняя, состоящая из рыхлой **мезенхимы** часть сомита и примыкающая к хорде (нижние позвоночные) или к хорде и нервной трубке (высшие позвоночные), называется **склеротомом**. Склеротом в дальнейшем дает скелет, а его мезенхимные клетки трансформируются в двух основных направлениях клеточной дифференцировки: **хондробласты** и **остеобласты** - клетки хряща и кости.

Кость может развиваться напрямую из скелетогенной мезенхимы, а может - на базе хрящевой модели. Осевой скелет сегментируется так, что каждое тело позвонка формируется из двух половин соседних сегментов. Дифференцировка мезенхимных клеток в хондробласты происходит под индуцирующим воздействием хорды и нервной трубки. Слой клеток, расположенный между дерматомом и склеротомом называется **миотомом** и дает мышечные клетки -

миобласты. Из них позднее развивается вся туловищная поперечно-полосатая мускулатура.

Расположенная ниже дорсальной части мезодермы (эпимера) обширная масса ранней мезодермы (гипомер) формирует на боковых брюшной частях зародыша тонкую эпителиевидную боковую пластинку - спланхнотом. В конечном счете боковая пластинка расщепляется на два слоя: наружный, соединенный с эктодермой **париетальный листок** или соматическая мезодерма и внутренний, прилегающий к энтодерме **висцеральный листок** или спланхническая мезодерма (рис. 54). Образующаяся между этими листками полость известна под названием **целом**. Оба листка соединяются друг с другом по средней линии тела посредством спинной и брюшной брызжеек.

Париетальный листок с прилегающей к ней эктодермой называют **соматоплеврой**, а висцеральный, с подлежащей энтодермой - **спланхноплеврой**.

Переход между дорсальной сегментированной мезодермой и несегментированной боковой пластинкой (мезомер) или ножки сомитов - в дальнейшем дает **нефротомы** - закладки мочеполовой системы.

Гладкая мускулатура кишечника развивается из висцерального листка боковой пластинки. Гладкомышечная ткань стенок кровеносных сосудов - из париетального и висцерального листков, а поперечно-исчерченная сердечная мускулатура и клетки крови - из висцерального листка. Кроме того, по данным П. Ньюкупа, у хвостатых амфибий из висцерального листка образуются первичные половые клетки - гоноциты.

Выселившиеся из париетального листка мезодермы мезенхимные клетки совместно с покровной эктодермой участвуют у тетрапод также в образовании парных конечностей.

Вопросы для самоконтроля:

1. Понятие о первичной эмбриональной индукции. Роль индукционных взаимодействий в эмбриогенезе.
2. Общая характеристика этапа нейруляции и закладки осевых органов в эмбриогенезе.
3. Понятие об индукторе и реагирующей ткани.
4. Химическая природа индуктора в эмбриогенезе.
5. Каскадная регуляция генов в первичной эмбриональной индукции.
6. Понятие о детерминации в эмбриональном развитии.
7. Механизмы и стадии детерминации.
8. Способы формирования нервной трубки.
9. Нервный гребень и судьба клеток нервного гребня.
10. Метамеризация мезодермы и ее механизмы.
11. Дифференциация мезодермы.
12. Дерматом, склеротом, миотом и их производные.

ГЛАВА ТРИНАДЦАТАЯ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЗАРОДЫША С ВНЕШНЕЙ СРЕДОЙ И С МАТЕРИНСКИМ ОРГАНИЗМОМ

Биотические и абиотические факторы среды, понятие о лимитирующем факторе, пределах толерантности зародыша. Особенности внеутробного и внутриутробного развития. Яйцевые оболочки, их свойства и экологическое значение. Провизорные органы у амниот: желточный мешок, амнион, хорион и аллантоис. Их развитие, строение, функции, образование и типы плацент у млекопитающих. Изменение соотношений развивающегося организма со средой при рождении или освобождении зародыша из яйцевых оболочек.

Общеизвестна огромная роль внешней среды в жизнедеятельности живых организмов. Еще большую роль играют факторы внешней среды в развитии зародыша. При этом в понятие внешней среды входят все условия живой и неживой природы, которые окружают зародыш или материнский организм (при внутриутробном развитии) и прямо или косвенно влияют на его состояние, выживание и развитие. Отдельные элементы внешней среды, действующие на организм, называют экологическими факторами. Различают две группы факторов: **абиотические и биотические**, то есть факторы неживой и живой природы. Огромное значение среди абиотических (физических) факторов среды отводится климату. Климат определяется многими показателями, важнейшие из которых: свет, температура и влажность. Кроме того, во многих местообитаниях организмы сильно зависят от кислотности и солёности среды обитания, от влияния воздушных и водных течений, от содержания кислорода в среде и др.

Для жизнедеятельности организмов необходимо наличие определённой совокупности условий. Если все условия оказываются благоприятными, за исключением одного, проявленного недостаточно или в слишком большом избытке, то это последнее условие, называемое лимитирующим (ограничивающим) фактором, приобретает решающее значение для жизни. Лимитирующим фактором может быть недостаток или избыток тепла, света, воды. Следовательно, организмы, включая зародыши, можно охарактеризовать экологическим минимумом и экологическим максимумом, диапазон между этими двумя величинами составляет пределы его толерантности (устойчивости). При этом, пределы толерантности у организмов в эмбриональном и раннем постнатальном периодах онтогенеза обычно уже, чем у взрослых животных. Известно, что для того чтобы выразить относительную степень толерантности, в экологии существует ряд терминов, в которых используются приставки стено- (узкий) и эври- (широкий). Живые организмы, которым требуются условия, ограниченные узкими пределами, носят название – стеноэков. Другие организмы, наоборот, приспособляются к гораздо более изменчивым условиям (диапазон их

толерантности гораздо шире), такие менее требовательные организмы называются эвриэками.

В ходе эмбрионального развития на организм прямо или косвенно воздействуют разнообразные внешние факторы. Возьмем, например, температуру. Прежде всего, она оказывает влияние на обмен веществ. Для эмбриогенеза каждого вида существует температурный минимум, оптимум и максимум. Икра гольца *Salvelinus* развивается при температурах 0-12 °С с оптимумом около 4 °С. Икра лягушки *Rana ripiens* развивается при 0-30 °С с оптимумом около 22 °С. В пределах минимума и максимума температура не вызывает качественных изменений в развитии, а влияет лишь на его темпы. Так при 20 °С яйца лягушки развиваются вдвое быстрее, чем при 10 °С (в соответствии с правилом Вант-Гоффа для химических процессов). У пойкилотермных животных с непостоянной температурой тела и в случаях внеутробного развития эмбриогенез может проходить в довольно широком диапазоне температур. У гомотермных животных, имеющих постоянную температуру тела, этот диапазон обычно очень узкий. Например, куриные яйца развиваются лишь при температуре около 38 °С. Такой температурный оптимум для развивающихся яиц обеспечивает наседка. Большое значение имеют температурные отклонения тела и для развития плацентарных млекопитающих, включая человека. Длительное перегревание организма матери приводит к аномалиям развития плода.

Биотические факторы — разнообразные формы влияния одних организмов на жизнедеятельность других. При этом одни организмы могут служить пищей для других (например, растения — для животных, жертва — для хищника), быть средой обитания (например, хозяин — для паразита), способствовать размножению и расселению (например, птицы и насекомые-опылители — для цветковых растений), оказывать механические, химические и другие воздействия (например, одни растения затеняют другие, разные виды животных конкурируют между собой за пищу).

Степень зависимости развивающегося зародыша от внешней среды у представителей разных видов сильно отличается и отражает филогенетические особенности. При **внеутробном развитии** ранние этапы онтогенеза могут проходить во внешней, водной или воздушной среде, а иногда в почве. Среди современных позвоночных внеутробное развитие является единственным типом развития у круглоротых и птиц. Как распространенный вариант оно встречается у рыб, амфибий и рептилий. При этом чаще всего развивающийся зародыш в виде икринок, личинок, куколок, несмотря на наличие разнообразных морфофункциональных адаптаций в виде яйцевых оболочек, запасов трофических веществ и специальных внезародышевых структур, испытывает воздействие внешней среды, условия которой (температура, влажность, соленость, уровень солнечной инсоляции и др.) могут постоянно меняться. Очевидно, что никакие оболочки не помогут, например, при резких температурных перепадах. Отсюда большая зависимость зародыша от внешних условий и, как следствие, высокий уровень гибели развивающихся яиц. Оплодотворение при внеутробном развитии может быть как внутренним, так и наружным.

При **внутриутробном развитии** ранние этапы онтогенеза животного проходят в теле материнского (или, очень редко, отцовского) организма: либо в полости яйцевого фолликула, либо в полости яичника, либо в специализированном отделе яйцевода-матке. Хотя встречаются такие экзотические варианты онтогенеза, как у крохотных лягушек ринодерма Дарвина, когда развитие происходит в горловом мешке самца, который заглатывает оплодотворенные икринки. Там, как в инкубаторе, они продолжают эмбриогенез. Вылупившиеся из икринок личинки снабжены достаточно солидными запасами желтка. По мере использования желтка трофика личинок меняется. Они прирастают к слизистой горлового мешка сначала хвостом, а потом спиной. Их кожа на спине и хвосте имеет особое строение, позволяющее извлекать из крови отца кислород и необходимые для их дальнейшего развития питательные вещества.

При внутриутробном развитии зародыш защищен от непосредственного воздействия внешней среды и процент гибели эмбрионов обычно ниже, чем при внеутробном развитии.

Деление всех позвоночных животных на первичноводных (Anamnia) и первичноназемных (Amniota) основано на особенностях их эмбрионального развития. У всех высших позвоночных (Amniota), к которым относятся рептилии, птицы, млекопитающие, зародышевое развитие протекает в яйцах, откладываемых на суше, или развивающихся в организме матери. При этом развивающийся зародыш нуждается в поступлении извне питательных веществ, кислорода, а также в удалении конечных продуктов обмена, а при внутриутробном развитии - в наличии иммунного барьера между собой и материнским организмом. Адаптации зародыша к наземной среде обеспечивают условия жизни предковых форм, то-есть, водную среду. Эта среда поддерживается разнообразными яйцевыми оболочками и системой собственных оболочек зародыша. К последним относятся - амнион, хорион, аллантоис и желточный мешок. У позвоночных эти органы впервые появились у рептилий, что позволило им успешно осваивать участки суши, удаленные от воды.

У более близких к рептилиям птиц внезародышевые органы выполняют те же функции посредника между внешней средой и зародышем и имеют сходное строение.

И хотя у большинства млекопитающих эмбриональное развитие внутриутробное и вместо скорлупы формируется плацента, обеспечивающая взаимосвязь с материнским организмом, у них сохранились те же самые внезародышевые оболочки. Все они образуются за счет внезародышевых частей зародышевых листков и являются провизорными органами. В их состав входят эктодермальный и энтодермальный эпителий, подостланный мезодермой.

Независимо от того, где проходит развитие - внутри материнского организма (у живородящих видов) или в находящемся во внешней среде яйце (у яйцекладущих видов) эмбрион дышит, питается и выделяет конечные продукты метаболизма. Разберем это на примере всем нам знакомых куриных яиц.

Например, если только что отложенное яйцо весит около 60 г., то через 21 сутки инкубации его масса снижается до 51 г. и из него вылупляется цыпленок

весом 39 г., остальные 12 г. приходится на скорлупу и подскорлуповые пленки. Что поступает в яйцо и что удаляется из него при инкубации? Установлено, что за это время яйцо поглощает 6 литров кислорода и выделяет 4,5 литра двуокиси углерода. За счет высокой температуры инкубации (38-39 градусов С) оно испаряет около 9 г. воды. Транспорт других веществ через скорлупу не отмечен (считается, что азот, составляющий около 78% атмосферы, эмбрионом не усваивается), а это означает, что все питательные вещества поступают в зародыш из самого яйца (из желтка, из скорлупы и т.д.) и конечные продукты обмена накапливаются также внутри него (изолируясь в специальном органе, выполняющем функции резервуара).

Принципиально иная картина эмбриогенеза человека. Оплодотворенное яйцо ничтожно по весу и едва достигает 130 мкм в диаметре. В ходе эмбриогенеза его масса неизмеримо возрастает (до 3500 г.) за счет поступления питательных веществ из крови материнского организма. Конечные продукты обмена также выводятся в кровь матери.

Одной из важнейших проблем при развитии яйца на суше является наличие водной среды вокруг зародыша и механизма препятствующего ее высыханию. Водная среда обеспечивается **амнионом**, секретирующим специальную амниотическую жидкость, в которой как бы плавает развивающийся эмбрион. Амниотическая жидкость по солевому составу близка к цитозолю клеток. Амнион формируется либо боковыми складками внезародышевой эктодермы и мезодермы, которые приподнимаются и смыкаются над зародышем, (плектамнион рептилий, птиц и некоторых млекопитающих), либо путем образования полости среди зародышевых клеток, постепенно преобразующихся в окружающую зародыш оболочку (**схизамнион** насекомоядных, рукокрылых, приматов).

Желточный мешок у всех низших позвоночных представляет собой простое выпячивание брюшной стенки тела. Стенки желточного мешка образованы всеми слоями стенок тела зародыша: эктодермой, двумя листками мезодермы и энтодермой.

У зауропсид желточный мешок образуется раньше других внезародышевых оболочек, так как он обеспечивает питание зародышей. Он образуется за счет энтодермальных клеток, обрастающих желток. Снаружи от этого слоя лежит хорион, формирующий вместе со слоем энтодермальных клеток двухслойную **омфалоплевру**. Затем между этими слоями разрастается мезодерма с кровеносными сосудами - трехслойная омфалоплевра. Основная функция желточного мешка - утилизация питательных веществ желтка.

При этом энтодермальные клетки переваривают белки желтка до аминокислот, а кровеносные сосуды переносят их в тело зародыша.

В олиголецитальных яйцах млекопитающих желтка нет, но содержится жидкость, богатая белками, аминокислотами, глюкозой и содержащая ферменты трансаминирования. При этом важнейшей функций желточного мешка является его участие в эмбриональном кроветворении.

Хорион (сероза) - это самая наружная зародышевая оболочка, представляющая собой, так же как и амнион, временный орган эмбриогенеза. У птиц и рептилий хорион плотно прилегает к скорлупе и участвует в газообмене. У

млекопитающих он является частью плаценты. При вылуплении из яйца или при родах плод освобождается от хориона.

У зауропсид и первозверей хорион развивается из наружного листка амниотической складки, вследствие чего после замыкания амниотической складки над спинной стороной зародыша здесь сохраняется соединение амниона с хорионом.

У сумчатых и плацентарных млекопитающих хорионом становится трофобласт, являющийся гомологом наружного листка амниотической складки зауропсид. На самых ранних этапах своего образования хорион подстилает первичную оболочку яйцеклетки. После растворения первичной оболочки хорион зауропсид входит в соприкосновение с третичными оболочками яйца, а у видов с внутриутробным развитием - с тканями материнского организма.

Аллантоис- один из самых переменных внезародышевых органов амниот. У зауропсид он развивается как мешковидный вырост вентральной стенки задней кишки, т.е. является производным энтеродермы, покрытым снаружи висцеральной мезодермой. У всех зауропсид аллантоис быстро дорастает до хориона и, распространяясь под ним, окружает амнион и, полностью или частично, желточный мешок. При вылуплении из яйца аллантоис у зауропсид обычно отбрасывается, однако у черепах и некоторых ящериц его проксимальная часть сохраняется в виде мочевого пузыря. Аллантоис первозверей не отличается от аллантоиса зауропсид. У большинства сумчатых, за исключением бандикут, аллантоис редуцирован и не дорастает до хориона.

Чрезвычайно переменен аллантоис у плацентарных млекопитающих. Размеры аллантоиса при этом определяются тем, насколько эффективно справляется хорионическая плацента с удалением конечных продуктов азотистого обмена из зародыша. Очень большой аллантоис характерен для зародышей хищных, китообразных, хоботных, копытных, даманов и лемуру. У приматов, неполнозубных и грызунов энтодермальная часть аллантоиса рудиментарна или вовсе не развивается.

Функцией аллантоиса является выделение из плода конечных продуктов азотного обмена. Поэтому у яйцекладущих рептилий и птиц аллантоис представляет собой большой мешок, в котором скапливаются токсические продукты метаболизма.

У тех амниот, у которых аллантоис дорастает до хориона, он совместно с хорионом помимо выделительной несет также питательную и дыхательную функции.

При этом мезодермальный слой аллантоиса часто сближается и сливается с мезодермальным слоем хориона, образуя **хорио-аллантоисную оболочку**, в которую врастают кровеносные сосуды, обеспечивающие газообмен, трофику и выведение конечных продуктов метаболизма.

Участок хориона с кровеносными сосудами аллантоиса у видов с внутриутробным развитием образует хорио-аллантоисную плаценту (у некоторых живородящих ящериц, бандикут, плацентарных млекопитающих).

Плацента (лат. *placenta*, от греч. *Plakús* — лепёшка), детское место, у человека, почти у всех млекопитающих, а также у некоторых хордовых и беспозвоночных животных — орган, осуществляющий связь и обмен веществ между организмом матери и зародышем в период внутриутробного развития. Через плаценту зародыш получает кислород и питательные вещества из крови матери, выделяя в неё продукты распада и двуокись углерода. Кроме того, плацента выполняет барьерные функции, активно регулируя поступление различных веществ в зародыш. В плаценте содержатся ферменты, участвующие в обмене веществ зародыша, витамины. В частности, здесь синтезируются гормоны (хорионический гонадотропин), ацетилхолин и др. вещества, воздействующие на организм матери. У человека и млекопитающих плацента образуется путём той или иной формы соединения наружной зародышевой оболочки- хориона со стенкой матки. На ранних стадиях развития зародыша по всей поверхности хориона образуются выросты — т. н. первичные, а затем вторичные ворсинки, которые, разрастаясь, внедряются в образующиеся углубления слизистой оболочки матки (крипты). Во вторичные ворсинки обычно врастают кровеносные сосуды желточного мешка или аллантоиса. В зависимости от этого различают желточную и аллантоидную плаценту. Желточная плацента образуется у некоторых рыб (салахий), земноводных и пресмыкающихся (у последних образуется и аллантоидная плацента), а также у большинства сумчатых. Среди живородящих беспозвоночных плацента имеется у некоторых онихофор (первичнотрахейных) и сальп. Однако ни по строению, ни по происхождению плацента этих животных не сравнима с плацентой позвоночных. У онихофор плацента формируется путём срастания желточного мешка со стенкой матки. У сальп плацента образуется при участии клеток фолликулярного эпителия, которые перемешиваются с зачатками органов зародыша и играют роль посредника между ними и организмом матери. У высших млекопитающих сначала функционирует желточная плацента, а через некоторое время она заменяется аллантоидной. У крота, кролика, лошади, верблюда и др. функционируют плацента обоих типов.

В зависимости от расположения ворсинок на хорионе и крипт на слизистой оболочке матки у млекопитающих различают несколько типов строения плаценты. Диффузная плацента — короткие кустистые ворсинки образуются на всей поверхности хориона и не срастаются со слизистой оболочкой матки, а только входят в её крипты — развивается у китообразных, свиней, верблюдов, лошадей и др. Котиледонная плацента жвачных — длинные разветвляющиеся ворсинки хориона расположены в виде скоплений или островков, называют котиледонами. Ворсинки врастают в крипты карункул — утолщений слизистой оболочки матки. Поясковидная (зональная) плацента хищных — ворсинки хориона располагаются в средней его части и образуют на поверхности как бы пояс. Дискоидальная плацента грызунов, некоторых насекомоядных, летучих мышей и приматов — ворсинками покрыта часть хориона, имеющая форму диска; остальная поверхность хориона гладкая.

Классифицируют плаценты и по количеству слоев тканей, разделяющих сосудистые системы матери и плода (рис. 56). Так, эпителиохориальная пла-

цента (полуплацента) некоторых сумчатых, свиней, тапиров, китообразных, верблюдов, лошадей, лемуру и др. — ворсинки и крипты покрыты эпителием, сохраняющимся в течение всей беременности. При изгнании последа ворсинки свободно вытягиваются из крипт. Десмохориальная плацента многих жвачных — под действием ферментов эпителия врастающих ворсинок разрушается эпителий, выстилающий углубления слизистой оболочки матки. Эндотелиохориальная (вазохориальная) плацента всех хищных — растворяется не только эпителий, но и соединительная ткань; ворсинки глубоко врастают в толщу слизистой оболочки матки; их эпителий прилегает непосредственно к эндотелию сосудов матки. Гемохориальная плацента грызунов, некоторых насекомоядных, летучих мышей и приматов — разрушается и эндотелий сосудов матки; ворсинки хориона омываются кровью матери.

Ахориальная (безворсинчатая) плацента не имеет ворсинок; нет тесной связи между плодной и материнской частями плаценты. Эпителиохориальную и синдесмохориальную плаценты наз. неотпадающими, т. к. при родах ворсинки хориона выходят из углублений слизистой оболочки матки, не повреждая её. Отторжение вазохориальной и гемохориальной плаценты сопровождается отпадением части слизистой оболочки матки, поэтому их называют отпадающими. Структура тканей плаценты зависит от стадии развития зародыша. Плацента у человека образуется к концу 3-го месяца беременности путем срастания наружной ворсинчатой оболочки зародыша со стенкой матки. У доношенного плода имеет вид плоского диска размерами 15-20 см, толщиной до 3 см, весом около 500 г. Зародыш соединяется с плацентой посредством пуповины, или пупочного канатика. Так называемая **окончательная пуповина**, состоит из мезодермы аллантоиса и зародышевого ствола, покрытого эктодермальным эпителием амниона. Одним концом пуповина переходит в плодную часть плаценты, а другим прикрепляется к вентральной стенке тела плода (к пупку). В строении пуповины проходят кровеносные сосуды, обеспечивающие транспорт газов, питательных веществ, гормонов, конечных продуктов обмена между плодом и кровью, циркулирующей в материнской части плаценты.

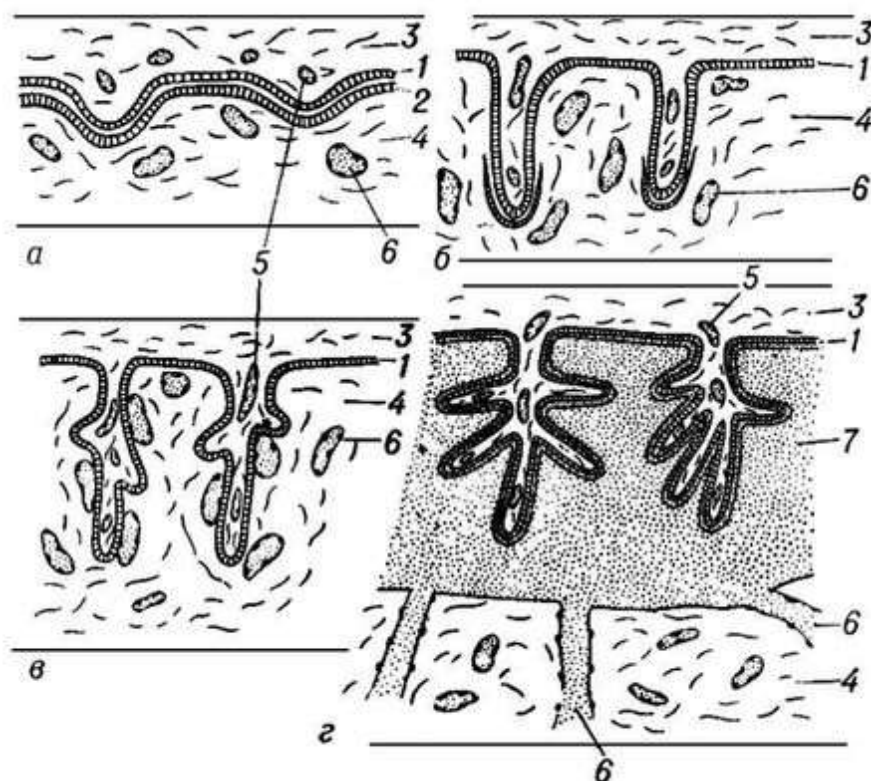


Рис. 56. Схема строения плацент: а — эпителиохориальная; б — десмохориальная; в — эндотелиохориальная; г — гемохориальная; 1 — эпителий хориона; 2 — эпителий стенки матки; 3 — соединительная ткань ворсинки хориона; 4 — соединительная ткань стенки матки; 5 — кровеносные сосуды ворсинок хориона; 6 — кровеносные сосуды стенки матки; 7 — материнская кровь.

В плаценте различают материнскую поверхность (базальную пластину), прилегающую к матке, и плодовую, к которой прикрепляется пуповина, со своими кровеносными сосудами (рис.57). Все обменные процессы между организмом матери и плода осуществляются через поверхность ворсинок хориона, достигающую к концу беременности 6000—10000 см²; общая длина их достигает 50 км. П. содержит ферменты и витамины, в ней синтезируются гормоны и медиаторы, оказывающие мощное воздействие на материнский организм, обеспечивающие его перестройку на режим беременности. Плацента избирательно задерживает некоторые вредные для плода вещества, циркулирующие в крови матери. Вместе с тем некоторые химические соединения (в частности, лекарства), неядовитые для матери, могут обладать повреждающим плод (тератогенным) действием и при этом свободно проходят через плаценту.



Рис.57. Человеческая плацента с внутренней стороны, покрытой амнионом с просвечивающим разветвлением сосудов пуповины.

Вопросы для самоконтроля:

1. взаимодействие развивающегося зародыша со средой и с материнским организмом.
2. Биотические и абиотические факторы среды, яйцеродность, яйцеживородность.
3. Понятие о лимитирующем факторе, пределах толерантности зародыша Яйцевые оболочки, особенности их организации и биологическое значение.
4. Провизорные органы у амниот (желточный мешок, амнион, хорион, аллантоис) и их биологическое значение.
5. Развитие, строение, функции, образование плаценты у млекопитающих.
6. Классификация плацент млекопитающих.
7. Изменение соотношений развивающегося организма со средой при рождении или освобождении зародыша из яйцевых оболочек.

ГЛАВА ЧЕТЫРНАДЦАТАЯ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ БАЗА ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

Современные знания в области биологии развития базируются на нескольких теоретических положениях.

1. Клеточная теория развития. Она утверждает, что сложный многоклеточный организм развивается обычно из единственной клетки (яйцеклетки, точнее, оплодотворенной яйцеклетки - зиготы). Развитие начинается с *деления* зиготы без расхождения дочерних клеток, остающихся связанными, что приводит к многоклеточности. В образовавшейся многоклеточной массе начинается *дифференцировка* клеток, т.е. появление устойчивых различий между группами клеток в их цитохимии и цитоморфологии. Ставшие различными клетки делятся, образуя клоны (т.е. группы клеток - потомков одной клетки, претерпевших этап дифференцировки в числе первых). Клоны формируют разные органы и ткани, причем в состав органа может входить по несколько клонов. Деления клеток в разных органах ведут к росту соответствующих зачатков органов и эмбриона в целом.

2. Генетическая идентичность клеток одного организма. При делении и дифференцировке клеток набор генов, содержащихся в них обычно остается неизменным (не считая случайных мутаций), так как перед каждым клеточным делением происходит самокопирование всего генома (репликация ДНК) с образованием двух копий и распределением этих копий по двум дочерним клеткам. **Учитывая тот факт, что все клетки организма являются производным одной исходной клетки или зиготы, все они обладают идентичным ей набором генов.** Исключение составляют лимфоциты иммунной системы, в которых в процессе дифференцировки происходят обязательные мутации генов белков иммуноглобулинов (в частности, белков антител) и эти гены в ходе дифференцировки приобретают отличия от соответствующих генов зиготы.

3.Связь генома с дифференцировкой органов и тканей. Возникновение устойчивых различий между тканями обусловлены тем, что в них синтезируются и функционируют разные белки, каждый из которых является продуктом активности определенного гена(ов). Следовательно, в клетках разных тканей экспрессируются разные наборы генов из единого для всех клеток генома. Включение экспрессии и подавление экспрессии генов обеспечивается активизированными регуляторными белками и другими механизмами.

4. Позиционная информация в развитии зародыша и трансдукционный механизм передачи ее сигналов для запуска органоспецифичной и тканеспецифичной экспрессии генов. Этот понятия биологии развития наиболее специфичны для нее и требуют более пространных пояснений, чем предыдущие три.

С тех пор, как клеточная теория окончательно заняла подобающее ей место в биологии, в том числе, и в биологии развития, представляется очевидным, что онтогенез Metazoa начинается с одноклеточной стадии (яйцеклетки или зи-

готы) и проходит стадию своеобразного “размножения” этой клетки (дробления), в результате которого у многих видов получается скопление мало отличающихся друг от друга клеток.

При этом даже у таких высших животных, как плацентарные млекопитающие, в этой куче клеток до такой степени отсутствует четкая информация о расположении будущих органов и тканей, что двух эмбрионов можно “слепить” в один (т.е. в “химеру”) и из такого объединенного эмбриона может развиваться гармонично построенный организм с одной головой, четырьмя конечностями и т.д., иными словами, анатомически нормальный, а не какой-нибудь “двойной” урод, типа сиамского близнеца. Из этого факта можно сделать вывод, что “решение” о том, какие из клеток этого скопления сформируют, скажем, голову, а какие хвост будущего организма на стадии кучи клеток еще не “созрело” к моменту объединения эмбрионов, а если созрело, то не окончательно (по крайней мере у этой группы животных).

Об этом же свидетельствует обратный опыт, который сама природа ставит даже на людях: когда такая “куча” клеток почему-либо разваливается на две, из каждой развивается по генетически идентичному организму, т.е. однояйцовые близнецы, что на животных биотехнологи-эмбриоинженеры уже умеют делать искусственно.

Каким же образом “куча” клеток, не имеющая никакого сходства по форме со взрослым организмом, постепенно образует на одном своем конце голову, а на противоположном конце хвост. Сбоку, соответственно, точно против друг друга возникают левая и правая передние и левая и правая задние конечности, “где положено” глаза, нос и пр.

Откуда же приходит “решение”, т.е. **информация**, о том, каким клеткам следует формировать голову, а каким хвост?

Профессионально не подготовленные по биологии развития люди дают, обычно, такой ответ на этот вопрос. “Развитие зародыша определяется наследственной информацией, содержащейся в генах”. Бесспорно, очень большая доля истины в самом по себе этом положении есть. Но все не так просто. Ведь набор генов во всех клетках зародыша и даже взрослых животных большинства видов один и тот же. Вспомним хотя бы овечку Долли выращенную из лишенной ядра яйцеклетки, в которую ввели ядро одной из клеток специфичнейшей ткани молочной железы. Значит в ядрах клеток молочной железы есть все гены, нужные чтобы обеспечить развитие всей овцы со всеми ее органами.

Допустим, геном клеток, расположенных с одного края “кучи” клеток (из которого развилась голова), “продиктовал” своей цитоплазме приступить к развитию в голову. Тогда, спрашивается, почему **такой же** геном клетки, расположенной на противоположном конце “кучи” (из которого впоследствии развился хвост) не продиктовал **того же** (т.е. развития **головы**)?

Значит в **одинаковые геномы** разных клеток поступают **разные команды**. Значит не только **геном диктует**, но и **геному диктуют** в процессе развития.

Но “кто” может диктовать геному? В общем виде ответ очевиден - химически измененная цитоплазма (а, непосредственно, кариоплазма) клетки. Ведь

гены и весь геном это всего лишь длинные нитевидные молекулы ДНК, вернее их определенные сегменты, и язык, на котором им “диктуют” может быть, по существу, только химическим.

Почему же цитоплазма (и кариоплазма) оказывается измененной в одних, первоначально одинаковых клетках (или хотя бы одинаковых ядрах), по сравнению с другими?

На самых ранних стадиях развития эмбриона различия в цитоплазме первоначально одинаковых клеток могут возникать под влиянием несколько различных условий, в которые они **случайно** или **закономерно** попадают в ходе развития. Такими разными условиями могут быть положение клетки на поверхности или внутри раннего эмбриона, формирование клетки при дроблении из области цитоплазмы, богатой желтком или бедной желтком, что может зависеть от действия силы тяжести, под влиянием которой более тяжелый желток опускается к нижнему вегетативному концу яйцеклетки. Бурные события в яйцеклетке после проникновения в нее в какой-то точке единственного сперматозоида также могут приводить к поляризации яйцеклетки, т.е. к возникновению различий в концентрации некоторых компонентов в толще ооплазмы в области проникновения сперматозоида и на противоположной ей стороне. Эти различия могут приводить ко включению в клетках разных частей эмбриона, в которые попала разная по составу цитоплазма, разных генов, что ведет к формированию из этих клеток, соответственно разных, частей тела.

Таким образом, иногда высказываемый профессионально неподготовленными в области биологии развития лицами взгляд, согласно которому геном в одностороннем порядке “распоряжается” ходом развития, а цитоплазма только выполняет эти распоряжения, далеко не отражает реальную картину развития. Не менее верен, пожалуй, был бы взгляд, что цитоплазма в зависимости от своих “потребностей” включает те гены, которые “ей нужны” на данном этапе развития, чтобы получить потребовавшиеся ей белки, кодируемые данными генами. Иными словами, в действительности имеет место сложный диалог между геномом и цитоплазматическими компонентами в процессе развития

Место и время дифференцировки органов и тканей обусловлено поступлением в геном клетки сигналов извне клетки по трансдукционным цепочкам веществ-передатчиков сигналов. Цепочки обычно начинаются с молекул паракринного индуктора, вырабатываемого другими клетками, и молекул-рецепторов данного индуктора в дифференцирующейся клетке. Молекулы-рецепторы способны специфически соединяться (“захватывать”) индуктор и приобретать в результате этого новые химические свойства, изменяя другие молекулы, составляющие следующее звено цепочки, которое изменяет молекулу, являющуюся третьим звеном и т.д. Кончаются цепочки активизацией элементами цепочки функции регуляторных белков, контролирующих активность гена.

ГЛАВА 15. ПРОЦЕССЫ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ ЭМБРИОГЕНЕЗА ЖИВОТНЫХ

15.1. Цитофизиологические основы морфогенеза

Из классических работ по описательной и экспериментальной биологии развития вытекает постановка вопросов о цитофизиологических механизмах реализации процессов развития на всех уровнях от **клеточного** до макроанатомического (**органный** дифференцировка). Последняя предполагает **обособление** из морфологически однородного “поля клеток”, включающего иногда более одного зародышевого листка (например, эктодермы и мезодермы латеральной поверхности эмбриона при развитии конечностей), участка в той или иной степени обособляющегося от этого поля. Это может быть локальное выпячивание (конечность), отшнуровка до полной или частичной изоляции от единого поля (хрусталик глаза, изолирующийся от эктодермы), миграция клеток в другие части эмбриона (клетки сердцевинки надпочечника и меланоциты, мигрирующие из нервного гребня), программируемая гибель клеток, промежуточных между изолирующимися зачатками, и т.д.

С “механической” точки зрения в основе всех этих процессов лежат **локальные**:

- а) **изменения адгезии клеток**, т.е. усиления или ослабление склеивания их цитомембран друг с другом (иногда до слияния клеток в многоядерные симпласты), или с межклеточным субстратом (коллагеновые волокна и пр.),
- б) **амебоидная миграция** отдельных клеток или краев их пластов,
- в) **пролиферация** (размножение) клеток,
- г) **рост объема** клеток, часто преимущественно вдоль их определенных осей, т.е. вытягивания клеток,
- д) **апоптоз**, т.е. запрограммированная гибель клеток.

С “информационной” точки зрения эти процессы обеспечиваются путем поступления позиционной информации. Подача позиционной информации нередко реализуется часто в 4 этапа:

- 1) Выделение **паракринного вещества-индуктора** клетками уже “оформленного” зачатка органа (т.е. зачатка-индуктора), действующего на часть клеток однородного поля.
- 2) “Захват” молекул паракринного индуктора **молекулами-рецепторами** тех клеток однородного поля, которые близко расположены к зачатку, выделяющему паракринный индуктор.
- 3) Активация захваченным индуктором ферментной активности молекул-рецепторов, в свою очередь, приводящая к активации других молекул реагирующей клетки, которые активируют третьи молекулы и т.д.

Так возникает цепочка (точнее разветвленный каскад) химических реакций, биологический смысл которых - обеспечение экспрессии генов, которые до этого не экспрессировались; такая форма внутриклеточной передачи сигнала от активированного рецептора к генам (или продуктам их транскрипции и трансляции), приводящая к экспрессии этих ранее “молчавших” генов, названа **цепочкой трансдукции**.

4) Непосредственное включение “молчавших” до этого генов тканеспецифичной экспрессии путем активизации **транскрипционных факторов**, т.е. белков, связывающихся с промоторами или энхансерами генов тканеспецифичной экспрессии. Часто первыми такие активизированные транскрипционные факторы включают гены опять-таки следующего круга **транскрипционных факторов**. Эти последние, в свою очередь, «включают» “главные” гены тканеспецифичной экспрессии, т.е. гены белков тканеспецифичной **функции** клеток, например, тканеспецифичного метаболизма.

В целом, определенным паракринным индукторам соответствуют определенные рецепторы, которые начинают одну или немногие варианты цепочек трансдукции, завершающиеся определенными транскрипционными факторами, включающими определенные гены. Число этих цепочек и составляющих их элементов не слишком велико не только у каждого вида, но даже у разных типов животных. Доказана даже взаимозаменяемость некоторых элементов цепочек у животных из разных типов (например, млекопитающих и насекомых). Одни и те же цепочки или элементы цепочек могут в ходе онтогенеза использоваться для передачи позиционной информации более, чем в одном морфогенезе (например, конечности и мозга). Это возможно потому, что для формирования определенной ткани или органа обычно требуется срабатывание не одной, а нескольких трансдукционных цепочек. Иными словами, срабатывание одной трансдукционной цепочки может быть **необходимым**, но **не достаточным** условием формирования определенного органа, и органы отличаются в силу **разных комбинаций** сработавших трансдукционных цепочек и только некоторые из цепочек являются общими для разных органов, тогда как другие отличаются в разных органах. Таким образом, природа “экономно использует” имеющиеся цепочки и не слишком “склонна” создавать новые или радикально менять старые, однажды возникшие у примитивных многоклеточных животных, а те новые элементы, которые все-таки создаются, представляют собой небольшие добавочные варианты-модификации элементов все тех же цепочек.

Эффекты паракринных и других индукторов, несущих позиционную информацию, могут определяться не только самым фактом появления вещества-индуктора, но и его **концентрацией** в данной части однородного поля клеток. Один диапазон концентраций включает одни гены тканеспецифичной (органо-специфичной) экспрессии, а другой диапазон другие гены. Это значит, что при воздействии разных концентраций одного и того же вещества-индуктора в однородном поле клеток будут развиваться **разные органы**. Значение этого обстоятельства очень велико. Действительно, если в ходе развития в теле эмбриона закономерно появляется градиент какого-то вещества (т.е. высокая концентрация этого вещества у одного края однородного поля клеток, постепенно понижающаяся к другому краю поля), то этот градиент может служить основой для закономерного появления разных органов в разных частях однородного поля клеток, причем в определенном порядке. Иными словами, **градиент может быть формой кодирования позиционной информации**.

По-видимому, таким образом градиент ретиноевой кислоты обуславливает качественно различные особенности строения разных участков позвоночника

(т.е. шейного, грудного, поясничного и т.д. отделов). Аналогично градиент паракринного индуктора ВМР от заднего края зачатка конечности к переднему определяет качественно различные особенности пальцев от мизинца к большому.

В результате включения генов **тканеспецифичной экспрессии** в части клеток однородного поля, они обычно так или иначе “оформляются” в особый зачаток, выделяясь из однородного поля, и часто становятся источником новых паракринных индукторов, действующих на другое однородное поле клеток. Таким образом обеспечивается последовательное разворачивание органной дифференцировки зародыша и нарастание числа “оформленных” органов. Так оформленные зачатки сетчатки глаза - выросты промежуточного мозга (глазные пузырьки) индуцируют в однородном поле эктодермы зачаток хрусталика, который, в свою очередь, оформившись (обособившись из однородного поля), индуцирует в однородном поле более поздней эктодермы прозрачный эпителий роговицы (рис. 58). Помимо позиционной информации, строго увязанной с “анатомической системой координат”, т.е. когда характерная анатомическая структура занимает строго определенное положение по отношению к другим анатомическим структурам, может возникать и более “стохастически” (случайно) локализованная позиционная информация. Например, полосы на теле зебры или пятна леопарда локализованы настолько не строго определенно, что могут не быть симметричными на левой и правой стороне тела. Раз возникнув, такая позиционная информация может породить столь же устойчивый вариант эпигенетической наследственности, как и “анатомически привязанные” варианты. Генерация такой позиционной информации рассматривается в рамках **диффузионно-реакционной модели**, о которой речь еще пойдет ниже.

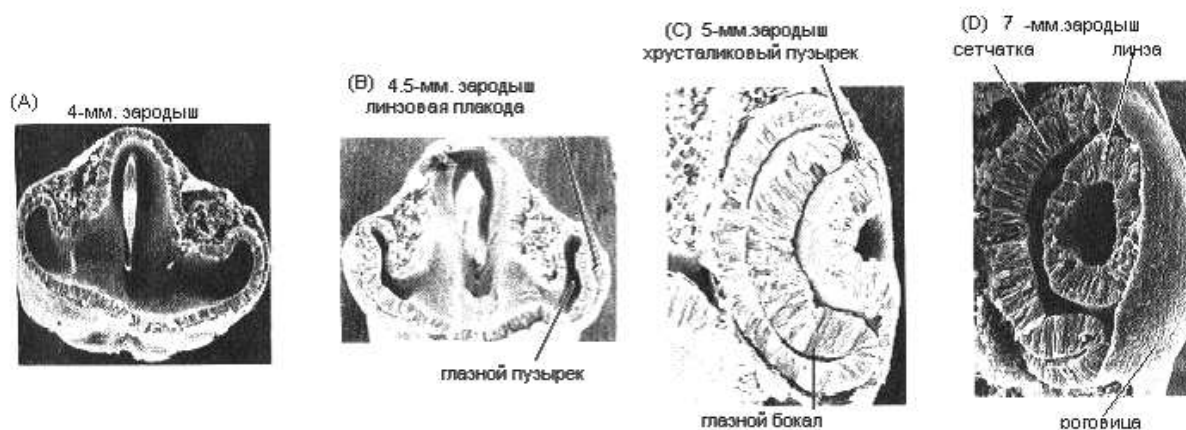


Рис. 58. Развитие глаза позвоночных. А. Поперечный срез через голову на уровне промежуточного мозга. Мозг формирует полые выросты боковой стенки - глазные пузырьки, достигающие эктодермы латеральной поверхности головы. В. Они индуцируют в эпителии эктодермы утолщение - плакodu (зачаток хрусталика). С. Плакода прогибается в сторону глазного пузырька и превращает его в двуслойный глазной бокал (внутренний слой - будущая сетчатка глаза, наружный - пигментный эпителий). D. Хрусталик сворачивается в шарик и обособляется от эктодермы, которая в месте контакта с хрусталиком позднее превращается в эпителий роговицы глаза. (По S.F.Gilbert. “Developmental biology”, 2003).

15.1.1. Клеточное деление: митоз и мейоз

Детальное описание деления клеток дается в курсе цитологии. Поэтому в этом разделе мы отметим лишь отдельные моменты этой темы, важные для биологии развития.

Управление пролиферацией (митотическим делением) клеток осуществляется при участии ключевого белка деления **циклина**, представленного несколькими разновидностями, действующими на разных стадиях митотического клеточного цикла. Необычным свойством этого белка является его способность разрушаться в процессе митоза и накапливаться после завершения митоза. По достижении критической концентрации того или иного циклина включается синтез ДНК или клетка вступает в митоз. Для реализации митоза должен образоваться сложный белок MPF, состоящий из двух элементарных белков: циклина и cdc2. Последний способен присоединять фосфат к волокнистому белку ламинину, подстилающему ядерную мембрану изнутри, что приводит к деполимеризации ламинина и распадению ядерной мембраны на мелкие везикулы (Рис.59). В результате хромосомы оказываются прямо в цитоплазме и становятся способными взаимодействовать с микротрубочками формирующегося ахроматинового веретена. Некоторые из микротрубочек вступают в контакт с хромосомами и содействуют их установлению на экватор клетки и расхождению хроматид к разным полюсам ахроматинового веретена. Микротрубочки ахроматинового веретена, не вступившие в контакт с хромосомами, содействуют, скользя друг по другу расхождению двух центриолей на большее расстояние друг от друга и вытягиванию делящейся клетки в длину, облегчая последующее разделение клетки на две дочерние. В разных тканях ритм деления клеток управляется по-разному. В одних случаях присутствуют белки, приостанавливающие движение клеток по циклу. Они являются продуктами транскрипции и трансляции особого рода генов - антионкогенов. Мутация гена, способная вызвать дисфункцию этого белка, может повести к неудержимой пролиферации клетки и развитию рака. В других тканях митотический цикл автоматически приостанавливается и для его завершения нужен сигнал, подаваемый через трансдукционную цепочку. Мутация в некоторых белках - элементах цепочки (проонкогенах) может так изменить белок или темпы его синтеза, что деления клетки будут происходить без длительных задержек, что создает шансы на развитие рака. Детали процесса регулирования клеточного деления изучаются в курсе общей цитологии.

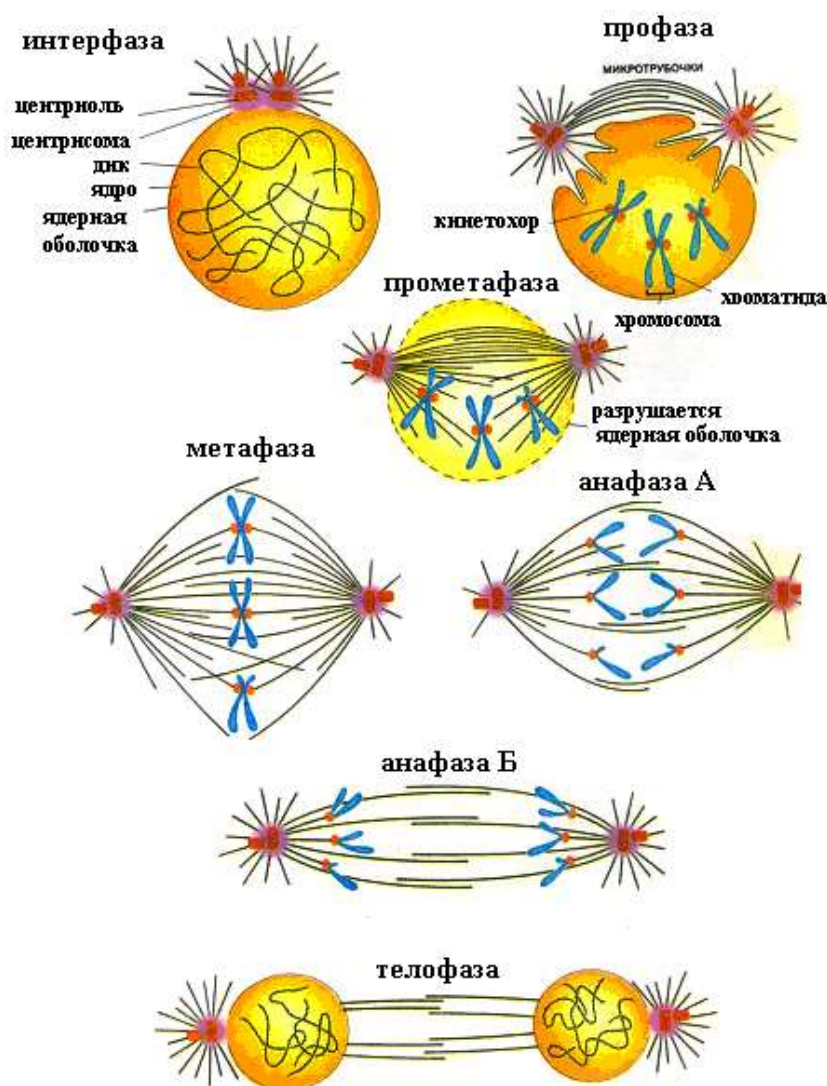


Рис. 59. Схема митоза. Расхождение центриолей → начало спирализации (укорочения и утолщения) хромосом, состоящих из 2 хроматид, соединенных в области центросомы → формирование из растущих от центриолей микротрубочек ахроматинового веретена и разрушение ядерной мембраны и присоединение микротрубочек к хромосомам в области центросом → выстраивание хромосом на экваторе ахроматинового веретена → разъединение хроматид и их движение к двум разным центриолям → раздвижение центриолей на большее расстояние с помощью микротрубочек, несвязанных с хромосомами → восстановление ядерных мембран вокруг хромосом и деспирализация хромосом.

(по Дж.Р.Макинтошу и К.Л.Макдональду "В мире науки", 1989, № 12).

Особым типом клеточного деления является мейоз. Этот вид деления характерен для половых клеток иммигрировавших в яичник, а также для клеток, мигрировавших в эпителиальные тяжи семенника по завершении ими цикла из серии синхронных митотических делений.

Одно из самых ранних отличий мейоза от митоза заключается в **незавершенности репликации ДНК** в точках хромосом, которые обеспечивают конъюгацию их с гомологичной хромосомой. Последние конъюгируют именно нереплицированными одиночными цепочками, а завершение репликации наступает после конъюгации гомологичных хромосом. Эта **конъюгация гомологичных хромосом**, одна из которых получена от отца, а другая от матери - второе важнейшее отличие мейоза от митоза. Такой способ расхождения хромосом по двум дочерним клеткам приводит к **уменьшению числа хромосом в 2 раза**. В митозе конъюгации не наблюдается, и в дочерние клетки расходится по одной хроматиде от каждой из двух гомологичных хромосом, т.е. число хромосом сохраняется без изменений. Третье различие заключается в том, что каждая дочерняя клетка получает не одну из двух идентичных хроматид бывшей хро-

мосомы материнской клетки, а целую **двуххроматидную хромосому**, которая сразу готова к новому делению уже по митотическому механизму, т.е. с расхождением двух хроматид по дочерним клеткам. По этой причине для второго деления мейоза не требуется предварительной репликации ДНК каждой хромосомы, которая необходима в обычном митозе, где она заканчивается превращением однохроматидной хромосомы в двуххроматидную.

15.1.2. Клеточная миграция.

Одним из часто встречающихся вариантов клеточной миграции является амебоидное движение. Оно сводится к формированию уплощенного отростка цитоплазмы, удлиняющегося в направлении движения клетки и “подтягивания” отставшей основной части клетки “вдогонку” за выдвигавшейся псевдоподией. Механизм выдвигание псевдоподии включает формирование цитоскелетного элемента - пучка микротрубочек, направленных от центральной части клетки в сторону конца псевдоподии. Этот пучок служит транспортером, обеспечивающим доставку к вершине псевдоподии необходимых материалов для ее продвижения вперед, в частности, материала для достройки цитомембраны в форме везикул, образующихся в задних отделах клетки в процессе пиноцитоза. Доставленные везикулы вливаются путем процесса, сходного с экзоцитозом, в мембрану псевдоподии, обеспечивая возможность локального увеличения ее поверхности при вытягивании псевдоподии (Рис. 60). Напротив, в задней части клетки площадь мембраны сокращается, что, видимо, увязывается с перетеканием цитоплазмы вперед в направлении псевдоподии, а также с сокращением подстилающих мембрану элементов цитоскелета, связанных с помощью трансмембранных белков с внеклеточным субстратом (коллагеном и др.). Транспортная функция микротрубочек базируется на присутствии на их поверхности молекул белка динеина, способных сгибаться наподобие того, как сгибаются реснички эпителия трахеи, продвигая частички пыли к глотке. Сгибание молекулы динеина осуществляется за счет расходования молекул АТФ, в отсутствие которого (в экспериментах *in vitro*) транспортная функция микротрубочек замирает. В основе морфогенезов лежат изменения надмолекулярных структур цитоскелета и клеточной мембраны. Цитоскелет образован микротрубочками, микрофиламентами, промежуточными филаментами и т.н. микротрабекулярной сетью. Среди них наибольшее значение для морфогенеза имеют микротрубочки и микрофиламенты.

Микрофиламенты имеют вид нитей диаметром 5-7 нм из актина, миозина и актинсвязывающих белков. Актинины могут составлять до 15% от общего белка, а в активно движущихся клетках до 30%. Благодаря своей ригидности актиновый гель выполняет опорную функцию и его много в кортикальном слое яйца. Микротрубочки, состоящие из глобулярного гликопротеида тубулина и белка динеина имеют диаметр 20-30 нм. Они обеспечивают полярность клеток и способствуют их движению. Микротрубочки часто связаны особыми белками с микрофиламентами.

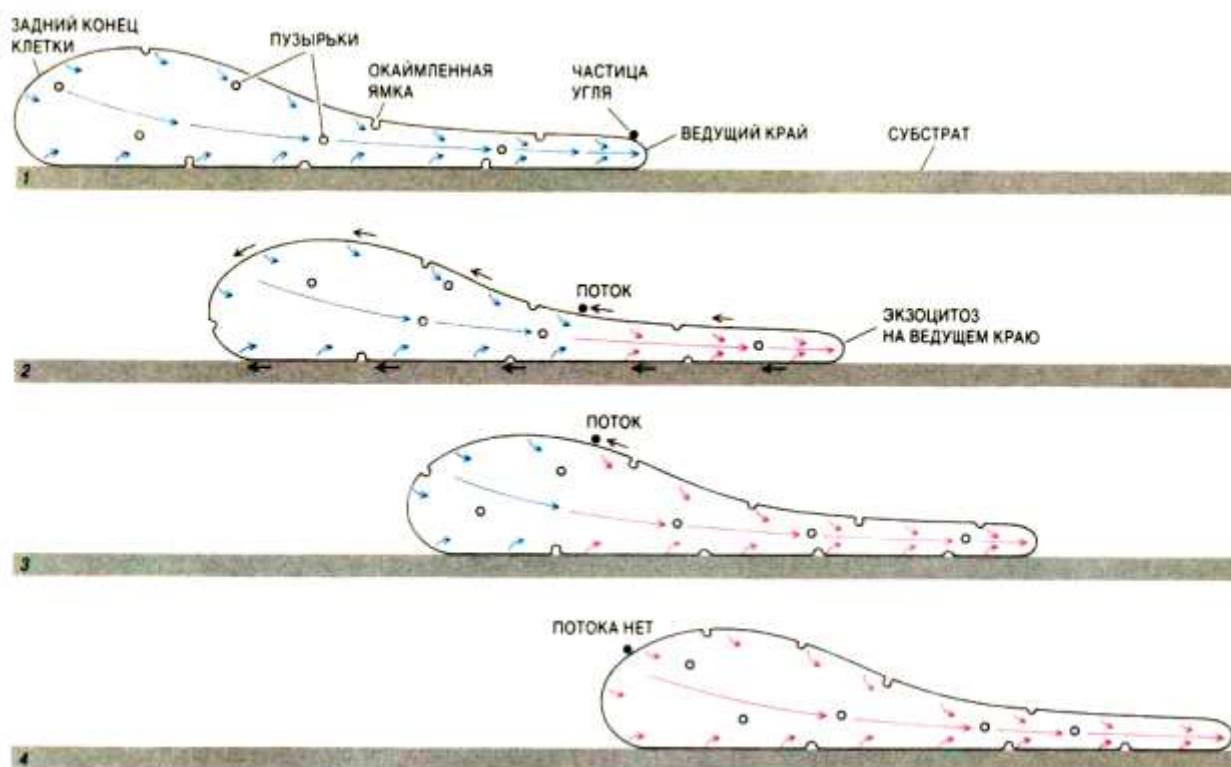


Рис.60. Амебоидное движение. Пиноцитозные пузырьки отшнуровываются в задней части ползущей амебиодной клетки от ее цитомембраны и при участии микротрубочек, усаженных динеиновыми молекулами транспортируются к переднему концу клетки, где путем экзоцитоза встраиваются в цитомембрану. Это обеспечивает увеличение поверхности цитомембраны в районе переднего конца и сокращение ее поверхности у заднего конца. По верхней и нижней поверхности клетки мембрана течет от переднего конца в сторону заднего, (метка частичкой сажи) причем поток замедляется по мере продвижения назад. (по М.С.Бретчеру “В мире науки”, 1988, N 2).

Особое значение для морфогенезов имеют клеточные контакты. Установлено, что новые клеточные контакты могут возникать и исчезать за считанные минуты. Наиболее непостоянны т.н. точечные (фокальные) контакты, способные закрепляться за субстрат или соседние клетки. Изнутри контакты ассоциированы с актином, а снаружи к ним прикрепляются фибронектиновые волокна внеклеточного матрикса (фибронексусы).

Амебоидное движение в более или менее “чистом” виде свойственно клеткам, лишенным существенной межклеточной адгезии. Примером амебоидной миграции может служить миграция клеток нервного гребня.

На стадии гаструлы у птиц клетки презумптивной мезодермы “выклиниваются” из эпителия бластодермы в бластоцель, превращаясь в амебоидные мезенхимные клетки, где и формируют мезодерму.

Однако и клетки эмбриона, объединенные в эпителий, могут обнаруживать сходные механизмы миграции даже без нарушения эпителиальной структуры. Например, на стадии гаструляции у морских ежей с помощью цейтраферной киносъемки прозрачного эмбриона удалось зарегистрировать формирование эпителием начавшей инвагинацию головной части первичной кишки очень длинных и тонких псевдоподий протянутых через бластоцель до клеток

передней эктодермы (рис. 61)



Рис.61. Средняя гастрюла морского ежа. Длинные филоподии тянутся от клеток вершины первичной кишки к противоположной стенке (анимальному полюсу) гастрюлы, по которым ориентированы тяжи клеток. (По S.F.Gilbert. “ Developmental biology”,2003).

По-видимому, продолжение инвагинации осуществляется с участием сокращения длинных псевдоподий, что помогает подтянуть переднюю часть инвагинирующей первичной кишки до передней эктодермы. Если с латеральной поверхности туловища эмбриона лягушки удалить квадратик эктодермы, то окружающие ранку клетки эпителия эктодермы быстро (менее чем за час) наползают на поверхность обнажившихся слоев мезодермы и закрывают рану. Это происходит за счет уплощения окружающих рану эпителиальных клеток (т.е. истончения слоя эпителия эктодермы) и увеличения их суммарной площади. Движение свободного края эпителия по поверхности ранки имеет много общего с амебоидным движением. Последующая ускоренная пролиферация окружающих рану клеток позволяет восстановить первоначальную толщину эпителия (обычно даже через фазу избыточной толщины эпителия над бывшей раной) за счет увеличения числа клеток эпителия в области раны.

Таким образом, клеточная подвижность свойственна не только мезенхимным амебоидным клеткам, но и клеткам эпителиальных пластов.

Особой формой клеточной миграции можно считать фантастический рост аксонов и дендритов нейронов, когда длина этих отростков может у крупных животных достигать метров (от позвоночника до кончиков пальцев). Принципиально, рост аксонов можно считать формированием очень длинных псевдоподий, однако, без последующего подтягивания несущей ядро центральной части клетки (перикариона).

Направление миграции клеток в теле зародыша, как показано в ряде случаев, обусловлено проявлениями адгезии клеток к субстратам или к другим клеткам. Направляющие субстраты - это часто волокнистые межклеточные вещества. Одним из наиболее важных классов веществ этого типа являются фибронектины. Эти белки, способные полимеризоваться в межклеточные волокна, имеют домены, соединяющиеся с белками клеточных цитомембран - интегринами. С помощью других своих доменов фибронектины соединяются с межкле-

точными волокнистыми белками типа коллагенов и фибриногенов. Это позволяет фибронектинам ориентироваться вдоль таких межклеточных волокнистых структур и служить “рельсами”, по которым движутся мигрирующие в процессе морфогенеза клетки. Таким образом цитомембраны мигрирующих клеток посредством интегринов и фибронектинов оказываются связанными с коллагеновыми и фибриновыми волокнами. В частности у лягушек миграция первичных половых клеток из задней части кишки в гонаду происходит по фибронектиновым “рельсам”. Обработка брызжейки (по которой мигрируют первичные половые клетки из задней части кишки к области зачатка гонад) антителами против фибронектинов затормаживает миграцию к гонадам первичных половых клеток.

Аналогичным образом происходит миграция клеток крыши первичной кишки (зачатка осевой мезодермы) по поверхности эктодермы, обращенной к бластоцелю и покрытой фибронектином, при гастрюляции у амфибий. При введении в бластоцель коротких пептидов, соответствующих домену фибронектина, пептид связывается с интегринными мезодермы, и предотвращает возможность их связи с самими фибронектинами. Мезодерма не вворачивается в бластоцель, а остается на поверхности гастрюлы в виде огромной пробки в бластопоре.

Совершенно особый тип миграции клеток в онтогенезе представляет собой движение сперматозоидов у большинства классов Metazoa с помощью жгутиков, расположенных на заднем конце сперматозоида.

Его важной особенностью, по крайней мере, у некоторых видов является хемотаксис, направляющий движение сперматозоидов по градиенту концентрации гиногамонов, выделяемых яйцеклеткой. Механизм движения связан со скольжением внутри жгутика собранных в трубку параллельных микротрубочек друг по другу, причем это скольжение прокатывается по этой трубке в виде кольцевой волны, приводя к изгибанию жгутика по очереди в разные стороны, чем и обусловлено проталкивание клетки вперед.

15.1.3. Клеточная адгезия и слияние клеток.

Одним из самых важных цитофизиологических механизмов формообразования является способность клеток прилипать друг к другу и утрачивать эту способность. Из общей гистологии мы знаем, что эпителиальная ткань характеризуется, в первую очередь, тем, что клеточные мембраны на большом протяжении плотно прилегают друг к другу. Это обусловлено присутствием в составе цитомембран специфических типов молекул белка или гликопротеидов, которые вступают в связи с такими же или иного типа молекулами белка в цитомембране соседней клетки на основе стереохимической комплементарности тех своих доменов (т.е. характерных участков молекулы), которые “торчат” из мембраны в окружающую клетку среду. При сближении двух клеток такие молекулы вступают в связь по тому же принципу ключ-замок, о котором не раз говорилось выше, и удерживают клетки вместе, а их мембраны параллельными друг другу. Эти молекулы клеточной адгезии (cell adhesion molecules - САМ и другие типы молекул аналогичного назначения) имеют гидрофобные домены,

позволяющие им удерживаться в фосфолипидном слое, а также домены выступающие из мембраны во внутреннюю среду клетки, где они могут вступать в связь при участии молекул-посредников с элементами цитоскелета, подстилающими цитомембрану. Это придает некоторую механическую прочность клеточной адгезии.

В принципе, чем больше молекул такого типа имеется в составе цитомембран, тем больше площадь прилегания мембран соседних клеток. При отсутствии молекул межклеточной адгезии или их малом количестве клетки не прилипают друг к другу или прилипают незначительной долей площади своей поверхности.

В этом случае клетки имеют шарообразную форму и касаются друг друга “в одной точке”, как прилегающие друг к другу бильярдные шары. Такую картину можно видеть на ранних стадиях дробления плацентарных млекопитающих, когда зародыш состоит из нескольких шарообразных клеток. Другим вариантом формы клеток с низким содержанием адгезивных молекул в цитомембране могут служить амебоидные клетки с формирующимися отростками-псевдоподиями, которые, если и касаются мембранами, то в основном концами узких отростков и, видимо, временно. Примером могут служить клетки эмбриональной мезенхимы.

По мере увеличения концентрации адгезивных молекул доля поверхности клеток, которой они склеиваются друг с другом, должна возрастать и клетки должны принимать форму кубического, а затем и высокоцилиндрического эпителия. У эмбриона плацентарных млекопитающих на стадии дробления в какой-то момент происходит такая компактизация структуры от сферических ранних бластомеров до плотного эпителия поздней морулы. В ходе развития разных зачатков эмбриона может неоднократно происходить переход из состояния мезенхимы (слабая адгезия и высокая подвижность клеток) в состояние эпителия (высокая адгезивность и низкая подвижность) и обратно. Примером такого перехода может служить образование сомитов - компактных эпителиальных шариков из мезенхимы осевой мезодермы. Этот переход обеспечивает сегментацию осевой мезодермы позвоночных (рис. 62). Позднее эти эпителиальные шарики вновь распадаются на мезенхиму уже нескольких типов, представляющих собой посегментные предшественники миобластов, остеобластов и хондробластов и соединительнотканых клеток дермы. Эпителий эктодермы на стыке презумптивной нервной трубки и презумптивного эпидермиса на стадии после замыкания нервной трубки переходит в мезенхимоподобное состояние и формирует различные структуры, в том числе эпителий сердцевин надпочечника.

В эксперименте адгезию эпителиального типа можно разрушить обработав эпителий антителами против соответствующих молекул клеточной адгезии с переводом клеток в мезенхимоподобное состояние.

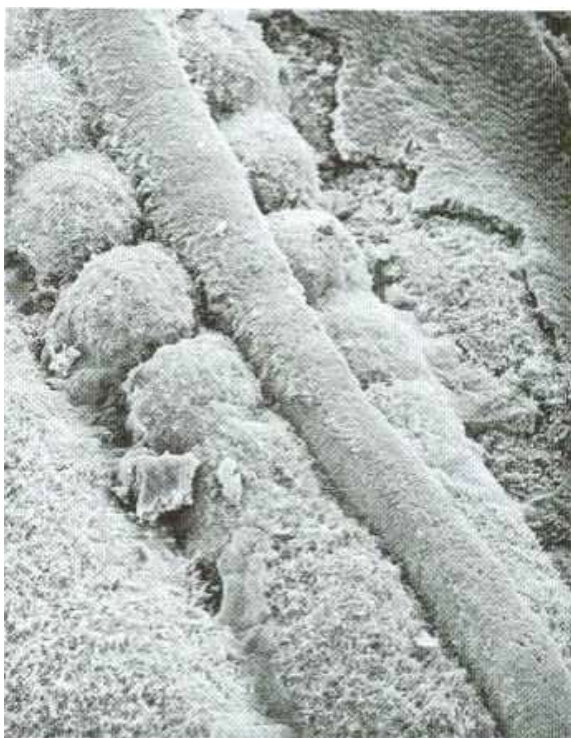


Рис. 62. По бокам от нервной трубки справа внизу видны тяжи мезенхимы которые слева вверху превратились в эпителиальные шарики - сомиты (зачатки позвонков, мышц спины, кориума кожи и др.).

Одной из самых характерных форм морфогенеза является следующая последовательность событий, преобразующая единый пласт эмбрионального эпителия:

- 1) локальное воздействие на группу клеток пласта (индукция),
- 2) изменение структуры подвергшихся индукции клеток с превращением их в плакodu, т.е. в более высокоцилиндрический эпителий, чем окружающий не индуцированный,
- 3) прогибание плакodu под эпителий и свертывание в шарик или трубку,
- 4) отшнуровывание (т.е. обособление) от окружающего неиндуцированного эпителия, т.е. дифференцировка зачатка нового органа,
- 5) смыкание неиндуцированного эпителия над углубившимся под него шариком или трубкой индуцированного эпителия.

Примерами такого морфогенеза могут служить формирование нервной трубки и хрусталика позвоночных.

По крайней мере для некоторых из таких случаев удалось показать, что ход событий в индуцированной части эпителия обусловлен появлением в индуцированном эпителии новых молекул клеточной адгезии, отсутствующих в неиндуцированном окружающем эпителии при постепенной утрате старых молекул адгезии, которые были общими у индуцированных и неиндуцированных клеток эпителия до индукции. Утрата старых молекул приводит к обособлению индуцированных клеток от неиндуцированных и сворачиванию индуцированных в трубку. В частности, когда в эксперименте с помощью трансгеноза удалось во **всех** клетках эпителия эктодермы экспрессировать гены не только старых молекул адгезии, но и тех новых, которые должны появиться в будущей нервной трубке после ее индукции, то никакого обособления нервной трубки от остальной эктодермы не наблюдалось, и она сохранила адгезивные связи с остальной эктодермой.

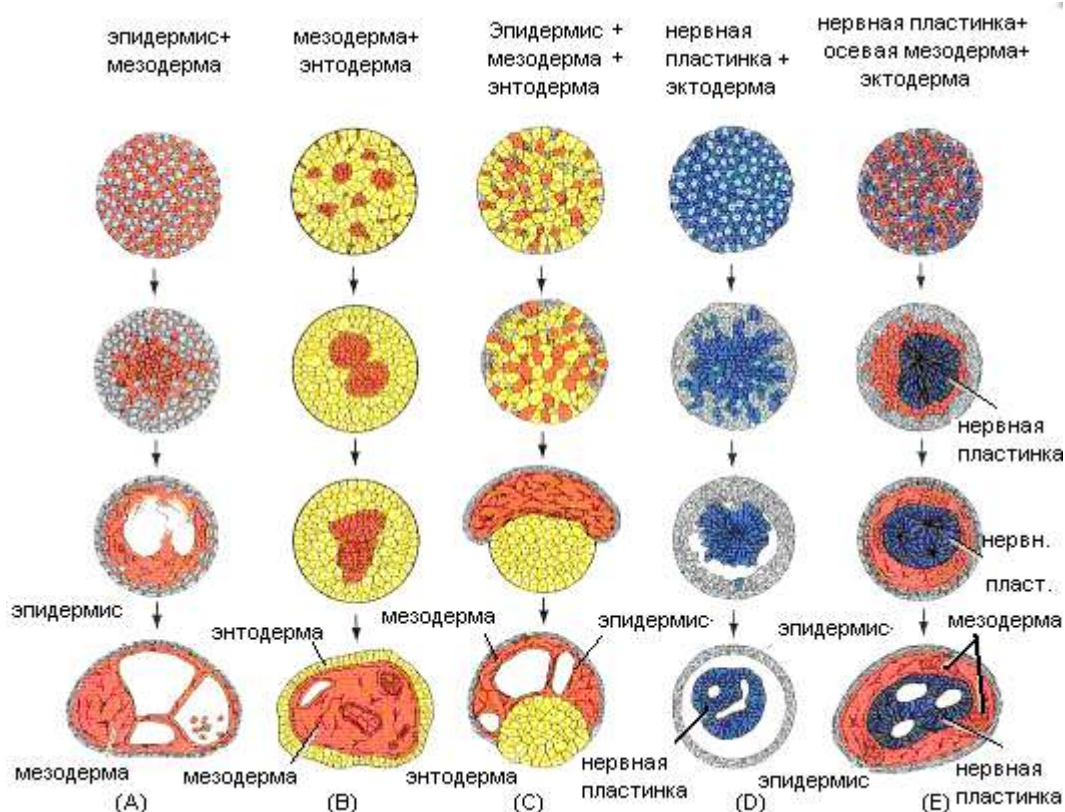


Рис. 63. Опыты Таунса и Гольтфретера по мацерации (разбивке на отдельные клетки) разных частей нейрул амфибий с помощью подщелачивания культуральной среды и их перемешивания. При возвращении в нормальную культуральную среду произошло восстановление клеточной адгезии, причем клетки благодаря большей степени адгезии к клеткам своего слоя сами разбирались по соответствующим слоям и зачаткам, причем эпидермис имел тенденцию окружать все другие ткани, включая клетки нервной пластинки также, как и он, эктодермального происхождения. Клетки мезодермы всегда уходили под слой эктодермы или энтодермы. Восстановившиеся слои клеток обнаруживали признаки тканевой дифференцировки, но правильная структура эмбриона в целом, однако, не восстанавливалась. эп - эпидермис, м - мезодерма, эн - энтодерма, н - нервная пластинка. А - Е - эволюция перемешанных клеточных мацератов после их помещения в нормальную культуральную среду : А - эп + м, В - м + эн, С - эп + м + эн, D - н + эп, Е - н + м + эп. (По S.F.Gilbert. "Developmental biology", 2003).

Огромное значение клеточной адгезии в эмбриогенезе иллюстрируется экспериментом, проделанным Таунсом и Гольтфретером. Подщелачивая среду, в которой находились нейрулы амфибий, они временно нарушили межклеточные контакты и перемешать полученную массу клеток в "кучу", состоящую из клеток эктодермы, мезодермы и энтодермы, расположенных случайным образом (Рис. 63).

После замены этой среды на обычную, клетки начинают активные амебозидные перемещения в куче, и постепенно разбираются по слоям за счет большей адгезии клеток каждого из листков друг к другу, чем к клеткам других слоев. При этом клетки эктодермы занимают, как и до перемешивания, соответственно, наружное положение, мезодермы - среднее, энтодермы - внутреннее. Таким образом, каким бы способом не достигалось расслоение бластулы на 3

зародышевых листка в норме, оно может быть нарушено, но сохраняет способность к самовосстановлению на основе миграции и реадгезии клеток. Такая реставрация зародышевых листков может сопровождаться некоторыми проявлениями последующей тканевой дифференцировки, но ориентация осей тела, по видимому, при таких условиях не восстанавливается (например, голова и хвост).

Помимо молекул межклеточной адгезии, существуют и молекулы адгезии клеток к субстрату, т.е. прежде всего к волокнам межклеточного вещества, включая некоторые типы коллагеновых волокон, фибронектины и др. Если поместить такие волокна узкой полосой на предметное стекло, то клетки, содержащие в своей цитомембране молекулы адгезии к данному типу волокон, амeboидно движутся только в пределах этой полосы вдоль направления волокон. Их псевдоподии выдвигаются вдоль этих волокон (как по рельсам) и за ними “подтягивается” сама клетка. Если обработать участок такой полоски на стекле антителами против вещества этих волокон, движение клеток в этом месте становится “броуновским”, т. е. теряет связи с полосой. Дело в том, что антитела связываются с участками молекул, к которым приклеиваются в норме молекулы адгезии к субстрату, имеющиеся в псевдоподиях, и эти молекулы более не могут “приклеивать” цитомембрану клетки к волокну (Рис. 64). Таким образом, молекулы адгезии к субстрату помогают направлять мигрирующие в ходе морфогенеза клетки в направлении той части тела эмбриона, куда им “надлежит прибыть”, как например, клеткам нервного гребня при формировании ими таких структур, как вегетативная нервная система, мозговое вещество надпочечника или пигментные клетки всех частей кожного эпидермиса.

Самая форма клеток в очень значительной степени определяется молекулами адгезии. При отсутствии существенного количества молекул адгезии как межклеточных, так и субстратных клетки должны принимать более или менее сферическую форму. При наличии субстрата и адгезивных молекул к нему клетка должна распластываться по субстрату и образовывать отростки. При наличии также и межклеточных адгезивных молекул возникает эпителиальная структура, причем эпителий тем более высокопризматический, чем больше межклеточные связи и тем меньше площадь связи с субстратом. Если возникает закономерная вертикальная зональность в концентрации молекул межклеточной адгезии, например, высокая там, где клетки соприкасаются с субстратом, и низкая у свободного конца, то клетки должны принять бутылковидную форму, т.е. расширенную округлую у свободного конца и узкоцилиндрическую у субстрата. В этом случае, если субстрат представлен тонкослойной волокнистой

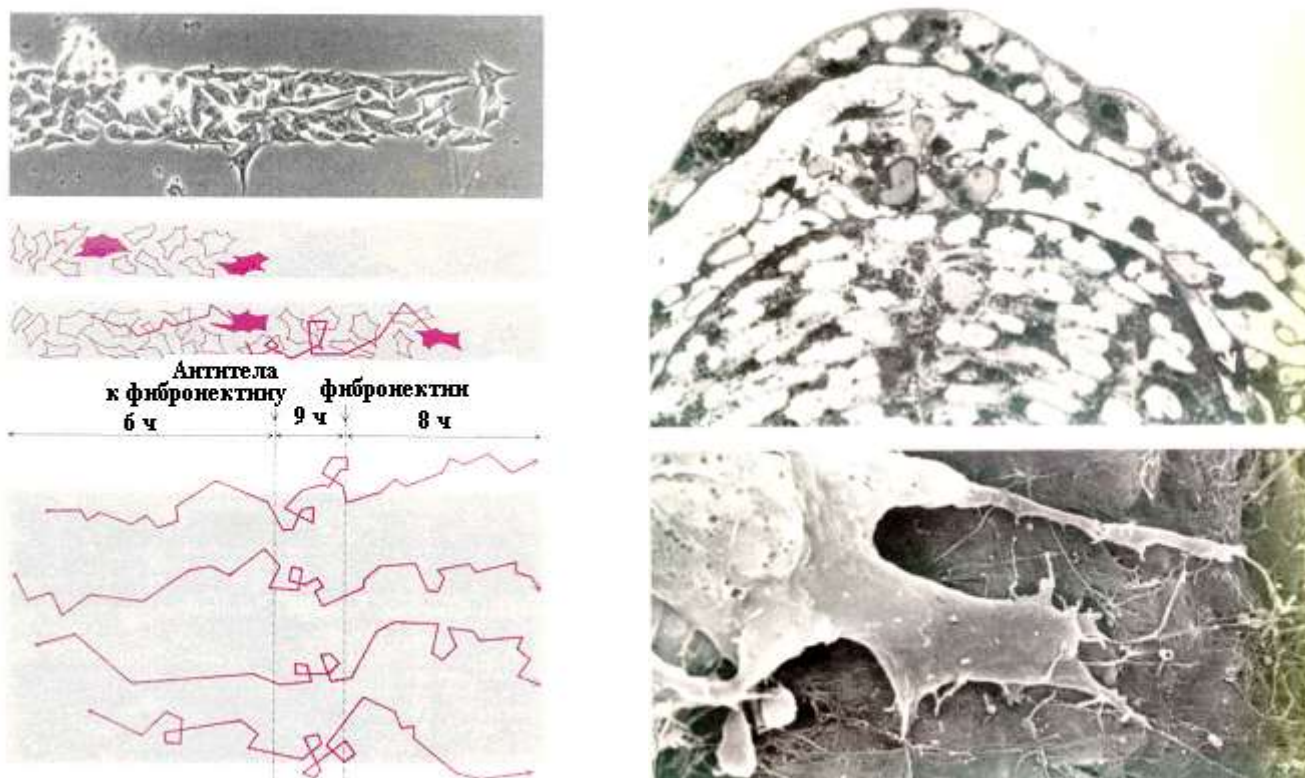


Рис. 64. Влияние фибронектина на маршруты миграции клеток нервного гребня по дну чашки для культивирования клеток. Вверху - клетки собираются на полоске фибронектина, нанесенной на дно. В середине - траектории движения двух клеток, остающихся в пределах полосок фибронектина. Внизу - аналогичные траектории, но между 6 и 9м часом культивирования полоска фибронектина была облита раствором антител против него, который после 9 часов был удален. Видно, что маршруты миграции клеток между 6 и 9 часами становились менее упорядоченными. (по Р.О.Хайнсу. "В мире науки", 1986, N 8).

мембраной (как та, что одевает раннюю гастралу некоторых видов), эпителиальный пласт должен прогибаться в сторону свободных концов клеток, так как сумма диаметров свободных концов клеток больше, чем их концов, закрепленных на мембране. Этот прогиб (инвагинация) может объяснять, например, процесс вворачивания бластодермы в начале гастрულიции.

При некоторых условиях тесное сближение цитомембран соседних клеток может вести не только к их склеиванию, но и слиянию. Такой процесс наблюдается при оплодотворении (слияние сперматозоида с яйцеклеткой), формировании остеокластов (слияние макрофагов) и образовании мышечных волокон поперечно-полосатых мышц и элементов миокарда (слияние миобластов или сателлитных клеток с мышечным волокном). В эксперименте слияние клеток может быть достигнуто пропусканием электрического разряда через прижатые друг к другу клетки, с помощью вируса Сендаи или добавления в среду полиэтиленгликоля.

15.1.4. Апоптоз

Апоптоз - органический элемент морфогенеза. Клетки несут в себе "программу" своего рода "самоубийства", которое оказывается необходимым в тех случаях, когда нужно ограничить бурный клеточный рост, прервать рост в свя-

зи с завершением этапа морфогенеза, сформировать отверстия, полости, щели в сплошном эмбриональном органе (отверстие, связывающее матку и влагалище, полость среднего уха, межпальцевые перепонки).

Масштабы апоптоза чрезвычайно велики. Например, 2/3 нейронов или их предшественников, появившихся в ходе развития мозга эмбриона человека погибают до рождения. При мутации гена, кодирующего белок, запускающий апоптоз у мышей, развивается непомерно большой мозг с нарушением его нормальной структуры и структуры черепа и этот ход развития несовместим с жизнью после рождения. В частности, при отсутствии апоптоза желудочки мозга недоразвиваются и оказываются слишком маленькими.

В одних тканях (эритроцитарная линия клеток костного мозга эмбриона в печени) и даже у некоторых видов (нематода *Caenorhabditis elegans*) физиология клеток такова, что они имеют предрасположенность по достижении определенной стадии развития автоматически подвергаться апоптозу, если в них не поступит определенный сигнал об остановке апоптоза (в эритроцитарной линии клеток это гормон - эритропоэтин). В других тканях, наоборот, для запуска апоптоза требуется сигнал извне или изнутри клетки (при ее определенном повреждении). Для разных тканей эти сигналы различны. Интересно, что маленькая нематода *C. elegans*, в норме по окончании развития состоящая из 959 клеток при наследственном нарушении механизма апоптоза включает на 15% клеток больше, что приводит к уродству совместимому однако с жизнью непосредственно по окончании развития.

Ключевым элементом самого процесса гибели клетки являются мощные протеазы - каспаза 9, каспаза 3 и каспаза 8, способные вызывать фрагментацию ДНК ядра и разрушать клеточные белки.

15.1.5. Трансдукция: передача информации между клетками и внутри клеток. Понятие о трансдукционных цепочках.

Начальные элементы трансдукционных цепочек - паракринные факторы и другие вещества-индукторы.

Напомним, что паракринные факторы (ПФ) действуют в качестве локальных индукторов, диффундируя на расстояние не более нескольких диаметров клеток. Нужно отметить две их удивительные, с первого взгляда, особенности:

1) Один и тот же ПФ может служить индуктором разных зачатков (естественно, в разных частях эмбриона или на разных стадиях его развития), что позволяет обойтись в ходе онтогенеза относительно небольшим числом ПФ,

2) У разных даже очень далеких видов встречаются идентичные или очень сходные паракринные факторы, действующие в гомологичных частях эмбрионов далеких видов и индуцирующие крайне несходные, но гомологичные структуры.

Это означает высокую степень эволюционного консерватизма ПФ (по сравнению с большей филогенетической лабильностью структуры индуцируемых ими органов).

3) Многие ПФ даже одной и той же особи составляют семейства, подсемейства и надсемейства по степени близости (гомологичности) их первичной

структуры. Эта близость может быть так велика, что разные ПФ оказываются взаимозаменяемыми в эксперименте. Однако промоторы и энхансеры при этих генах не идентичны. Поэтому данные гены экспрессируются не в одних и тех же зачатках зародыша и физиологически близкие ПФ служат индукторами совсем разных органов.

Большинство известных ПФ может быть отнесено из-за своего биохимического сходства (а, следовательно, филогенетического происхождения) к 4 семействам, причем **названия** ПФ отражают не столько функции, сколько случайности истории открытия того или иного ПФ.

Семейство FGF, или семейство факторов роста фибробластов. В состав семейства входят десятки родственных белков, действующих далеко не только на фибробласты. Они различаются по номерам, например, FGF8, FGF7 и т.д., причем исторически могут получать и другие названия, в частности, FGF7 называют нередко “фактором роста кератиноцитов”. ПФ данного семейства воздействуют на клетки, присоединяясь к белкам-рецепторам типа тирозинкиназ (эти рецепторы обозначаются FGFR, где буква R в конце аббревиатуры обозначает, что речь идет не о FGF, а о его белке-рецепторе). Молекула FGFR состоит из нескольких частей (доменов), причем один из доменов “высовывается” за наружную поверхность цитомембраны, другой ее пронизывает и удерживает FGFR в составе цитомембраны, а третий выступает внутрь клетки за внутреннюю границу цитомембраны реагирующей клетки. Первый домен специфично связывается с FGF, к которому с другой стороны присоединяется второй FGFR.

В результате формируется пара молекул FGFR, связанная мостиком из FGF. Такая “спаренная” молекула FGFR приобретает, во-первых, свойство АТФ-азы, т.е. способность расщеплять АТФ на АДФ и фосфат, а также свойство тирозинкиназы, т.е. фермента, способного присоединять этот фосфат к самой себе, а затем и белку, имеющемуся в растворенном виде в цитоплазме. После присоединения фосфата этот белок приобретает активность и запускает каскад биохимических реакций, изменяющих цитофизиологию клетки и приводящих к новому этапу ее дифференцировки.

Представители семейства FGF принимают участие в индукции мезодермы, дифференцировки кровеносных сосудов (FGF2), индукции конечности и ее частей (FGF4, FGF8, FGF10), среднего мозга и хрусталика глаза (FGF8), роста аксонов нейронов и др.

Семейство Hedgehog (дословный перевод “дикообраз” от названия мутации этого локуса у дрозофилы, делающей муху немного похожей из-за структуры щетинок на этого грызуна). У позвоночных известно 3 ПФ этого семейства, названные *sonic hedgehog* (shh), *desert hedgehog* (dhh) и *indian hedgehog* (ihh).

Ihh принимает участие в индукции структур кишечника и постнатального роста костей. Dhh участвует в индукции сперматогенеза. Shh по-видимому изучен лучше других. Известна его роль в индукции хордой мотонейронов в вентральной части зачатка спинного мозга и хрящевых клеток в составе склеротома сомитов.

Shh принимает участие в индукции лево-правой асимметрии тела куриного эмбриона, кранио-каудальной оси конечности (мизинец - большой палец), различий между частями кишечной трубки, индукции перьев и зубов.

Семейство *Wnt* (название происходит от объединения сокращений названия локуса у дрозофил *wingless* - бескрылый и локуса *integrated* у позвоночных, которые оказались гомологичными, т.е. имеющими близкую первичную структуру, указывающую на единство филогенетического происхождения). У позвоночных известно более 10 представителей этого семейства. *Wnt1* индуцирует миотом в верхней части сомита. Представители этого семейства принимают участие в индукции среднего мозга, дорзальных структур конечности (ногтей) (*Wnt7*). *Wnt4* принимает участие в индукции нефронов почки и развития гонад по женскому типу, т.е. яичников.

Надсемейство *Tgf-β*. Надсемейство включает десятки важнейших для хода развития ПФ. Надсемейство подразделяется на несколько семейств, в частности:

- Собственно *TGF-β*,
- Активина,
- BMP,
- Vg1,

а также другие белки.

Семейство *Tgf-β*. Представители этого семейства индуцируют и стабилизируют выделение межклеточных белков, в частности, коллагенов и фибронектинов, а также индуцируют деление клеток, в частности, определяющее ветвление трубочек формирующегося железистого эпителия и легких.

Семейство BMP. Его представители впервые были обнаружены как индукторы остеогенеза, хотя впоследствии оказалось, что они имеют много других функций, в частности, индуцируют сперматогенез, апоптоз (программируемую гибель клеток), участвуют в регулировании клеточного деления, индуцируют структуры почки, принимают участие в дорзо-вентральной дифференцировке структур мозга и детерминации дорзо-вентральной оси эмбриона (*Vg1*), а также передне-задней и лево-правой оси эмбриона (*Nodal*).

Семейство активина. Его представители принимают участие в индукции мезодермы на предгастрულიционной стадии развития, индукции зубов и поджелудочной железы.

В надсемейство входят и другие важные ПФ, такие как нейротрофические сигнальные вещества, вырабатываемые глиальными клетками (*GDNF*).

Вне этих семейств находятся другие ПФ, имеющие большое значение в развитии эмбриона. В частности, в индукции дифференцировки эпидермиса кожи играет важную роль эпидермальный фактор роста, в развитии печени - фактор роста гепатоцитов, в росте и развитии костного мозга и меланоцитов - фактор роста стволовых клеток, а также многочисленные факторы роста линий костного мозга от эритропоэтина до интерлейкинов.

Транскрипционные факторы и эпигенетическая наследственность.

Установление в ансамблях клеток или отдельных клеток определенной эпигенетической наследственности предполагает, как указывалось ранее, экс-

прессию определенного набора генов и репрессию других генов. Экспрессирующиеся в той или иной ткани гены можно разделить на: 1) **гены тканеспецифичной экспрессии**, т.е. экспрессирующиеся исключительно в данном типе ткани (часто их неудачно называют “тканеспецифичными”, хотя они присутствуют во всех тканях), например, ген казеина (важнейший белок молока) в молочной железе, 2) экспрессирующиеся в нескольких или во всех тканях, но с образованием белкового продукта гена (“транслята”) в несопоставимых количествах, например, актин в мышцах и лейкоцитах, 3) экспрессирующиеся в нескольких тканях, например, белки β -рецепторы гормона адреналина, у гепатоцитов и жировых клеток, 4) экспрессирующиеся во всех или почти во всех типах клеток, например, гены ферментов цикла Кребса.

Первым шагом экспрессии является обеспечение транскрипции генов, достигающееся путем присоединения к промоторной части генов и к их энхансерам транскрипционных факторов (ТФ). Сами ТФ являются белками или их соединениями с другими классами веществ. Такое присоединение к ДНК предполагает, во-первых, некоторые особенности химического строения самих белков, в частности, наличие преимущественно **основных** (слабощелочных) доменов ТФ, без чего самое присоединение водородными связями к дезоксирибонуклеиновой **кислоте** невозможно. Во-вторых, присоединение ТФ к ДНК имеет биологический смысл только тогда, когда каждый из ТФ присоединяется не к любому участку ДНК вообще и даже не к любому промотору или энхансеру, а только к одному или некоторым из них, имеющих в своем составе последовательности нуклеотидов стереохимически “комплементарные” основным доменам ТФ, что и является условием включения определенных, а не любых генов каждым из ТФ.

Один и тот же ТФ может присутствовать: а) во всех тканях и, следовательно, не имеет прямого отношения к тканевой дифференцировке, б) присутствовать в определенных частях цитоплазмы яйцеклетки, еще до проникновения туда ядра, а при появлении ядра в этой части цитоплазмы ТФ проникает в ядро, включая в работу гены **тканеспецифичной экспрессии** и предопределяя тем самым рамки эпигенетической наследственности клетки (детерминацию), в) транскрипционный фактор синтезируется или активируется, будучи заранее синтезированным, под влиянием индукции паракринным или другим фактором, причем сигнал индуктора передается через трансдукционную цепочку от рецептора к гену ТФ или его трансляту.

С другой стороны, даже ТФ, участвующие в определении варианта дифференцировки клетки (т.е. ее эпигенетической наследственности), синтезируются **не только** в клетках этой ткани. Дело в том, что для включения транскрипции любого гена обычно требуется присоединение к его энхансеру или промотору нескольких ТФ в определенных комбинациях. В одной ткани данный ТФ входит в состав одной комбинации ТФ, обеспечивающих включение набора генов данной **тканеспецифичной экспрессии**, тогда как в другой ткани тот же ТФ входит в состав иной комбинации ТФ, обеспечивающих включение генов иной **тканеспецифичной экспрессии**, чем и объясняется *тканевая неспецифичность* отдельно взятых ТФ. Тканеспецифичны лишь комбинации

ТФ. Поэтому, несмотря на наличие некоторых сходных ТФ в разных тканях, в одной из них ген, контролируемый данным ТФ экспрессируется, а в другой нет. Следовательно, присутствие одного и того же ТФ может являться необходимым, но недостаточным условием транскрипции данного гена. Для транскрипции гена необходимо присоединение к промотору и энхансеру и других ТФ **в определенной комбинации (или нескольких возможных комбинациях)**, подобно тому, как в кодовых замках установление на одном барабане правильной цифры необходимо, но недостаточно для открывания замка. Нужны правильные цифры и на других барабанах замка. Следовательно, если мы видим, что в двух клетках с разным типом дифференцировки присутствует один и тот же ТФ, необходимый для запуска транскрипции данного гена, а транскрипция происходит лишь в одном из клеточных типов, значит в одном из клеточных типов отсутствует другой(ие) ТФ, необходимый(е) для транскрипции гена. Присутствие в разных тканях одинаковых ТФ, причем в одной из них он приводит к экспрессии данного гена, а в другой не приводит к такой же экспрессии, объясняется тем, что этот ТФ необходим также для включения экспрессии какого-то другого гена. Пользуясь аналогией с кодовым замком, мы можем представить дело так, что в двух разных кодовых замках на одном и том же диске используются одинаковые цифры, но на других-то дисках у разных замков требующиеся для открытия замка цифры разные. В этом смысле синтезируемые в данной ткани комплекты ТФ можно рассматривать как **тканевые коды**.

Более того, даже наличие нужных ТФ не всегда гарантирует экспрессию гена, так как присоединение ТФ к промоторам и энхансерам может быть сделано невозможным с помощью их метилирования, т.е. замены в пуриновых или пиримидиновых основаниях ДНК атома водорода на метильную группу, что нарушает стереохимическую комплементарность ТФ и промотора. Процесс метилирования должен осуществляться тканеспецифичными ферментами - метилазами, также имеющими стереохимическую комплементарность к определенным участкам ДНК.

Из сказанного выше ясно, что разные варианты дифференцировки клетки (эпигенетической наследственности) базируются на присутствии определенной **комбинации** ТФ в клетке, которые обеспечивают возможность транскрипции определенного набора генов. Но ТФ сами являются белками, и для экспрессии их генов также требуются ТФ! Поскольку эпигенетическая наследственность клеток достаточно устойчива, должна существовать система **самоподдержания** экспрессии генов ТФ. Для разных генов ТФ возможны разные механизмы самоподдержания.

Простейший вариант - белок-ТФ связывается с промоторами или энхансерами нескольких генов, в том числе и собственного гена, т.е. кодирующего данный ТФ. Примером такого варианта **самоподдержания экспрессии гена** является ТФ MyoD, синтезируемого в мышцах.

Другой вариант - клетка вырабатывает белки, выделяющиеся из нее в окружающую среду и захватываемые из нее молекулами-рецепторами этой же (**аутокринный** фактор) или соседними клетками. Активированный таким образом рецептор через цепочку трансдукции активирует имеющиеся в клетке бел-

ки, служащие ТФ для генов других ТФ **этой же комбинации**. Повидимому таким способом самоподдерживается дифференцировка клеток Сертоли семенника млекопитающих.

Третий вариант - две разные сближенные ткани производят каждая ПФ, включающие в соседней ткани-партнере экспрессию ТФ, обеспечивающих соответствующую устойчивость их эпигенетической наследственности. Если ткани изолировать друг от друга их дифференцировка нарушается. В этом случае речь должна идти не о **самоподдержании определенной комбинации ТФ** в каждой из них, а о **взаимоподдержании** тканями друг в друге таких комбинаций ТФ. Примером этого варианта могут служить взаимная индукция

Таблица 1

Классификация транскрипционных факторов (ТФ), участвующих в формировании эпигенетической наследственности (по S.F.Gilberty , 2003)

	Семейства и подсемейства	Некоторые характерные ТФ	Некоторые регулируемые ТФ морфогенезы
	Гомеодоменные Нох POU	Ноха-1 - Нохd-13 Pit-1, Unc-86, Oct-4	Разделение тела на отделы Гипофиз, нервные связи, плюрипотентность клеток
	LIM	Lim-1, Forkhead	Голова, нервные связи
	Рах	Рах-1 - Рах-6	Мозг, глаз
	Основные спираль-петля-спиральные (bHLH)	MyoD, Mitf	Мышцы, пигментация волос
	Основные лейциновые застежки (bZip)	C/EBP, AP1	Печень, жировая ткань
	Цинковые пальцы: Стандартные	WT1, Kruppel	Почки, гонады, макрофаги, сегментация у мух
	Ядерные рецепторы гормонов	Рецепторы стероидных гормонов и ретиноевой кислоты	Вторичные половые признаки, конечности, лицевая область
	Sry - Sox	Sry, SoxD, Sox2	Первичные половые признаки (тип гонады), эктодерма

эктодермы (выделение FGF) и прилежащей мезенхимы (выделение Shh и др. ПФ) почки конечности в период ее роста и дифференцировки.

Транскрипционные факторы, как и сигнальные белки классифицируются биохимиками по происхождению, способу присоединения к ДНК и структуре на следующие “классы” (Табл.1).

Примеры промежуточных элементов трансдукционных цепочек

1) **Цепочка рецепторной тирозинкиназы (РТК).** Рецепторная тирозинкиназа - белок, встроенный в цитоплазматическую мембрану. Он имеет а) рецепторный домен, “торчащий” из мембраны наружу в окружающую клетку среду, б) домен, закоривающий (удерживающий) молекулу в толще мембраны и с) домен с протеинкиназной активностью, включающейся при соединении рецепторного домена с паракринным фактором. Таким образом, молекула несет 2 главные функции: принимает индуцирующий сигнал (“антенна” паракринного сигнала) и ферментная (протеинкиназная) функция, т.е. расщепление АТФ и присоединение высвободившегося фосфата к самой себе и другому белку - 2му члену трансдукционной цепочки, “адапторному” белку **SOS**, а также ферменту **GAP**, активирующему расщепление ГТФ, связанной с 4м элементом цепочки G-белком **Ras** (рис. 65).

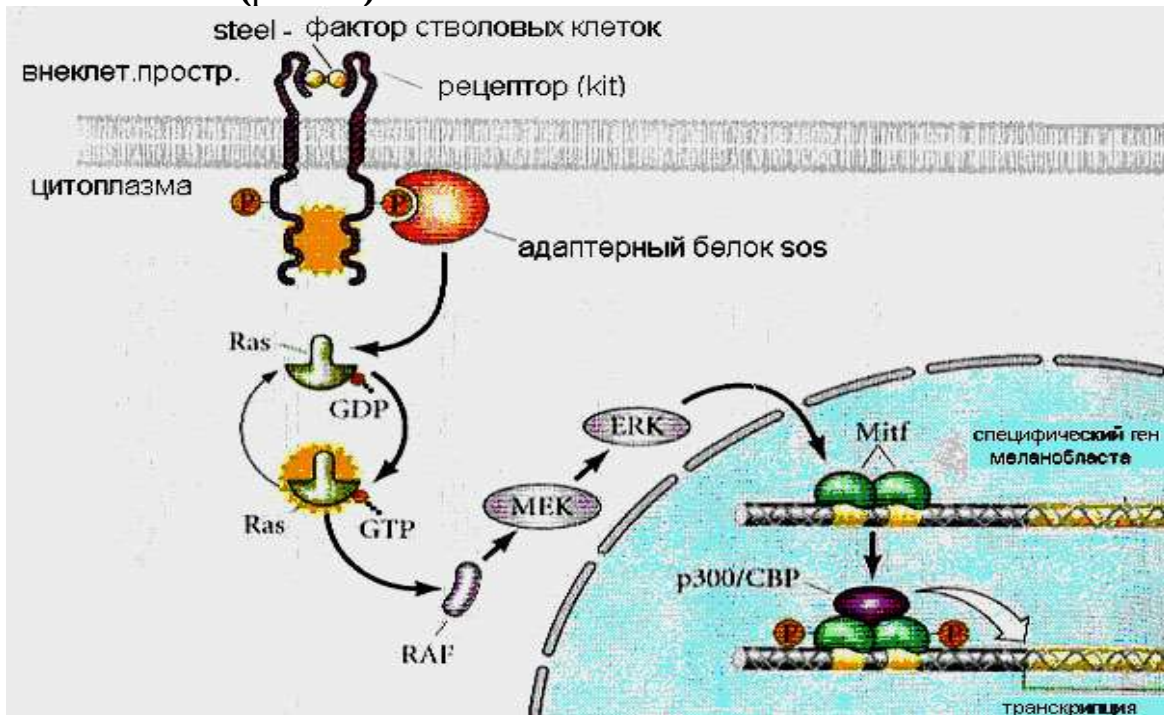


Рис. 65. Цепочка РТК (рецепторной тирозинкиназы), запускающая транскрипцию гена, специфично экспрессирующегося в меланобласте. Цепочка начинается приходящим извне клетки белком steel (фактор стволовых клеток). Он захватывается молекулами РТК (вариант Kit, кодируемый локусом white), соединяет 2 молекулы РТК, которые меняют конформацию, присоединяют фосфаты, и приобретают способность активировать белок SOS, активирующий белок Ras путем связывания его с гуанинтрифосфатом. Активированный Ras активирует протеинкиназу Raf, та активирует киназу MEK, та киназу ERK, которая входит из цитоплазмы в ядро и обеспечивает присоединение к транскрипционному фактору Mitf (кодируется локусом микрофтальмии-Mitf) белка p300/CBP, после чего Mitf включает транскрипцию гена (в частности, тирозиназы). (По S.F.Gilbert. “Developmental biology”, 2003).

Ген этого белка известен как проонкоген, т.е. как ген, некоторые мутации которого характерны для клеток целого ряда злокачественных опухолей. Зй

элемент цепочки **GNRP**, соединяясь с адаптерным белком **SOS**, приобретает способность переносить фосфат из гидролизуемого им свободного ГТФ (гуанинтрифосфата) на гуаниндифосфат (ГДФ), связанный с **Ras**. Таким образом, работа G-белка происходит по следующей схеме. Когда он связан с ГДФ, он не активен, а когда к его ГДФ присоединяется третий фосфат и он становится ГТФ, G-белок приобретает способность активировать 5й член цепочки - белок **Raf** при одновременном отщеплении от связанного с G-белком ГТФ одного из фосфатов при участии **GAP**. **Raf** фосфорилирует 6-й член цепочки - протеинкиназу **MEK**, которая фосфорилирует 7й член цепочки протеинкиназу **ERK**, проникающую в ядро и фосфорилирующую 8й член цепочки - белок, являющийся в фосфорилированном виде транскрипционным фактором, например, **Mitf**. Последний в фосфорилированном виде присоединяет 9й член цепочки - кофактор **p300/CBP** и с его помощью ацетирует гистоны нуклеосом вблизи генов тканеспецифичной экспрессии меланоцитов, с которыми связывается **Mitf**, и включает их транскрипцию. Это и предопределяет дифференцировку клеток в нашем примере в меланоциты. Компетенция клеток к индукционному воздействию (в данном случае) **фактора роста стволовых клеток** определяется присутствием в промеланобластах соответствующей разновидности рецепторов к этому фактору из семейства РТК, называемых **Kit**.

Помимо цитофизиологического аспекта исследование трансдукционных цепочек имеет и генетический аспект. Действительно, элементы цепочки - это белки или их производные. Но каждому белку соответствует ген. Мутация такого гена может иметь самые разные последствия для цепочки, а следовательно и для хода дифференцировки, причем часто одни и те же элементы цепочки в разных тканях передают разные сигналы, что должно вести к плеiotропности действия мутантного гена, т.е. к проявлению эффекта мутаций в морфогенезе разных тканей и органов. С другой стороны, если для достижения определенной дифференцировки клетки (приобретения эпигенетической наследственности) требуется прохождение соответствующего сигнала по всем элементам цепочки, то мутации любого из генов белков цепочки, вызывающие полную потерю трансдукционной функции этого белка должны вызывать нарушение соответствующей дифференцировки. Это верно, конечно, при определенных условиях, в частности, что мутация совместима с жизнью организма, что нет добавочной "обходной" цепочки трансдукции, передающий сходный сигнал, что функция белка выключена мутацией действительно полностью, а не в какой-то степени и т.п.

На примере с дифференцировкой меланоцитов удобно рассмотреть генетический аспект работы трансдукционных механизмов. Самым очевидным проявлением эпигенетической наследственности меланоцита является его способность синтезировать пигмент меланин. Ключевым ферментом этого синтеза является тирозиназа, ген которой транскрибируется в меланоцитах. Включение транскрипции идет по описанной выше РТК-цепочке. Мутации, приводящие к дисфункции белков цепочки должны делать волосы мышей белыми, лишенными пигмента. Действительно, такая мутация с потерей функции белка-гормона **фактора роста стволовых клеток** предотвращает пигментацию волос у мы-

шей, а также вызывает дисплазию костного мозга, который также нуждается в этом факторе для своего нормального развития. Этот ген был идентифицирован по мутантной окраске волос еще до исследования кодируемого им белка как ген **Steel**. Мутация с потерей функции **белка-рецептора Kit** также делает волосы белыми. Соответствующий ген также был идентифицирован до изучения роли кодируемого им белка и назван **White**. В костном мозгу для него существует иной рецептор, чем в меланоцитах, и состояние костного мозга у мышей с мутацией *white* нормальное. Известна мутация гена **транскрипционного фактора Mitf - микрофтальмия** (гипоплазия глаза), которая сопровождается опять-таки отсутствием пигмента в волосяном покрове из-за неспособности измененного мутацией белка транскрипционного комплекса Mitf включать транскрипцию гена тирозиназы. Наконец известна мутация самого **гена тирозиназы**, или **локуса C**, которая так изменяет фермент тирозиназу, что он не способен выполнять функцию катализа окисления аминокислоты тирозина, который после окисления служит сырьем для синтеза пигмента меланина, причем мутантные по этому гену животные начисто лишены пигмента и называются альбиносами. Таким образом, целый ряд генов, которые были известны сначала как гены окраски, а позднее как гены белков трансдукции в цепочке РТК оказались одними и теми же генами, и благодаря успехам молекулярной генетики и генетики развития стали понятнее механизмы влияния мутаций этих генов на морфогенетический процесс формирования окраски волосяного покрова.

2) **Трансдукционная цепочка JAK-STAT**. Другой вариант цепочки, также запускаемой паракринными факторами **FGF**, начинается с рецептора из семейства РТК, связанного с протеинкиназой JAK. Лиганд соединяет 2 молекулы рецептора в димер, JAK фосфорилирует рецептор, приобретающий, в свою очередь, протеинкиназную активность, и фосфорилирует белок STAT, что приводит к объединению двух его молекул в димер, который проникает в ядро и проявляется в нем как транскрипционный фактор, включающий транскрипцию генов тканеспецифичной экспрессии. В частности, поступающий через эту цепочку сигнал приводит к включению экспрессии гена *p21*, белок которого приостанавливает пролиферацию хондроцитов и дифференцировку их в клетки хряща во вставочных пластинках трубчатых костей и ребер при регулировании их роста. Мутация рецептора FGFR3, придающая ему способность к протеинкиназной активности и без присоединения лиганда, ведет к карликовости и недоразвитию ребер, несовместимую с жизнью после рождения из-за неэффективности реберного аппарата в процессе дыхания, а менее тяжелая мутация к ахондроплазии (карликовости из-за уменьшенной длины костей конечности). Цепочка задействована и в дифференцировке клеток крови и даже в запуске транскрипции гена казеина через воздействие гормона пролактина на секреторные клетки молочной железы.

3) **Трансдукционная цепочка Smad**. Эта цепочка служит для трансдукции сигналов, поступающих через паракринные индукторы **надсемейства TGF- β** .

В цитомембране реагирующих клеток присутствуют 2 типа белков-рецепторов. Лиганд захватывается рецептором типа 2, который после этого со-

единяется с рецептором типа 1 в димер, причем в рецепторе 1 димера происходит фосфорилирование по аминокислотным остаткам серина или треонина. После фосфорилирования димер выступает как протеинкиназа белков трансдукции Smad. Если лиганд - активин, то фосфорилируются Smad 2 и 3, а если BMP, то Smad 1 и 5. После фосфорилирования этих Smad они присоединяют Smad 4. Получившийся Smad - димер входит из цитоплазмы в ядро и служит транскрипционным фактором, включающим транскрипцию соответствующих генов.

4) **Трансдукционная цепочка Wnt - Frizzled.** Как видно из названия, лигандами для рецепторов **Frizzled** являются паракринные факторы семейства Wnt. При соединении с лигандом **Frizzled** приобретает способность активировать белок Disheveled, который после активации становится ингибитором протеинкиназы GSK-3. Эта протеинкиназа известна как активатор фермента синтеза гликогена из глюкозы - гликогенсинтазы, но в составе цепочки она выполняет совсем другую функцию. Когда синтезируются два белка APC и β -катенин они в норме вступают в ассоциацию, которая кончается деградацией β -катенина, причем устойчивости ассоциации (и, следовательно, деградации) сопутствует GSK-3. При ингибировании GSK-3 активированным Disheveled β -катенин легко отделяется от APC, входит в ядро, соединяется там в гетеродимер с белком LEF или TCF, являющимися в таком виде транскрипционными факторами для генов тканеспецифичной экспрессии, индуцируемой паракринными факторами семейства Wnt.

Другие элементы этой цепочки также имеют помимо данной трансдукционной и другие функции. Так β -катенин является одним из белков клеточной адгезии, APC через предотвращение проникновения β -катенина в ядра играет роль противоракового агента. Активированный по цепочке Disheveled может действовать не только на GSK-3, но и на Rho ГТФазу, фосфорилирующую киназу, которая в свою очередь фосфорилирует белки цитоскелета (микротрубочки, актин влияя на их сборку в элементы цитоскелета, а следовательно на форму, подвижность и полярность клетки.

Еще один вариант цепочки, начинающейся как Wnt -> Frizzled имеет продолжение в виде активирования фосфолипазы, расщепляющей фосфолипид с образованием вторичных мессенджеров, воздействующих на кальциесомы и позволяющих тем самым выход из них ионов Ca^{+2} в цитозоль.

5) **Трансдукционная цепочка Hedgehog - Patched.** В отсутствие паракринного фактора Hedgehog рецептор **Patched** связан с белком Smoothened, который является генератором трансдукционного сигнала, причем несвязанный с лигандом Patched подавляет генерацию сигнала. Когда белок Hedgehog связывается с Patched ингибирование Smoothened прекращается вследствие изменения конформации белка Patched, и сигнал генерируется. Структура дальнейшей цепочки сигнала выглядит следующим образом. Если Smoothened ингибирован, транскрипционный фактор Ci посредством белков Cos2 и Fused прикрепляется к микротрубочкам. В таком прикрепленном состоянии он расщепляется при участии белков PKA и Slimb. Отщепившаяся часть способна проникать в ядро и садиться на промоторы и энхансеры генов, зависящих от индуктора Hedgehog и

обеспечивать ингибирование их транскрипции.

При соединении Hedgehog с Patched последний более не ингибирует Smoothed и Smoothed приобретает киназную активность и, по-видимому, фосфорилирует белки Ci, Cos2 и Fused. Это мешает связыванию Ci с микротрубочками и нерасщепленный Ci проникает в ядро, соединяется с белком СВР и такой димер связывается с промоторами и энхансерами тех же генов, но выступает на этот раз как активатор их транскрипции.

Цепочка, начинающаяся с Hedgehog-Patched очень важна для развития мозга и конечностей. Мутации генов белков цепочки ведут к серьезным уродствам. Мутации гена Sonic Hedgehog у мышей в гомозиготном состоянии вызывают циклопию и грубые нарушения развития конечностей. У человека известна мутация гена GLI3, соответствующего гену Ci других позвоночных. Делеция большей части этого гена вызывает дисфункцию соответствующего белка с развитием синдрома Грига (цефалосиндактилия - одновременное поражение мозга с развитием патологически высокого лба и срастания пальцев). Делеция только активаторной части GLI3 имеет еще более тяжелые последствия: недоразвитие анального отверстия, почек, гипофиза и гипоталамуса, лишние пальцы (синдром Паллистера-Холла). Есть мутация гена Patched, которая приводит к дисфункции белка, т.е. к его неспособности ингибировать активность smoothed. Это приводит к эктопической экспрессии генов, в норме включаемых Sonic hedgehog, т.е. в тканях, где они в норме не действуют. Экспрессия этой мутации в эпидермисе ведет к развитию рака базальных клеток. Одна из доминантных мутаций этого же гена помимо множественных раков приводит к развитию певус, слиянию пальцев, аномалиям ребер и лица. Интересно, что в этой цепочке большую роль играет холестерин. Он, во-первых, нужен в процессе расщепления первоначального продукта трансляции Hedgehog с образованием аминоконцевого сегмента, который в связанном с холестерином виде, собственно, и является паракринным фактором, способным диффундировать на расстояние 30 диаметров клеток. Во-вторых, присутствие холестерина необходимо для функционирования белка Patched. Поэтому, нет ничего удивительного, что как наследственные факторы (мутация генов ферментов синтеза холестерина), так и средовые факторы (яд растений рода *Veratrum*, поедаемого овцами), подавляющие синтез холестерина способны вызвать циклопию, как и мутация гена Hedgehog.

6) Трансдукционная цепочка апоптоза. За анализ цепочки апоптоза у нематоды *Caenorhabditis elegans* С.Бреннер, Б.Хорвиц и Дж.Салстон были удостоены Нобелевской премии 2002 года. Их исследования позволили разобраться и в апоптозе у позвоночных, механизмы которого оказались гомологичны тем, которые найдены у нематоды.

В разных тканях начальные звенья цепочки могут быть различны. В частности, в качестве паракринного фактора для апоптоза в зачатке зуба (в эмалевом органе после завершения формирования коронки) выступает BMP4. Гомологию обнаруживают прежде всего средние части цепочки и сами протеазы. Протеазе (каспазе 9 или 8 позвоночных, CED-3 нематоды) предшествует в цепочке белок-активатор протеазы (у позвоночных это Araf1 в неронах и Fadd в

лейкоцитах, CED-4 нематод). Белкам-активаторам протеаз предшествуют белки-ингибиторы белков активаторов (в нейронах позвоночных Bcl2, CED-9 нематод). Следовательно, в начале цепочки запуска апоптоза должен сработать ингибитор ингибитора активатора протеазы (в нейронах позвоночных Bik, у нематоды EGL-1). Гомология нематодного белка CED-9 и белка нейронов позвоночных Bcl2 столь велика, что введение в клетки нематод Bcl2 предотвращает нормальный апоптоз в них, т.е. эти белки взаимозаменяемы.

Сигналы на предотвращение апоптоза клеток предшественников эритроцитов начинаются эритропоэтином и на начальных этапах передаются по цепочке JAK-STAT. В меланоцитах транскрипционный фактор Mitf, составляющий звено цепочки рецепторной тирозинкиназы с запуском цепочки через фактор стволовых клеток запускает не только ген фермента синтеза меланина - тирозиназы, но и транскрипцию гена Bcl2, предотвращая тем самым апоптоз меланоцитов.

Помимо паракринных индукторов существуют контактные индукторы, в качестве которых могут выступать белки, входящие в состав цитомембран клеток-индукторов, к которым у реагирующих клеток имеются рецепторы. Примером является цепочка Notch, где под влиянием лиганда - домена цитомембранного белка, "торчащего" из мембраны наружу, рецепторный белок Notch мембраны соседней клетки отделяет часть своего домена, "торчащего" в цитоплазму. Этот фрагмент входит в ядро, связывается с белком ядра CSL и превращает его в активный транскрипционный фактор. Эта индукция пускает клетку на путь дифференцировки в глию, но запрещает дифференцировку в нейрон.

Другой вариант контактного индуктора - элементы структуры межклеточного матрикса (например, коллагеновые волокна базальной мембраны) к участкам молекул которого есть рецепторы в реагирующей клетке, приходящей в контакт с матриксом. Рецепторами могут быть белки-интегрины, связывающиеся одновременно с внеклеточными волокнами (например, фибронектинами) и внутриклеточными "подмембранными" волокнами актина (через белок актинин или талин). Значение межклеточных субстратов в индукции дифференцировки показано для гепатоцитов, семенника и молочной железы, а также для подавления апоптоза в некоторых тканях, например, в хондроцитах. Апоптоз хондроцитов грудины цыпленка можно спровоцировать, блокируя антителами связь интегринов с внеклеточным матриксом. Контакт между клетками культуры молочной железы и волокнистого внеклеточного белка ламинина индуцирует транскрипцию генов дифференцировки, в частности гена β -казеина и гена белка p-21, подавляющего митозы.

Вещества-индукторы могут присутствовать и в цитозоле клеток-индукторов, оказывая индуцирующее влияние через щелевые контакты, т.е. через "трубочки", проходящие сквозь мембраны обеих соседних клеток и ведущие из цитозоля одной клетки прямо в цитозоль другой клетки. Эти трубочки построены из белков коннексинов, специфичных для разных тканей. Выключение одного из генов (коннексина-43) белков щелевых контактов у мышей приводит к заполненности правого желудочка сердца тканью и неспособности его прокачивать кровь через легкие, а следовательно к немедленной смерти ново-

рожденного мышонка, у которого одновременно наблюдаются и дефекты уха. У 8-бластомерного мышиноного зародыша обработка его антителами против коннексинов приводит к сохранению низкой адгезии клеток (нет компактизации клеток эмбриона). Клетки продолжают делиться, но развитие эмбриона (дифференцировка) прекращается. Введение антисмысловой РНК коннексинов в один из 8 бластомеров мышцы препятствует формированию им щелевых контактов и приводит к исключению его из состава клеток развивающегося эмбриона. Введение антител против коннексинов в один из 8 бластомеров дробящейся зиготы лягушек не исключает эту клетку из состава эмбриона, но ткани, формирующиеся в эмбрионе из этого бластомера оказываются анатомически дефектными (в частности не развивается глаз, на той стороне промежуточного мозга, которая сформировалась из данного бластомера, тогда как на противоположной стороне тела глаз нормально сформировался из симметричного интактного бластомера).

д) Диффузионно-реакционная модель дифференцировки.

Выше мы упоминали о том, что наряду с дифференцировкой строго привязанной к конкретному месту на теле животного встречается и дифференцировка стохастического характера. Примером могут служить пятна и полосы в волосяном покрове млекопитающих, не привязанные четко к определенной анатомической позиции на поверхности тела. Они могут быть асимметричными на левой и правой половинах тела (леопард, зебра). Их механизм индукции связывают с диффузионно-реакционной моделью Тьюринга.

Суть ее можно представить на неплохо изученной живой модели миксомицетов. Жизненный цикл миксомицетов выглядит следующим образом. На поверхность пня, где активно размножаются бактерии и постепенно разрушают ее, ветер заносит одноклеточные споры миксомицетов, из которых выходят амeboидные вегетативные клетки, фагоцитирующие бактерий и делящиеся по мере роста на новые и новые дочерние клетки, продолжающие питание амебами. Когда размножившиеся амобы уничтожают окружающие их бактерии, они начинают голодать и приступают к формированию плодового тела. Какие-то единичные амобы разбросанные по поверхности пня первыми начинают испытывать голод. Это служит для них сигналом начала “организации” совместно с окружающими их клетками-амебами плодового тела. Первые голодающие клетки выделяют во внешнюю среду циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) (рис. 66), несущий две главные функции: 1) он привлекает амоб, т.е. служит для хемотаксиса, заставляющего амоб ползти в ту сторону, откуда пришла волна диффузии, т.е. к первой амобе отреагировавшей на голод, 2) он заставляет амоб, принявших этот сигнал, в свою очередь, выделять цАМФ, т.е. “ретранслировать” полученный сигнал. После короткого периода выделения сигнала клеткой наступает пауза в выделении сигнала и через несколько минут выделение возобновляется. Голодающие амобы выделяют и фермент, разрушающий цАМФ, что предотвращает насыщение среды вокруг амоб этим аттрактантом. Это помешало бы амобам устойчиво ориентироваться в своем движении в сторону первой клетки подавшей сигнал. Вслед за волной фермента, разрушающего цАМФ, вновь приходит волна “ретрансляции цАМФ” со стороны

амебы, первой “издавшей” сигнал, что позволяет остальным амебам вновь сориентироваться в ее направлении и вновь временно потерять его после

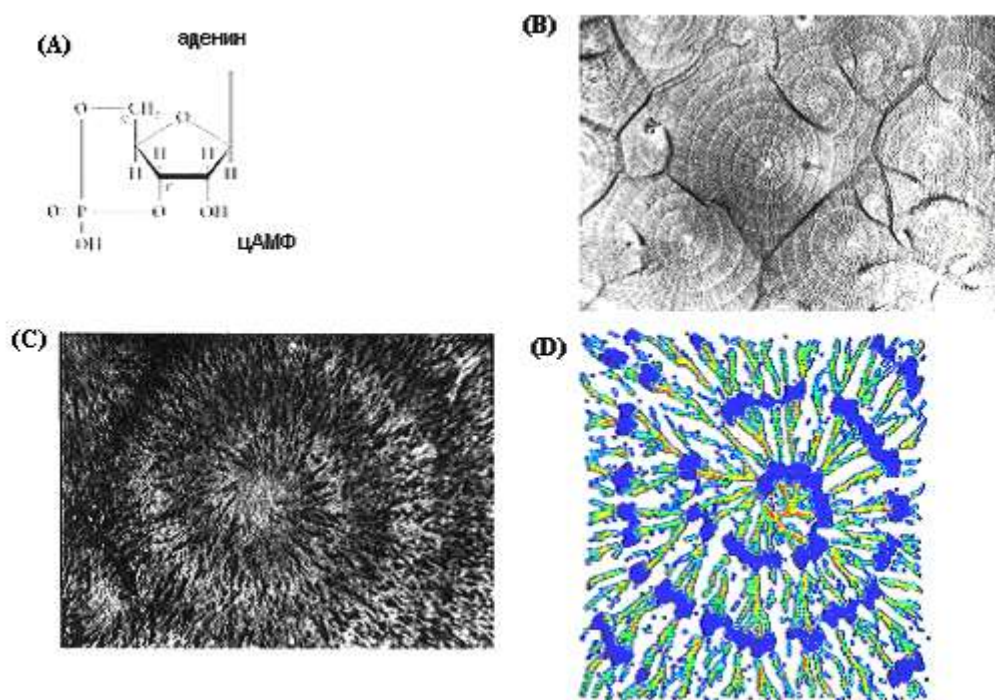


Рис. 66. Механизм агрегации (сползания) миксамеб. А) Циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) - индуктор сползания амеб, собственной “ретранслированной секреции” и хемотаксической ориентировки амеб.

В) Авторадиографическая картина волн диффузии и деградации цАМФ вокруг центров сползания миксамеб, полученная путем приложения к популяции амеб на субстрате плотной фильтровальной бумаги, пропитанной цАМФ, меченным радиоактивным изотопом. В местах, где присутствовала высокая концентрация природного цАМФ, радиоактивная метка оказалась разбавленной (светлые полосы), а где он отсутствовал (был разрушен или поглощен клетками) осталась высокой (узкие черные полоски). С) Внешне сходная структура на фотографии популяции амеб. Светлые полосы - радиально ориентированные ползущие амебы, а темные полосы прекратившие движение “дезориентированные” в отсутствии градиента цАМФ амебы. D) Компьютерная модель волн диффузии цАМФ и ориентации амеб. (По S.F.Gilbert. “Developmental biology”, 2003).

наступления паузы в секреции цАМФ. В пространстве вокруг амебы - инициатора в каждый данный момент можно видеть как бы концентрические чередующиеся слои амеб сориентированных на клетку инициатор и дезориентированных, по отношению к ней. Слой с ориентированными амебами содержит градиент концентрации цАМФ от клетки-инициатора наружу, а слой дезориентированных амеб представлен областями, где наступила пауза секреции цАМФ, и он был разрушен ферментом.

Все это приводит к сползанию амеб с определенной части поверхности пня к этой амебе-инициатору. Здесь в них включается синтез белков клеточной адгезии и они склеиваются в целостное колбасовидное образование, способное ползти уже как целое некоторое время в сторону одного из концов. После этого “колбаса” становится вертикально, и из части верхних клеток образуются споры, а остальные служат ножкой этого плодового тела.

Детальное изучение развития миксомицетов представляет собой исклю-

чительные интерес для общей биологии развития как модель целого ряда сторон морфогенеза. Укажем только на некоторые из них.

1) Организм - плодовое тело может рассматриваться как спонтанно развивающаяся химера, так как клетки, из которых он формируется, не являются клоном, происходящим из единственной клетки-зиготы, и вполне могут иметь генетические отличия друг от друга в рамках тех, которые существуют между разными особями одного вида. Действительно, ведь споры на пень могли прилететь из разных плодовых тел.

Впрочем, тоже можно было бы сказать и о других грибах, образующих плодовое тело из “срастающихся” гиф, каждая из которых является клоном, но разные гифы происходят из спор, генетически не обязательно идентичных друг другу.

2) Интегрированная “организменная” структура - плодовое тело образуется из первоначально самостоятельных независимых организмов - амёб, которые складываются в многоклеточный организм вторично, и тем не менее претерпевают, хотя и относительно простую, но дифференцировку на разные ткани.

3) Где именно на поверхности пня возникнут центры агрегации амёб, а, следовательно, и места образования плодовых тел, определяется стохастически (случайно).

4) Механизм агрегации амёб в плодовое тело включает в себя секрецию стохастически детерминированными клетками-инициаторами хемотактического аттрактанта (он же индуктор ретрансляции сигнала соседним амёбам) и ингибитора этого индуктора, т.е. проявление в популяции амёб важных сторон реакционно-диффузионной модели Тьюринга.

На достаточно крупном пне возникают несколько таких центров, куда сползаются амёбы, и, соответственно, образуется несколько плодовых тел, в которые собираются все амёбы, питавшиеся на пне.

Применительно к окраске поверхности тела животных приложение модели Тьюринга сводится к следующему. В эмбриональной коже стохастически возникают очаги опережающего созревания клеток (возможно даже отдельных клеток) для перехода на очередную новую стадию дифференцировки. В этих очагах начинается синтез индукторов, диффундирующих из этих очагов и включающих способность участков кожи, куда они проникли, поддерживать в дальнейшем пигментацию волос на них. Одновременно, вернее, с небольшой задержкой эти же очаги выделяют ингибитор пигментации, который диффундирует быстрее, обгоняя диффузионную волну индуктора. В тех областях, куда волна индуктора приходит позже, чем волна ингибитора, синтез меланина предотвращается или ослабляется (вместо черного пятна или полосы формируется белый или желтый участок). Если отношение скоростей диффузии индуктора и его ингибитора к площади кожи эмбриона (естественно, на стадии, когда эта диффузия имеет место у эмбриона), очень велико, то черные пятна окажутся крупными и немногочисленными. В противном случае появляются многочисленные мелкие пятна. Если форма зачатка кожи или части этого зачатка на момент диффузии узкая и длинная, индуктор успевает распространиться влево

и вправо по всей полуокружности тела, и формируются не пятна, а полосы. Немало пятнистых животных имеют полосатые хвосты (пятна на широких участках шкуры переходят в полосы на узких) (рис. 67).

Возможный список процессов морфогенеза, которые можно было бы истолковать на базе модели Тьюринга, включает такие, как образование волосяных фолликулов, нефронов и др. Мы знаем, что индуктором волосяного фолликула даже во взрослой коже, лишенной волос, может быть соединительнотканый сосочек луковицы, пересаженный под эпидермис. Развитие самого сосочка происходит путем местного уплотнения популяции



Рис. 67. Реальные варианты структуры полос и пятен на хвостах млекопитающих (в левых частях рисунков) и компьютерные модели на основе математической модели Тьюринга (в правых частях рисунков) (по Дж.Д.Марри “В мире науки”, 1988, N 5).

мезенхимных клеток кожи. Почему же уплотнение произошло именно в тех местах, где мы видим сосочки, а не в промежутках между ними? По всей вероятности, и здесь раньше, чем в других местах появилась клетка-инициатор, хемотаксически или иным способом, привлекающая соседние клетки, которые сползаются к ней, причем какая из клеток мезенхимы раньше других “созревает” для подачи хемотаксического сигнала определяется стохастически (является делом случая).

Стохастическая структура цветных пятен может возникать и под влиянием генетических различий между клетками или из-за действия относительно стабильных эпигенетических различий. В первом случае речь идет об искусственно создаваемых путем соединения генетически отличающихся друг от

друга по генам окраски эмбрионов в единый химерный “четырёхродительский” организм (опыты Минца). В этом случае стохастично (случайно) только, какая из закономерно образующихся полос является клоном первичных пигментных клеток с разным генотипом по окраске, так как меланоциты полосы являются потомками единственной клетки, которая может принадлежать либо белой, либо пигментированной линии мышей. Возможно и спонтанное возникновение клона клеток эмбриона с мутацией гена масти и образованием пятна или полосы.

Эпигенетически мозаичные клоны могут возникать за счет генетического импринтинга (например, метилирования ДНК X-хромосом отцовского происхождения или материнского происхождения в разных клонах). Дело в том, что у плацентарных млекопитающих на ранних эмбриональных стадиях развития женского организма, когда общее число клеток не превышает нескольких сотен, каждая из клеток несет, как известно, 2 женские половые X-хромосомы: одну от отца и одну от матери, причем обе потенциально функциональны. Позднее в каждой клетке происходит метилирование ДНК одной из двух хромосом, причем большая часть генов метилированной хромосомы оказывается, тем самым, инактивированной в плане транскрипции. Которая из двух X-хромосом инактивируется в той или иной клетке раннего эмбриона: материнская или отцовская, является делом случая. Каждая из клеток раннего эмбриона впоследствии, размножаясь, образует клон, причем клетки клона сохраняют метилированность (инактивированное состояние) той же X-хромосомы, которая была инактивирована у клетки-основателя клона. В этом смысле женский организм плацентарных млекопитающих можно рассматривать как мозаичный, так как он состоит из смеси клонов с активной отцовской и с активной материнской хромосомой. Мужские организмы, клетки которых содержат только одну (материнскую) X-хромосому, такого мозаицизма лишены. X-хромосома, по крайней мере у кошек и, возможно, морских свинок несет ген, участвующий в детерминации окраски волосяного покрова. Это видно из существования кошек самок так называемой черепаховой масти, т.е. масти, включающей желтые и черные пятна (часто наряду с белыми пятнами). Самцы такой масти не встречаются (т.е. они либо черные, либо желтые). Это связано с тем, что у самок на разных участках волосяного покрова присутствуют разные клоны клеток: с активной отцовской X-хромосомой или с активной материнской X-хромосомой, несущими аллели разной масти (желтой или черной). Локализация пятен на шкуре отражает случайности распределения клонов клеток с активными материнскими или отцовскими X-хромосомами по поверхности шкуры. Для понимания стохастического характера позиционной информации в этом случае важное значение может иметь опыт клонирования трехцветной (черепаховой) окраски кошки, аналогичный тому, который свелся к получению овечки Долли.

Хотя родившийся котенок также оказался трехцветным, расположение желтых и черных полос не соответствовало таковому кошки, от которой взято ядро. Это означает, что ядро при переходе в состояние дедифференцированности потеряло и клональную дифференцировку по активности только одной из двух хромосом. Позднее соответствующие клоны возникли заново (так как у

котенка вновь проявились и желтые, и черные пятна). Это означает, что у котенка заработала не только X-хромосома, которая была активна в пересаженном ядре, но и X-хромосома от второго родителя, несущая аллель иной масти. С другой стороны, распространение по коже клонов с разными активными X-хромосомами, у котенка вновь было стохастическим, несвязанным с распространением желтых и черных пятен и кошки, от которой взяли ядро. Поэтому рисунок полос котенка и наследственно идентичной ему взрослой кошки не соответствовали друг другу (Рис.68), пройдя путь независимого стохастического распределения по поверхности кожи в ходе онтогенеза.

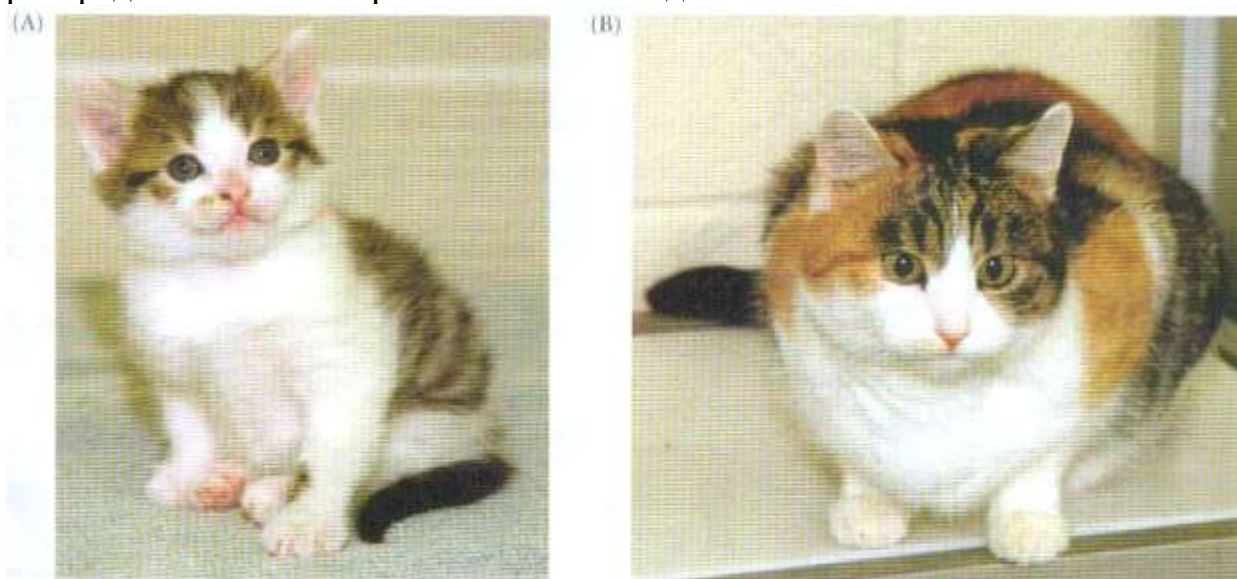


Рис. 68. Котенок (А), полученный путем клонирования кошки (Б), “черепаховой масти” (т.е. имеющей участки волосяного покрова, окрашенные в черный, желтый или белый цвет) по распределению пятен разного цвета не идентичен кошке (нет желтого пятна правее и выше правого глаза и в районе дорзо-латеральной поверхности туловища над левой верхней конечности. (По S.F.Gilbert. “Developmental biology”, 2003).

15.2. Цитофизиологические основы клеточной дифференцировки и эпигенетической наследственности клетки. Специфическая роль генома в развитии

Разные исследователи подходят не одинаково к понятию клеточной дифференцировки. Одни подчеркивают закономерное появление морфологических и цитохимических отличий в части клеток первоначально однородной популяции, позволяющих их отличить от остальной части популяции. Другие делают акцент на утрате способности клетки к делению как признака окончательной дифференцировки и т.д. Большинство однако, согласно в том, что дифференцировка в определенном направлении предполагает определенный набор экспрессирующихся генов, специфичный для каждого направления дифференцировки, а, следовательно, на присутствие в клетке определенного “ансамбля” белков, обеспечивающих возможность осуществления клеткой определенных функций. Во многих случаях клеточная физиология обеспечивает устойчивое самоподдержание (хотя бы периодического) экспрессии этого специфического для типа клеточной дифференцировки набора генов. Эта способность к самоподдержке

нию экспрессии лишь определенного набора генов нередко называют эпигенетической наследственностью клеток.

15.2.1. Общие представления о молекулярно-биологической основе функционирования генов.

Структурной единицей наследственности является ген, а совокупность генов, свойственных данному организму называют геномом. Понятие ген родилось задолго до появления молекулярной генетики. Однако, благодаря успехам последней, да и успехам классической генетики и цитогенетики стало куда более конкретным (детали структуры гена). С другой стороны, оно стало более размытым (некоторая неопределенность границ гена, в частности, считать ли промоторную нетранскрибируемую область, служащую для регулирования транскрипции, и транскрибируемые, но не транслируемые интронные участки частью гена). С одной стороны, мы знаем, что ген представляет собой участок очень длинной молекулы ДНК, состоящей из двух нитей ковалентно связанных нуклеотидов, причем обе нити совместно образуют двойную спираль и удерживаются друг около друга в определенном положении (аденин одной нити против тимидина другой, а цитозин против гуанина) более слабыми, чем ковалентные, связями. Некоторые сегменты одной из нитей (“антисмысловой”) способны после разъединения этих слабых связей служить матрицей для синтеза рибонуклеиновых кислот (“процесс **транскрипции**”), в том числе информационных РНК, служащих позднее матрицами для синтеза молекул белка (процесс “**трансляции**”). Порядок рибонуклеотидов (в таких синтезированных на антисмысловой нити ДНК) РНК оказывается сходным с порядком дезоксирибонуклеотидов во второй (“смысловой”) нити ДНК (с поправкой на замену тимидина в ДНК на урацил в РНК). Поэтому синтезированная РНК также называется смысловой. Смысловая ДНК служит матрицей для синтеза копии антисмысловой нити ДНК. Соответственно, антисмысловая нить ДНК, наряду с ранее упомянутой функцией в процессе транскрипции, служит также матрицей для синтеза смысловой нити ДНК. Результатом синтеза при помощи смысловой нити ДНК антисмысловой, а при помощи антисмысловой нити синтеза смысловой является копирование всей ДНК обоими нитями (процесс “**репликации**”).

У некоторых бактерий и вирусов возможна транскрипция и смысловой нити ДНК с образованием антисмысловой РНК, которая комплементарно связываясь со смысловой РНК, блокирует ее трансляцию, чем достигается, в частности, регулирование скорости трансляции (т.е. синтеза белка) в клетке.

Таким образом, если под геном понимать только транскрибируемую его часть, то с точки зрения физиологии клетки каждый ген имеет всего две основные функции, каждая из которых передается одним термином (правда, весьма емким): **репликация** и **транскрипция**. При этом участие в транскрипции принимает только антисмысловая нить ДНК, и, следовательно, только она является геном. В то же время к самокопированию способны только смысловая и антисмысловая нити ДНК в совокупности. В этом смысле геном является только 1я + 2я нити. Детально явления, соответствующие этим терминам излагаются в курсе молекулярной биологии. Мы же обратим внимание лишь на некоторые

моменты, наиболее существенные с точки зрения понимания онтогенеза.

Репликация - процесс самокопирования ДНК, т.е. синтез ДНК из раствора нуклеотидов при непосредственном участии уже имеющейся ДНК, определяющей порядок расположения полимеризующихся в новую молекулу ДНК нуклеотидов раствора. Собственно, репликация ДНК происходит не в границах каждого гена, а в более длинных, чем ген, участках молекулы ДНК. Молекулой ДНК, по существу, является вся ДНК хромосомы, длина непрерывной нити ДНК которой у человека измерялась бы в распрямленном виде сантиметрами. Эти крупные участки ДНК хромосомы, подвергающиеся репликации, включают как ряд генов, так и другие части хромосомы, генов не содержащие. Участки разделены особыми сегментами ДНК хромосомы, называемыми точками начала репликации. В каждой хромосоме их обычно несколько и не все гены реплицируются одновременно. Сам процесс репликации осуществляется при участии крупных белковых молекул фермента ДНК-полимеразы путем разъединения смысловой и антисмысловой нитей ДНК, присоединения к ним свободных нуклеотидов нуклеоплазмы, комплементарных составляющим нить нуклеотидам, и сшивания их в новую нить ДНК-полимеразой, движущейся по мере этого сшивания вдоль уже существующей нити от стартовой точки репликации до следующей такой точки.

Для ранних стадий эмбриона характерно деление всех составляющих его клеток, причем, каждая клетка получает по полному диплоидному комплексу всех хромосом¹. Но, чтобы обе дочерние клетки предшествующей им материнской могли получить по диплоидному комплексу всех хромосом, в материнской клетке с каждой из хромосом должна быть снята копия, т.е. пройти репликация.

Не считая стадии дробления оплодотворенной яйцеклетки - зиготы (когда размеры клетки по мере деления соответственно уменьшаются), перед делением клеток в них должно удвоиться и содержание всех других молекул от воды до белков и РНК. Это удвоение молекул не носит, однако, характера самокопирования. Структурно неспецифичные для вида животных и индивида молекулы (вода, глюкоза и т.п.) поступают в готовящуюся к делению клетку извне в готовом виде или образуются в клетке на основе более или менее универсальных для всех видов биохимических процессов. Видоспецифичные и специфичные для индивида молекулы (такие биополимеры как информационные РНК, белки, некоторые углеводы, определяющие группу крови) требуют для своего образования структурной информации, заключенной вне этих молекул. Иными словами, в молекуле белка или РНК многоклеточных организмов информация об их структуре **не содержится в форме, которая может быть использована для их самокопирования**. Другое дело ДНК. Именно структура молекулы ДНК пригодна для самокопирования. Конечно, самокопирование - репликация идет при участии других молекул, в основном фермента ДНК-полимеразы, которые не определяют сами по себе, однако, конкретную структуру ДНК, т.е. информационный компонент генов - порядок расположения А-Т и Г-Ц пар в молекуле.

(¹ Исключение составляют только немногие виды, где в клетках, не являющихся предшественниками половых клеток, часть хромосомной ДНК “выбрасывается” из ядер и дегенерирует - “диминуция хроматина”.)

Одна и та же полимераза обеспечивает копирование **разных ДНК**, а порядок нуклеотидов во вновь синтезируемых ДНК определяется последовательностью нуклеотидов в уже существующей ДНК материнской клетки и никак иначе.

Но, если *самокопирование* структуры РНК, белков и др. видоспецифических молекул невозможно, то какие молекулы несут эту структурную информацию, без которой не может быть синтезирована ни одна из молекул РНК и белка? Как известно, молекулы РНК синтезируются, как и молекулы ДНК, *непосредственно* на молекулах ДНК (процесс **транскрипции**), которые, тем самым являются и носителями структурной информации не только о самих себе, но “по совместительству” и о структуре РНК. Молекулы же белка синтезируются на молекулах информационной РНК (процесс **трансляции**) с участием рибосом (играющих роль “аминокислот-полимеразы”, во многом аналогичную той, которую при репликации играет ДНК-полимераза, а при транскрипции РНК-полимераза). Таким образом, хотя ген **непосредственно** (как “химический реактив”) в синтезе молекул белка участия не принимает, но структура молекул белка определяется все же именно геном через определение структуры информационной РНК.

Все три процесса: репликация, транскрипция и трансляция предполагают участие химического процесса полимеризации, т.е. соединение ковалентными связями в длинную цепочку элементарных компонентов (мономеров), нуклеотидов в случае НК и аминокислот в случае белка. При репликации (т.е. синтезе ДНК) в цепочку соединяются 4 типа нуклеотидов, имеющих в своем составе дезоксирибозу), при транскрипции (синтез РНК - 4 типа нуклеотидов, имеющих в своем составе рибозу) и при трансляции (синтез белка) - 20 типов аминокислот. Соединение мономеров осуществляется ферментами, соответственно, ДНК-полимеразой, РНК-полимеразой и рибосомой. Во всех случаях для начала полимеризации фермент должен соединиться с готовой молекулой биополимера, на которой и пойдет сборка новой молекулы биополимера. При репликации ДНК-полимераза присоединяется к определенным участкам молекулы ДНК - стартовым точкам репликации (их несколько на каждой хромосоме). При транскрипции РНК-полимераза присоединяется к характерному участку у “начала” транскрибирующейся части каждого гена. Таких участков на хромосоме столько, сколько в ней генов. При трансляции рибосома присоединяется к “началу” молекулы информационной РНК.

Далее к молекуле ДНК или иРНК в области ее связи с соответствующими молекулами полимераз или рибосом по принципу комплементарности один за другим присоединяются нуклеотиды (или в случае трансляции транспортные РНК, связанные с аминокислотами). Полимеразы (или рибосомы) сшивают их друг с другом, после чего сами полимеразы (или рибосомы) скользят, как бусины по нитке, вдоль ДНК (или при трансляции вдоль иРНК), где к ДНК (или иРНК) присоединяются новые мономеры, которые сшиваются полимеразой с ранее сшитыми друг с другом участками синтезируемой молекулы, и так далее пока полимераза (или рибосома) не достигнут точки, где они “отцепляются” от молекулы ДНК (или иРНК).

Таким образом, с точки зрения клеточной биологии ген имеет две основные функции: **репликацию** и **транскрипцию**. В этих процессах ген участвует непосредственно, т.е. как химический “реактив” или, скорее, своеобразный “катализатор”, направляющий химический процесс синтеза ДНК и РНК в строго определенное русло. Эти функции не специфичны для биологии развития, так как обеспечивают, в первую очередь, саму жизнеспособность клеток и в полной мере присутствуют и у Protozoa, например, у амёб, где нет процесса эмбрионального развития.

15.2.2. Цитофизиологическая основа функционирования генов.

Достаточно очевидно, что каждый ген клетки не может функционировать вне связи с общим ходом клеточных процессов. Ведь даже процессы репликации и транскрипции одного и того же гена не могут протекать одновременно, а только по очереди. Следовательно, оба эти процесса должны управляться сигналами, поступающими к гену от других структур клетки.

Каким же образом ген принимает эти сигналы? Непосредственным результатом приема этих сигналов для начала транскрипции должно быть присоединение РНК-полимеразы к “началу” гена, т.е. подлежащему транскрипции участку ДНК. Для начала репликации, соответственно, это присоединение ДНК-полимеразы к стартовой точке начала репликации того участка хромосомы, в котором находится данный ген. От чего же зависит присоединятся эти ферменты к соответствующим участкам в данный момент или нет?

Общее правило молекулярной биологии в отношении главных биополимеров клетки сводится к тому, что управление их активностью осуществляется посредством изменения их конформации (формы молекулы в реальных условиях водного раствора цитоплазмы или кариоплазмы). Конформация чаще всего изменяется в результате присоединения (или отсоединения) к биополимеру других молекул, в том числе, и молекул других биополимеров. Мы знаем, что двойная спираль ДНК в составе хромосомы сложно упакована и связана с белками-гистонами, присутствующими в ядре. Все это затрудняет или делает невозможным присоединение упомянутых выше полимераз.

Следовательно, для начала транскрипции или репликации необходимы: а) наличие в достаточной концентрации самих полимераз, б) приведение конформации самого гена в состояние, когда он может присоединять РНК полимеразу и позволять ей функционировать. Каким же образом гену придается необходимая для начала транскрипции конформация? В настоящее время известно, что это в значительной мере достигается при участии белков так называемого **транскрипционного комплекса (ТК)**, способных избирательно присоединяться к определенным местам нити ДНК, расположенным перед началом транскрибируемой части гена (**промотор** гена) или даже на значительном расстоянии от гена, в том числе и по другую сторону гена (**энхансер**). Среди белков ТК есть активаторы процесса транскрипции (“дерепрессоры”) и ингибиторы этого процесса (“репрессоры”). Активированный энхансер может в разной степени ускорять процесс транскрипции. По крайней мере, в некоторых случаях, включение транскрипции гена предполагает присоединение к промотору гена ком-

бинации из нескольких белков транскрипционного комплекса (рис. 69).

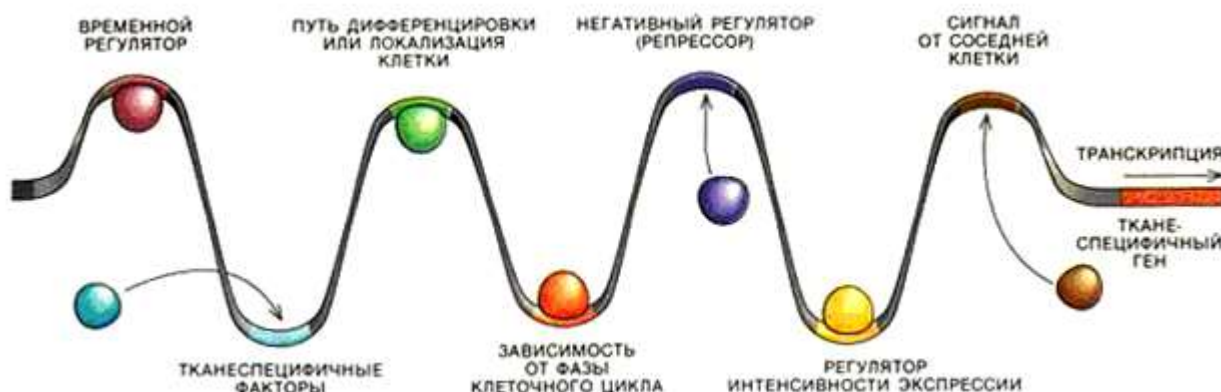


Рис.69. Запуск транскрипции гена тканеспецифичной экспрессии с помощью набора белков транскрипционного комплекса (транскрипционных факторов), присоединяющихся к промоторной регуляторной области ДНК вблизи транскрибируемой части гена (по Т.М.Бердсли. “В мире науки”, 1991, N 10).

Таким образом, чтобы запустить транскрипцию гена (“включить” его), клетка должна открыть своего рода “кодовый замок” - промотор и энхансер, соединив с ними в определенных его местах “сайтах” группу белков ТК. Присоединение к промотору и энхансеру белков ТК позволит РНК- полимеразе “сесть” на начало транскрибируемого участка гена и приступить к синтезу соответствующей РНК, а активированный таким же образом энхансер ускоряет этот процесс.

Добавочным средством регулирования транскрипции гена может служить метилирование нуклеотидов (в частности, цитозина при условии, что в цепи ДНК он соседствует с гуанином) в промоторах некоторых генов (рис. 70) . Метилирование делает невозможным присоединение белка ТК и тем самым предотвращает транскрипцию гена. Метилирование нуклеотида осуществляется ферментом метилазой, специфически связывающейся с промотором определенного гена или промоторами определенной группы генов. Фермент отделяет один из водородных атомов цитозина и на его место устанавливает метильную группу CH_3 . Метилирование промотора не мешает репликации ДНК, т.е. ДНК-полимеразе движущейся по ДНК. В процессе репликации метилированной группы ГЦ... CH_3 возникает, соответственно, неметилированная ...ЦГ... группа, которая, по-видимому, подвергается метилированию по цитозину с помощью неспецифической (по отношению к конкретным промоторам) метилазой, что делает метилированное (выключенное) состояние воспроизводимым при делении клеток.

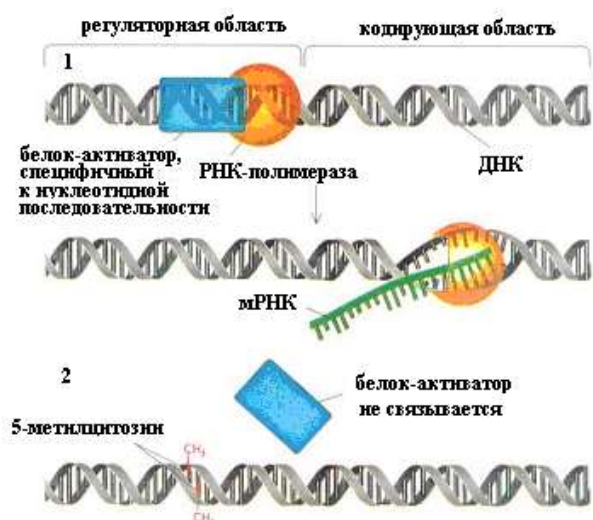


Рис. 70. Подавление активности генов путем метилирования промоторных регуляторных участков ДНК вблизи гена. А) Структура нормального цитозина в составе ДНК и цитозина, где атом водорода заменен метиловой группой CH_3 . Б) Белок транскрипционного комплекса (прямоугольник) связывается с регуляторным участком ДНК и обеспечивает возможность присоединения к промотору РНК-полимеразы (шар) и начала транскрипции (синтеза РНК) на смысловой нити ДНК гена. При метилировании регуляторного участка ДНК вблизи гена. При метилировании регуляторного участка ДНК белок транскрипционного комплекса не может присоединяться к нему и транскрипции гена не происходит (по Р.Холлидею. "В мире науки", 1989, N 8).

На метилировании ДНК основано явление генетического импринтинга, которое сначала воспринималось как любопытная частность, а по мере развития исследований ему придают все большее значение, так что само это явление и родственные ему по механизму явления, наиболее радикально мыслящие биологи истолковывают как конец генетики и замену ее эпигенетикой. Суть генетического импринтинга, характерного, по крайней мере, для млекопитающих, сводится к следующему. Растет по мере исследований список генов, которые подвергаются стойкой репрессии метилированием их промоторов на стадии формирования либо мужской, либо женской гаметы. Эта метилированность может сохраняться у некоторых генов на протяжении всей жизни организма, развившегося из зиготы, образованной с участием данной гаметы, т.е. данный ген в этом поколении не транскрибируется. Естественно, если метилируется промотор данного гена в сперматозоиде, в яйцеклетке гомологичный промотор гомологичного гена не метилируется и ген активно функционирует. Этого достаточно для нормального развития, как достаточно для развития мужского организма единственного комплекта генов X-хромосомы. Вторая X-хромосома в клетках мужского пола отсутствует. У женщин в каждой клетке две X-хромосомы, но почти все гены в одной из них репрессированы с помощью метилирования промоторов. В качестве примера можно привести ген белка - фетального ростового фактора *Igf2*, репрессимуемый метилированием в той хромосоме, которая пришла в зиготу со стороны матери. В клетках развивающегося эмбриона этот ген транскрибируется только в гомологичной хромосоме привнесенной в зиготу сперматозоидом. Наоборот, ген белка-рецептора к этому ростовому фактору, т.е. *Igf2r*, стабильно репрессирован в хромосоме, привнесенной сперматозоидом, но активен в хромосоме, привнесенной в генотип зиготы яйцеклеткой. Таким образом, нормальная доза гена не 2 аллеля на клетку, а 1 аллель на клетку. В патологических случаях может произойти дерепрессия

второго (материнского) гена *Igf2*, т.е. удвоение дозы гена, что грозит развитием рака прямой кишки. Таким образом, в норме, хотя “физически” в кариотипе присутствуют и отцовский, и материнский аллель, функционально организм является гемизиготным по данному гену, так как транскрибируется только отцовский аллель.

Сама по себе **транскрипция** гена не гарантирует осуществления функции, кодируемого им белка. Осуществление этой функции предполагает цепь молекулярных событий, которые далеко не всегда, безусловно следуют одно за другим, но наступают лишь при определенных условиях, служащих нередко регуляторами функции такого белка. Главные из этих событий: **процессинг** синтезированной в ходе транскрипции ядерной РНК (яРНК) и ее выход сквозь “поры” ядерной мембраны в цитоплазму, ее **трансляция** (т.е. синтез белка) при участии образующихся рибосом, формирование четвертичной структуры белка (объединение нескольких белков-субъединиц в сложный белок), **активация** белков при участии ферментов протеинкиназ или других молекул (например, внутриклеточных “гормонов” - вторичных мессенджеров типа ионов Са или цАМФ), активность которых в свою очередь регулируется **трансдукционными** сигналами, поступающими в клетку извне и т.д.

Вся совокупность этих процессов от транскрипции гена до выполнения активированной молекулой белка ее специфической функции нередко обозначается термином “**экспрессия гена**”, т.е. проявление гена. Этот термин заимствован из классической домолекулярной генетики, изучавшей неустойчивость связи между наличием гена в генотипе и проявлением признака, определяемого этим геном. В частности эти исследования привели к понятиям пенетрантности и экспрессивности гена.

В последние годы было показано, что после транскрипции гена продукт транскрипции - яРНК в одних тканях подвергается процессингу иначе, чем в других, что приводит к появлению в одних типах клеток одного варианта структуры белка, кодируемого данным геном, а в других типах клеток другого варианта белка. Более того, в разных типах клеток может транскрибироваться один и тот же ген, но в одном типе клеток его транскрипт, т.е. яРНК, “выпускается” из ядра для последующей трансляции (синтеза белка), а в другом типе клеток не выпускается из ядра и тем самым предотвращается экспрессия транскрибированного гена, что и приводит к дифференцировке разных тканей в эмбрионе.

15.2.3. Специфичная для онтогенеза Metazoa роль генов

Специфичными для онтогенеза многоклеточных организмов являются процессы клеточной и органной дифференцировки.

Клеточная дифференцировка - появление морфологических и биохимических различий между первоначально одинаковыми клетками. Органная дифференцировка, или органогенез - формирование разных органов в первоначально однородных частях тела эмбриона, приобретающего при этом специфические для вида (или более крупных таксонов) варианты симметрии. Выше также указывалось, что сами по себе гены (одни и те же во всех клетках) принципиально

не могут предопределить, например, с какой стороны у раннего эмбриона начнется развитие головы, а с какой хвоста. Такая категория, как **направление** к голове не может быть зашифровано в первичной структуре ДНК, одинаковой для всех клеток как будущей головы, так и хвоста.

Более того, невозможно с помощью генов, одинаковых во всех клетках, зашифровать сигнал, обеспечивающий включение в одних клетках одного набора генов, а в других - другого набора генов, что и приводит к биохимической и морфологической дифференцировке клеток. Этот процесс может быть или стохастическим, т.е. наступать, как одно из возможных случайных событий с той или иной вероятностью, или под влиянием складывающихся в ходе развития неоднородностей условий для первоначально одинаковых клеток. Например, условия в середине “кучи” клеток могут отличаться от условий на периферии “кучи” клеток, что может предопределить включение закономерно различных групп генов, например, из-за неодинаковой складывающейся концентрации индукторов, вырабатываемых в разных слоях кучи клеток.

Самыми ранними источниками сигналов для дифференцировки клеток могут быть **различия в концентрации** сигнальных веществ-морфогенов (на разных сторонах или в разных слоях эмбриона), к которым в клетках имеются молекулы-рецепторы. Последние запускают после соединения с этими морфогенами каскад внутриклеточных процессов, воздействующий тем или иным образом на активность определенных генов или их транскриптов и белков, соответствующих транскриптам. Такие различия часто называют градиентами концентрации, т.е. изменение концентрации от полюса к полюсу эмбриона или от поверхности эмбриона вглубь него. Такие градиенты могут стать теми первоначальными отличиями в условиях для разных клеток “кучи”, которые и приводят, в конечном счете, к дифференцировке первоначально одинаковых клеток. Иными словами, **градиенты могут быть формой кодирования в эмбрионе позиционной информации**, причем на основе количественных, а не качественных особенностей.

В технике передача информации об объекте на таком принципе называется аналоговым принципом кодирования. Громкость звука на звукозаписывающем фонографе Эдисона или на граммофонной пластинке, сделанной по тому же принципу, передавалась большей или меньшей разницей в глубине ямок и возвышенностей в бороздке, по которой бежит звукоснимающая игла. С появлением простейших магнитофонов громкость звука передавалась степенью намагничивания бегущей магнитной ленты и т.п. При тиражировании пластинок и магнитофонных записей легко возникают большие искажения из-за того, что точность аналогового копирования слишком зависит от изменчивых состояний и характеристик копирующих устройств. Для повышения контрастности и однозначности передачи информации в последние десятилетия в технике стали применять так называемое цифровое кодирование, где основные параметры передаваемого сигнала представлены не размытой “степенью выраженности признака”, а уровнем, представленным числом, которое при тиражировании информации передается однозначно, как тексты или цифровые таблицы с компьютера на компьютер.

Если бы аналоговый принцип передачи информации всегда строго поддерживался в ходе эмбриогенеза, то, пожалуй, не развивалась бы, скажем, голова и шея как две дискретные качественно различные структуры, а у переднего конца тела развивались бы преимущественно головные структуры, несколько каудальнее структуры, совмещающие некоторые признаки головы и шеи, а еще каудальнее преимущественно шейные структуры и т.д. У некоторых примитивных семейств цветковых растений со спиральным расположением лепестков и тычинок нет резких “качественных переходов” от лепестков к тычинкам, а наблюдается плавный переход от чистых лепестков без пыльников (характерных для тычинок) к лепесткам со слабо выраженными пыльниками, затем суженным лепесткам с резко выраженными пыльниками и, наконец, совсем узким тычинкам с развитыми пыльниками без признаков лепестка. Да и клетки имели бы характер не нейронов, эпидермиса и хрящевой клетки, а полунейрона и полухрящевой клетки. Такого хаоса удастся избежать отчасти потому, что дифференцировка клеток есть активизация конкретных генов, которые являются, во-первых, дискретными (прерывистыми) структурами, а во-вторых, информация, в них содержащаяся, по способу тиражирования является “цифровой”, а не аналоговой. Ген тиражируется в форме конкретной последовательности вполне конкретных нуклеотидов (репликация), транскрибируется точно также на основе нуклеотидов другой природы, а транслируется в виде однозначной последовательности вполне определенных аминокислот. Декодирование позиционной информации на его позднем этапе проявляется как **включение определенного набора генов в клетках определенной локализации (места в теле) и типа (например, эктодермы или мезодермы).**

Достаточно очевидно, что действие генов на физиологию клеток реализуется через транскрипцию и трансляцию, т.е. через синтез определенных белков, соответствующих этому гену. В самом первом приближении можно классифицировать эти белки по их функциям следующим образом.

А. Белки универсальные или почти универсальные, присутствующие во всех (или почти всех) клеточных типах в сравнимых количествах (обычно небольших) и необходимые для поддержания жизнеспособности клеток (например, дыхательные ферменты цикла Кребса, белки цитоскелета ламины, поддерживающие структуру ядерной мембраны, гистоны, поддерживающие структуру хроматина и т.п.). Эти белки должны быть объектом общей клеточной биологии.

Б. Белки органо- или тканеспецифичные, т.е. присутствующие в одних органах и тканях, но отсутствующие (в сравнимых количествах) в других, где соответствующие им гены пребывают в неактивном состоянии (не “включены” или транскрибируются медленно). Как уже говорилось выше, одним из важнейших аспектов биология развития является исследование потоков информации, обеспечивающих дифференцировку первоначально одинаковых клеток эмбриона. Эти белки можно условно разделить на:

Б1 - массовые белки главной функции, являющиеся важнейшим химическим субстратом специализированной функции данного типа клеток, например, актин и миозин мышечной клетки, гемоглобин эритроцита, кератины кератино-

цита, секретируемые белки желез и т.п.

Б2 - белки менее массовые, обеспечивающие в самом широком смысле слова регулирование выполнения клеткой главной функции от включения и выключения генов тканеспецифических белков (белки транскрипционного комплекса) до белков-рецепторов гормонов и эмбриональных индукторов, других белков цепей трансдукции, включая протеинкиназы, ферменты синтеза тканеспецифических включений или гормонов (например, тирозиназы), белков, поддерживающих тканеспецифичную адгезию клеток (САМ) и т.п.

Необходимо иметь в виду, что тканеспецифичность белков группы Б далеко не всегда абсолютна. Иногда один и тот же белок-рецептор встречается в нескольких (но не во всех) тканях (только в тех, которые реагируют на выделение одного и того же гормона, например, в сердечной мышце, печени и жировой ткани есть рецепторы адреналина). Цитоскелетный белок актин встречается во многих типах клеток, но только в мышечной ткани он становится массовым белком, составляющим большую долю сухого веса клетки.

Одни и те же белки транскрипционного комплекса (ТК) также встречаются в разных тканях. Специфичны для тканей, скорее **комбинации** присутствующих в них белков ТК.

С этой точки зрения, **эпигенетическая наследственность** представляется основанной на присутствии в клетках каждого данного типа дифференцировки **определенной комбинации белков ТК**, которые и обеспечивают включение транскрипции определенной комбинации генов, специфичной для данного типа дифференцировки (в том числе, транскрипции генов самих белков ТК), а также на метилировании промоторов “ненужных” этим клеткам генов, обеспечивающим их репрессию. Впрочем, репрессию могут осуществлять и некоторые белки ТК. Гены белков, специфичных для **иных** типов клеточной дифференцировки, не транскрибируются потому, что список присутствующих в их ядрах белков ТК недостаточен для их включения. Однако, транскрипцию этих “ненужных” в данных типах клеток генов все же можно получить, если методами генной инженерии промоторы этих генов заменить на промоторы какого-либо из тех генов, которые в клетках данного типа транскрибируются. Так, например, фибробласты не синтезируют в норме фермент тирозиназу, необходимый для синтеза пигмента меланина. Но, если выделить ген тирозиназы, отделить его собственный промотор и на его место поставить промотор гена коллагена (активно работающего в фибробластах), а затем ввести такой преобразованный ген в фибробласты, эти клетки синтезируют тирозиназу и в них даже начинается синтез меланина.

Таким образом, эпигенетическая наследственность базируется как на тканеспецифичных комбинациях белков ТК, так и на “стереоспецифическом сродстве” с ними промоторов генов, “подлежащих” включению именно в данном типе клеток, причем это сродство должно обеспечивать такое изменение конформации гена, которое позволяет присоединение РНК-полимеразы к нему и начало транскрипции генов тканеспецифичной экспрессии. Очевидно, появление дифференцировки клеток в филогенезе предполагает “согласованную” коэволюцию белков ТК и промоторов и энхансеров определенных генов.

15.2.4. Хокс-гены(Нох- гены) как пример специализированных генов управления морфогенезом. Особый интерес у специалистов по биологии развития вызвали белки транскрипционного комплекса (из группы Б2). В первую очередь внимание привлекли так называемые гены гомеобокса, или Хокс-гены, характеризующиеся наличием в их составе особого участка “гомеобокса”, кодирующего соответствующий “гомеодомен” молекулы белка. С помощью этого домена белок связывается с ДНК промоторов некоторых других генов, запуская их транскрипцию.

Один из Хокс-генов мушки дрозофилы попал в поле зрения генетиков благодаря найденной мутации с очень интересным, с точки зрения эмбриологии, эффектом: на месте одной конечности - обонятельных усиков насекомого антенн развивались также конечности, но соответствующие по строениям обычным “ходильным” ногам мухи, т.е. нормальный орган, но развившийся в сегменте тела, где должен развиваться другой орган. Такие мутации были названы гомеозисными, откуда и название гены гомеобокса.

Хокс-гены присутствуют в геноме в виде серий из очень близких по строению, но все же не идентичных генов, которых в каждой серии насчитывается более десятка (у позвоночных). Нох-гены принято обозначать с указанием серии и номера гена в серии. Например, Нохс-6 означает, что данный ген относится к серии “с” и занимает в ней 6-ю позицию, т.е. имеет N 6. Серии располагаются в разных хромосомах. У позвоночных 4 серии Нох-генов, а у дрозофил и даже ланцетника по одной серии (на гаплоидный набор хромосом).

Странным образом, порядок расположения Хокс-генов одной серии на хромосоме соответствует порядку расположения на туловище эмбриона (вдоль передне-задней оси тела) мест их экспрессии. Иными словами, ген, с которого в хромосоме начинается серия Хокс-генов, на постгастрюляционных стадиях эмбриогенеза транскрибируется в головной области, гены, расположенные за ним транскрибируются в шейной области, следующие гены серии - в грудном отделе и так до хвостового отдела (рис. 71). Интересно, что граница зоны экспрессии каждого Хокс-гена со стороны переднего конца тела эмбриона выглядит резкой, а каудальнее концентрация продукта транскрипции постепенно падает и сохраняется на пониженном уровне в зоне транскрипции следующего по номеру Нох-гена (рис.71).

Самое замечательное, с точки зрения биологии развития, заключается в том, что транскрипция каждого из Хокс-генов происходит в зачатках сразу нескольких тканей (нервной трубке, осевой мезодерме, поверхностной эктодерме, нервном гребне), но **в одном и том же сегменте тела зародыша**. На нескольких примерах исследователям удалось показать, что конкретные номера Хокс-генов серии начинают транскрибироваться при определенных уровнях концентрации веществ, образующих градиент концентрации в теле эмбриона, а включение определенного Хокс-гена обеспечивает синтез его белка, который соединяясь с определенными стереохимически комплементарными ему участками ДНК генома включает группы генов, ответственных за развитие определенных сегментов тела (например, шейного или грудного отдела тела животного). Роль градиентов концентрации определенных веществ в развитии определенных ор-

ганов давно известна экспериментаторам- морфологам, но механизм действия этой концентрации оставался непонятным до глубокого

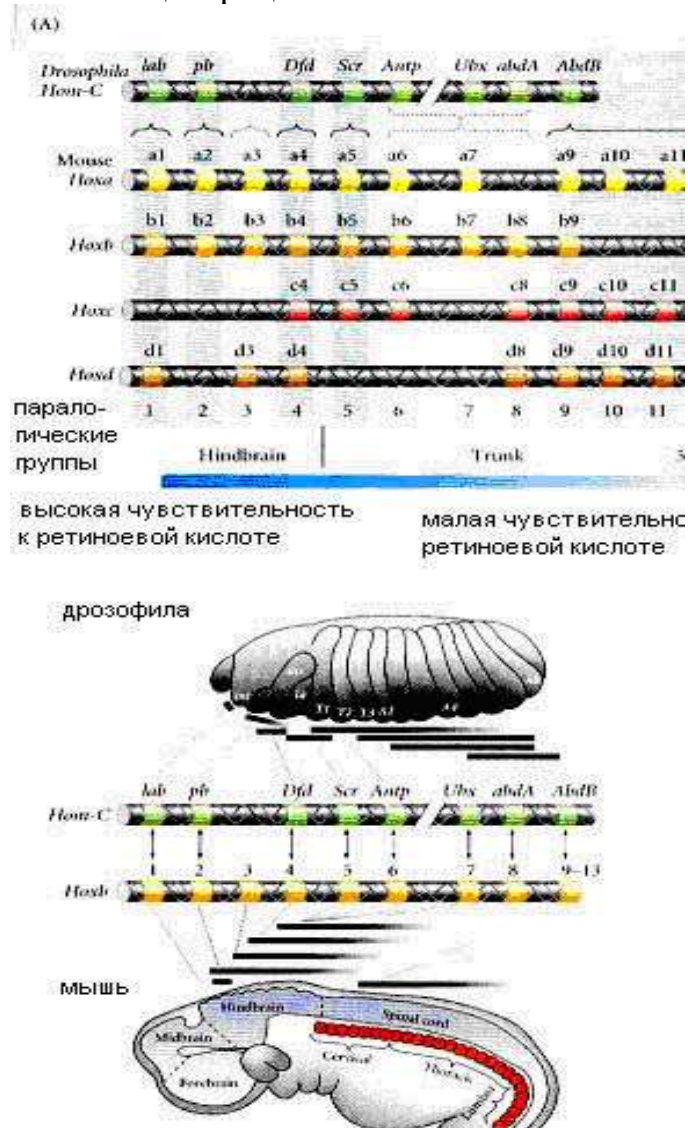


Рис. 71. Сходство порядка расположения Нох- генов на хромосомах (считая от 3' - конца) и расположения зон их экспрессии вдоль кранио-каудальной оси тела у мышей и дрозофил. А) Хромосома дрозофилы (вверху) , несущая гены гомеобокса, и 4 хромосомы мыши, несущие Нох-гены (соответственно, Ноха-, Нохb-, Нохс- и Нохd- серии). Вертикальными полосами показаны гены, обнаруживающие тесную гомологию друг с другом. Горизонтальная полоска переменной плотности показывает степень чувствительности гена к концентрации ретиноевой кислоты, как фактора запуска его экспрессии. Слева гены, “включаемые” уже низкой концентрацией ретиноевой кислоты, а справа - только высокой концентрацией. Первые экспрессируются раньше, последние позже. В) Горизонтальными полосками переменной плотности показано расположение на теле эмбриона областей транскрипции разных генов серии Нохb у мыши (12 дней) и генов гомеобокса единственной серии Ном-С у дрозофилы (10 часов развития) Краниальные границы зон экспрессии резкие, а каудальное концентрация их транскриптов падает постепенно. (По S.F.Gilbert.“ Developmental biology”,2003).

анализа серий Нох-генов. Удивительна и универсальность для животного и отчасти даже для растительного мира Нох-генов и даже их серий. Во всяком случае доказана взаимозаменяемость некоторых Нох-генов мух и человека.

С точки зрения достигнутых и наметившихся представлений такие анатомические понятия, как **шея**, получают не только чисто анатомическое толкование, но и, по существу, молекулярно-генетическое. Например, “шея - это структура, развивающаяся в определенной части эмбриона, благодаря появлению в ней определенной концентрации “сигнального” вещества (повидимому, ретиноевой кислоты, выделяемой из клеток гензеновского узелка), более высокой, чем в головном отделе, и более низкой, чем в грудном отделе, что обеспечивает включение 4-5 го Хокс-генов соответствующей серии, в свою очередь, обеспечивающих включение каскада генов, необходимых для формирования именно шейных, но не головных или грудных структур”.

Этот прорыв в биологических знаниях был обеспечен работой на стыке ряда отраслей биологии при важнейшей роли молекулярной генетики и биоло-

гии развития, но с участием частной генетики мышей (в том числе генетики фенотипически идентифицируемых морфологических признаков), приобретшей давно общебиологическое значение, биохимии, гистохимии и др. При всей необычайной теоретической важности открытия генетических (включение конкретных генов-регуляторов других генов, т.е. “цифровое” кодирование информационного обеспечения развития) и негенетических (формирование градиентов концентрации “сигнальных” веществ, т.е. “аналоговое” обеспечение развития) механизмов **запуска** формирования конкретных анатомических структур остается еще очень много работы по объяснению хотя бы в общих чертах, что собственно происходит **после** запуска в ходе самого морфогенеза. Какие именно гены или комбинации генов должны быть задействованы под влиянием генов запуска, и в чем конкретно выражается функция кодируемых ими белков на уровне цитофизиологии и гистофизиологии, чтобы получился шейный отдел, так четко отличающийся от грудного при исследовании анатомическими методами?

На сегодня сколько-нибудь полного ответа на этот вопрос мы не имеем, хотя мало оснований сомневаться в том, что в этих процессах не последнюю роль играют белки клеточной адгезии (САМ) и управление в процессе морфогенеза транскрипцией соответствующих им генов, трансляцией и активацией самих синтезированных белков.

15.2.5. Общее представление о генетике развития

Генетика развития - раздел биологии развития (и генетики), изучающий роль и механизм действия отдельных генов на процессы развития. Выступая в рамках традиционной генетики, генетика развития ставит задачу идентификации (выявления) генов, способных определять конкретный морфогенез или вариант морфогенеза. Традиционный метод работы - поиск наследуемых нарушений развития, вызванных мутациями, с последующим гибридологическим анализом и картированием гена в определенном локусе определенной хромосомы. В рамках биологии развития помимо этой задачи перед генетикой развития ставятся как минимум три другие задачи, а именно попытаться ответить на вопросы:

- 1) Когда (на какой стадии развития) экспрессируется ген?
- 2) Где (в клетках какой ткани) экспрессируется ген?
- 3) Каков механизм действия экспрессирующегося гена (какова биохимическая и цитофизиологическая функция белка, кодируемого геном) на морфогенез?

Приведем пример ответа на эти вопросы в отношении гена SRY, расположенного в Y-хромосоме млекопитающих, и определяющего мужской пол.

1) **Когда экспрессируется ген?** Ген экспрессируется **на стадии появления различий между гонадами мужского и женского типа** (первоначально уже появившиеся у эмбрионов мужского и женского пола зачатки гонад, т.е. семенники и яичники, не отличаются при их гистологическом исследовании). Позднее экспрессия этого гена прекращается.

2) **Где экспрессируется ген?** Ген экспрессируется **в соматических (не-**

половых) клетках зачатков семенников, в частности, вероятно, тех, которые позднее превращаются в клетки Сертоли канальцев семенника, но не экспрессируются в половых клетках, которые дают начало сперматозоидам. Этого и следует ожидать, если учесть, что только половина сперматозоидов содержит у-хромосому, тогда как вторая половина сперматозоидов содержит только X-хромосому и лишена гена SRY. Следовательно, половые клетки становятся сперматозоидами, а не яйцеклетками не потому, что в них экспрессируется ген SRY (он в них не экспрессируется), а потому, что они оказываются в контакте с соматическими клетками, где на определенном этапе развития происходит экспрессия гена SRY.

3) **Как действует ген?** Белок, кодируемый геном SRY, является **транскрипционным фактором**, т.е. способен избирательно связываться с промоторами или энхансерами других генов, в частности, повидимому, гена Sox9, включая их транскрипцию. Есть данные, что ген Sox9 является обязательным посредником гена SRY в обеспечении мужского направления развития гонады, и в женском организме он присутствует, но бездействует.

Другим примером ответа на эти же 3 вопроса о действии гена на развития может служить индукция конечности позвоночных геном FGF10.

1) Экспрессия гена наблюдается непосредственно **перед появлением** на латеральной поверхности тела эмбриона **почки (раннего зачатка) конечности**.

2) Экспрессия наблюдается в **участке латеральной мезодермы**, которая позднее входит в состав конечности.

3) Белок FGF10 - **паракринный белок-индуктор индуцирует** в участке латеральной эктодермы **временный орган - апикальный эктодермальный гребень**, секретирующий паракринный белок-индуктор FGF8.

15.3. Гистологические и макроморфологические аспекты морфогенеза.

Как уже указывалось, классическая эмбриология, без овладения основами которой немыслимо понимание зародышевого развития, оперирует преимущественно данными морфологических исследований. В свою очередь, совокупность сложнейших формообразовательных процессов представляет собой внешнее выражение глубинных динамических явлений на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях, в том числе описанных выше.

Ниже дается краткое описание некоторых “макропроцессов”, лежащих в основе развития зародыша.

15.3.1. Рост зародыша и деление клеток.

В процессе индивидуального развития организм многократно увеличивается в размерах. При этом происходит увеличение площади поверхности тела (пропорционально квадрату линейных размеров) и рост объема (пропорционально кубу линейных размеров). То есть, объем или масса растут быстрее, чем поверхность тела. Рост или увеличение размеров тела зародыша обычно является результатом увеличения числа составляющих его клеток и объема межклеточ-

ного вещества. Причем ведущую роль играет размножение клеток (пролиферационный тип роста или **гиперплазия**). В редких случаях рост вызван увеличением размеров клеток, которые при этом не делятся. Такой тип роста называется ауксетичным или **гипертрофией** и описан у коловраток, нематод и личинок насекомых. Гипертрофия характерна для тех тканей высших животных, клетки которых не делятся (жировая и скелетная мышечная ткани). Рост объема и массы тела, вызванный гипертрофией данных тканей может достигать огромных величин. Всем известны примеры гипертрофии мускулатуры у атлетов и жировой ткани у толстяков, масса тела при этом в отдельных случаях может превышать 500-600 килограммов. Часто при этом гипертрофия клеток связана с полиплоидизацией их ядер. У высших животных есть клетки (помимо перечисленных, нейроны, например), которые в периоде роста не делятся, другие (в частности, фибробласты) делятся ограниченно, а третьи (стволовые) - делятся постоянно.

Однако рост большинства тканей и органов осуществляется за счет размножения клеток. Лошадь больше мыши главным образом потому, что у нее во много раз больше клеток. Увеличение числа клеток является следствием их деления. Причем функциональная роль митотических делений не сводится лишь к росту клеточной массы зародыша, но также инициирует качественные изменения в клеточных популяциях, вызывая активацию определенных групп генов до этого репрессированных.

Считается, что существуют два уровня контроля клеточных делений: внешний и внутренний. Внешний уровень контролируется обычно гормоном роста - **соматотропином**, выделяемым аденогипофизом, т.н. **соматомединами**, выделяемыми печенью в ответ на гормон роста, **инсулином** и другими внешними факторами роста. Внутренний уровень регулируется самим органом или тканью. Вместе с тем существуют белки, подавляющие деление клеток. Среди них можно отметить бета-интерферон и бета-трансформирующий фактор роста.

Рост зародыша характеризуется либо **изометрией**, либо положительной или отрицательной **аллометрией**. **Изометрический** или равномерный рост различных частей зародыша, при котором пропорции его тела не изменяются, встречается гораздо реже, чем **аллометрический** или неравномерный рост (рис.72). Примером отрицательной аллометрии является замедленный рост конечностей по отношению к телу у человеческого плода, а положительной - ускоренный рост головы. У павианов скорость роста челюстей и лицевого черепа более чем в 4 раза превышает скорость роста мозгового черепа, что определяет своеобразное строение его головы. **Аллометрия приводит к изменению пропорций тела и темпов развития органов, а при изометрии размеры тела увеличиваются без существенного изменения пропорций** (у личинок многих костных рыб).

С точки зрения продолжительности различают два основных типа роста - **ограниченный** и **неограниченный**. К животным с ограниченным ростом относят те виды, размеры которых увеличиваются лишь до определенной стадии онтогенеза, например, до наступления периода зрелости (птицы, млекопитающие). При неограниченном росте какой-то, пусть небольшой, положительный

рост продолжается в течение всего онтогенеза (рыбы, рептилии).

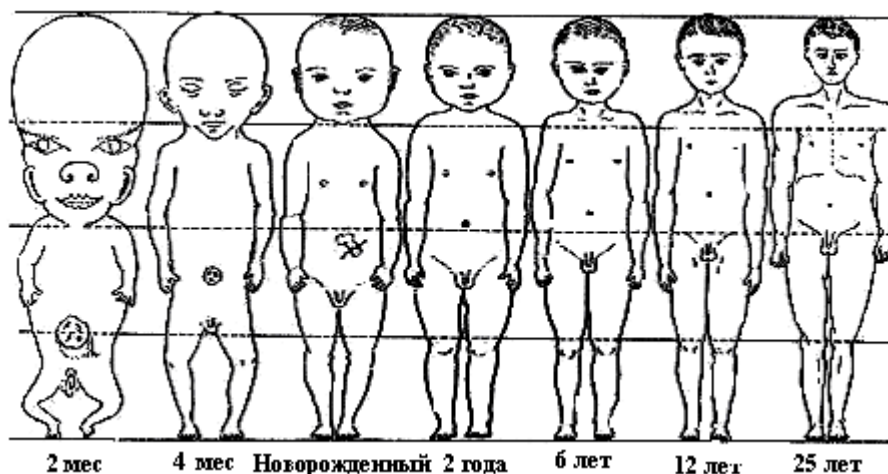


Рис. 72. Аллометрия у человека. В ходе развития рост конечностей опережает темпы роста головы и туловища.

Процессам роста свойственны сезонная (особенно у животных, обитающих в умеренных и высоких широтах) и суточная (прослеживается по изменению митотической активности клеток) ритмичность.

Считается, что наследственный потенциал роста животных организмов обусловлен комбинированным действием множества генов с малым индивидуальным эффектом; в то же время аномалии роста (карликовость, укороченные конечности) определяются действием отдельных генов. Регуляция ростовых процессов осуществляется посредством гормонов, в частности, у позвоночных - гормонами гипофиза, вилочковой, щитовидной, половых желез.

В случаях замедления или даже полного прекращения роста под влиянием неблагоприятных внешних факторов (дефицита пищи, воды, экстремальных температур и т.п.) внешней среды, он может возобновиться в более высоком темпе после прекращения действия этих факторов (компенсаторный рост). Естественно, что в данном случае речь идет о тех стадиях онтогенеза, когда рост еще возможен.

15.3.2. Перемещения эмбриональных зачатков в ходе развития.

Одним из необходимых условий формирования сложной структуры органов и организма в целом в онтогенезе являются разнообразные и целенаправленные перемещения клеточного материала. Морфологические движения клеток при развитии зародыша впервые были описаны в классических работах Фогта (1925г., 1929г.), использовавшего метод прижизненного окрашивания различных участков яйца и зародыша. Позже многие исследователи, используя метод Фогта, более детально изучили морфологические движения у представителей почти всех классов хордовых. Эти исследования показали универсальный характер данных движений и вскрыли их важное биологическое значение, так как именно посредством перемещений клеток и клеточных пластов идет формирование тела животного, и презумптивные зачатки различных органов

занимают свое окончательное положение в зародыше, наподобие того, как строится здание целенаправленным перемещением кирпичей, бетонных балок, лестниц, окон и дверей.

Значение морфогенетических движений состоит также в том, что весь процесс развития представляет собой цепь индуктивных взаимодействий между клетками, тканями и зачатками различных органов. Эмбриональные индукции были бы невозможны без перемещений клеток, необходимых для установления контактов между индуктором и реагирующим материалом.

Следует оговориться, что, несмотря на огромную роль, которую играло использование в эмбриологии метода Фогта, до сих пор не утратившего своего значения, полученные с его помощью данные, носят описательный характер и не раскрывают механизмов морфогенетических движений. Начало причинного анализа этих движений было положено в 30 годах блестящими исследованиями И.Гольтфретера, упоминавшихся выше.

Позднее было показано, что при эмбриогенезе определяющими и наиболее важными являются движения клеточных пластов, а не отдельных клеток. В связи с этим становится понятным значение адгезивных сил, обеспечивающих объединение клеток в пласты и механизмов, благодаря которым активность отдельных клеток превращается в движение клеточных пластов. В последние годы большое внимание уделяется молекулярным основам клеточных контактов.

Примером морфогенетических движений клеточных пластов являются перемещения эпителиевидных зачатков зародыша, в частности, клеток наружного зародышевого листка - эктодермы и хордомезодермального зачатка в ходе гастрюляции у амфибий.

15.3.3. Дифференцировка зачатков органов

Дифференцировкой называется процесс возникновения различий между первоначально однородными клетками и тканями зародыша в ходе его развития, приводящий к формированию специализированных клеток, тканей и органов. Процессы дифференцировки в основном происходят в эмбриогенезе, но также наблюдаются и в постэмбриональном периоде онтогенеза, в частности, при повторных гистогенезах (обновление эпителиальных тканей и клеток крови, например).

Во многом дифференцировка - это событие, касающееся отдельной клетки, однако в действительности дифференцировка многих тканей зародыша возможна лишь при наличии определенного минимального количества клеток, как впервые обнаружил Д.П.Филатов (1931, 1933 гг.). Работами целого ряда исследователей (Детлаф, 1938г., 1964г.; Grobstein, 1952г.; Лопашов, 1960г.; Голиченков, 1988 г., 1991 г. и др.) на огромном экспериментальном материале было показано, что процесс дифференцировки однородного клеточного материала запускается лишь по достижении критической массы клеток или ее переизбыточности. Предположительно, эффект критической массы может быть следствием "протечки генов", включая суммирование подпороговых количеств генных продуктов до надпороговых величин, вызывающих каскад дифференцировок. Таким образом, типичная дифференцировка - это коллективный процесс

группы сходных клеток.

В результате дифференцировки в развивающемся зародыше возникают разнообразные типы клеток (в составе органов дыхания около 40 типов клеток, а в нервной системе человека - около 100), отличающиеся между собой морфологически, функционально, биохимически и т.п. (разнообразные нервные, эпителиальные, железистые, мышечные и др. клетки). Классификация затруднена тем, что различия между некоторыми клеточными типами чрезвычайно незначительны и выражены даже меньше, чем в одной и той же клетке при различных функциональных состояниях. Кроме того, в последние годы описан целый класс клеток "смешанного" типа, совмещающих в себе особенности разных клеточных популяций.

Обычно процесс дифференцировки происходит в рамках одного, чаще всего единственного, клеточного цикла, то есть клетка дифференцируется в ходе своего созревания. Но иногда дифференцировка охватывает несколько последовательных клеточных циклов, то есть, ряд поколений одной клетки. Процессы цитодифференцировки при этом происходят в периоде G1 интерфазы.

Следует подчеркнуть, что в процессе дифференцировки клетка теряет генеративные способности. Практически все высокоспециализированные клетки не размножаются, а некоторые даже утрачивают в ходе генезиса ядра (эритроциты и тромбоциты млекопитающих).

В норме дифференцированная клетка представляет собой достаточно стабильную в структурно-функциональном отношении единицу. Однако при определенных условиях клетка может либо утратить признаки дифференциации (дедифференцироваться), либо перейти в иное дифференцированное состояние (**явление трансдифференцировки**). Интересно отметить, что в соответствии с универсальным для живого принципом обратной корреляции, при дедифференцировке клетки вновь приобретают способность размножаться.

В случае **малигнизации** в клетке происходят радикальные структурно-функциональные и молекулярно-генетические изменения, она выходит из-под контроля интегрирующих систем организма и начинает усиленно размножаться (опухолевый рост).

Ядро одноклеточного зародыша - зиготы содержит наследственную информацию не только о будущем организме, но и об онтогенезе в целом. В частности, о том, в каком возрасте у эмбриона образуется закладка легких, а у ребенка, произойдет смена зубов, начнется менархе (репродуктивный период), возникнет облысение и т.п. Хотя, конечно, многие фенотипические процессы происходят в результате взаимодействия генетических механизмов с внешними, экзогенными факторами (вспомним хотя бы роль солнечного излучения в старении кожи). То есть, зигота обладает **тотипотентностью** – способностью формировать целый (тотальный) организм. Как показали многочисленные эксперименты по изоляции бластомеров (клеток самых ранних зародышей), каждый из них может в принципе развиваться в полноценный организм. У млекопитающих утрата клетками тотипотентности происходит на стадии бластоцисты (рис.2). Когда начинается дробление зиготы, активируются и депрессированы определенные группы генов, освобождаясь от ассоциированных с ними основ-

ных белков – **гистонов**, блокировавших синтез различных мРНК. Первыми депрессируются гены, обуславливающие способность клеток к пролиферации и регулирующие общий метаболизм (через синтез соответствующих ферментов). На стадии гаструляции начинают активироваться первые тканеспецифические гены. Наивысшая активность тканеспецифических генов отмечена в ходе органо- и гистогенезов, когда происходит дифференцировка высокоспециализированных клеток.

ГЛАВА 16. КЛАССИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭМБРИОЛОГИЯ, ИЛИ “МЕХАНИКА РАЗВИТИЯ”. МАКРОАНАТОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ.

16.1. Проблема генерирования позиционной информации

Выше мы отмечали, что с позиций достигнутого на сегодняшний день понимания процессов и на основе современной общенаучной терминологии экспериментальную эмбриологию можно определить как науку о **потоках информации** в эмбрионе, обуславливающих в нем **дифференцировку** на клеточном, тканевом, органном и организменном уровнях, а также о клеточных механизмах реализации информационных сигналов в ходе морфогенеза.

Первичный смысл слова “дифференцировка” (происходящего от латинского корня, означающего “отличающийся”, “иной”) применительно к зачаткам макроанатомических структур сводится к появлению различий между первоначально однородными анатомически участками тела эмбриона.

Возьмем самые очевидные проявления дифференцировки, например, кожи головы человека. В области лба мы видим участок кожи, где волосы, практически, не растут. (В лучшем случае присутствуют едва заметные рудименты волосяных фолликулов, которые у плода формировали заметные волосы, впоследствии выпавшие.)

На протяжении какого-нибудь миллиметра у **нижней** границы лба ситуация с ростом волос резко меняется. Мы видим неширокую полосу кожи, с укрепленными в ней достаточно плотно расположенными довольно толстыми, но короткими (растущими всего несколько дней каждый) волосами. Это то, что мы называем бровью. Еще ниже брови (кожа века) режим роста волос вновь становится, как на лбу, т.е. волосы не растут. По краям века опять растут короткие волосы (ресницы).

Напротив, у **верхней** границы лба (где кожа лба переходит в кожу скальпа) волосы, как и на бровях, присутствуют, но режим их роста не такой, как на брови. На скальпе волосы растут годами и могут достигать длины в метр и больше, если их не стричь.

Итак, с одной стороны, всюду на лбу, скальпе и бровях речь идет о едином непрерывающемся органе - коже, содержащей зачатки волосяных фолликулов. Однако режим работы фолликулов закономерно и резко отличается. Удивительнее всего эта узкая локальность (приуроченность к определенной узкой полосе кожи) данного режима роста волос. Брови - часто совсем узкая полоска кожи с волосами, со всех сторон окруженная кожей, лишенной волос.

Набор генов, входящий в состав каждой клетки кожи, будь то эпидермис (и его производные - волосяные фолликулы) или клетки соединительной ткани кожи один и тот же, как в полоске бровей, так и на лбу и скальпе. Почему же волосы растут (или не растут) по-разному?

Вопрос **почему** не так прост, как может показаться с первого взгляда. С точки зрения **анатома**, присутствие полоски кожи с волосами над глазом **целесообразно**. Например, волосы затрудняют скатывание капельки пота со лба в глаз, что вызвало бы раздражение в глазу. С точки зрения этолога, роль бровей

велика в половом отборе, судя по тому, сколько внимания уделяют модницы и гримеры их выщипыванию и подкрашиванию.

Но **целесообразность** - это наше понимание причины возникновения в процессе эволюции под давлением естественного отбора такой полоски кожи с короткими толстыми волосами. **“Целесообразность”** не может быть непосредственной причиной деления клеток в камбиальной зоне волосяных фолликулов бровей (что и приводит к формированию волоса). Смешно было бы допустить, что клетки камбия способны “судить” о целесообразности своего поведения для организма, как судит обладающий мозгом, и получивший высшее образование анатом. Когда мы говорим **целесообразность**, мы подразумеваем, что в результате действия закрепленных естественным отбором мутаций сложилась такая структура наследственности, которая обеспечивает развитие бровей над глазом. Но ведь наследственность клеток над глазом и на лбу одинаковая, а волосы растут по-разному! Значит **целесообразность** и ее реальное материальное воплощение - структура генома **сами по себе** не могут определить локальных особенностей кожи.

Другое объяснение локальных особенностей кожи легко приходит в голову неискушенному в экспериментальной эмбриологии **гистофизиологу**. Под кожей бровей и лба существуют разные условия. Например, кровообращение под бровями лучше, чем под кожей лба, и поэтому волосы на бровях растут, а на лбу не растут. Естественно при таком подходе предположить, что на скальпе условия кровообращения еще лучше. Поэтому, если на бровях растут лишь короткие волосы, на скальпе растут очень длинные. Для проверки такого предположения можно было бы кожу бровей пересадить на лоб или на скальп. Если бы такой гистофизиологический подход был верен, в первом случае трансплантат кожи брови постепенно лишился бы волос и превратился в кожу лба, а во втором короткие волосы бровей превратились бы в метровые волосы скальпа. Вряд ли кто-либо решился бы на проведение такого опыта на человеке. Однако на животных многократно делались подобные пересадки кожи с разными режимами роста волос, и предвидеть в общих чертах результат опыта не трудно. В новом месте волосы бровей росли бы, примерно, так же, как и до пересадки. Во всяком случае, косметологи проводят почти такие опыты на мужчинах с лысиной, где режим роста волос к 30 годам меняется на некоторых участках скальпа с типичного для этой локализации на режим, близкий к тому, который существует на лбу. Они вырезают “в шахматном порядке” многочисленные (до 600 штук) небольшие круглые кусочки кожи с растущими волосами с затылочной части скальпа (обычно, не затрагиваемой облысением) и пересаживают их на облысевшие участки, где рост волос продолжается после приживления кожи в том же стиле, как он продолжался бы на затылке в течение 10 и более лет после пересадки. Следовательно, облысение происходит не потому, что нарушается кровообращение. При наличии со стороны фолликулов, пересаженных на лысину, “спроса” на кровообращение оно “подается” в необходимом объеме в трансплантат, взятый из затылочной области. В этом нет ничего необыкновенного, если учесть, что даже в “ненужную” организму быстро растущую раковую опухоль врастают нормальные сосуды, обеспечивающие ее рост до огром-

ных иногда размеров. Значит, если на облысевших участках и ослаблено кровообращение, это, скорее, результат недостатка “спроса” на него со стороны не формирующих волосы фолликулов.

Так **ПОЧЕМУ** же волосы на бровях растут не так, как на лбу?

Дело в том, что в клетки бровей поступает на понятном им “языке” **сигнал** о том, в какой части тела они находятся, т.е. **“ПОЗИЦИОННАЯ ИНФОРМАЦИЯ”**. Этот сигнал и приводит ко “включению в работу” определенного ансамбля генов, определяющих режим роста волос. И хотя гены в клетках кожи лба и бровей одинаковы, но “список” включенных и выключенных генов оказывается на лбу и на бровях разным под действием разных сигналов, т.е. под действием разной позиционной информации, поступающей в клетки с одинаковым геномом. И, если мы не ограничиваемся абстрактными логическими гипотетическими построениями, а хотим серьезно подойти к ответу на вопрос **почему (волосы на коже бровей растут не так, как на лбу и скальпе или, скажем, кости плеча отличаются от костей предплечья и кисти)**, мы должны ответить на следующие вопросы:

- 1) Когда поступает позиционная информация (на какой стадии развития) в зачаток органа?
- 2) Откуда она поступает в данный зачаток органа?
- 3) В форме чего она поступает (как “кодируется”)?
- 4) Как она “прочитывается” клетками (“декодируется”)?
- 5) Как клетки реагируют на прочитанную информацию?
- 6) Как она фиксируется (“запоминается”) клетками?
- 7) Можно ли ее “стереть” из памяти клеток и, если можно, то как?
- 8) Можно ли нам самим ввести позиционную информацию в зачаток органа, не соответствующую его реальному расположению в теле зародыша, и заставить развиваться не тот орган, который развился бы без нашего вмешательства на этом месте?
- 9) Каковы взаимоотношения наследственности (генома) клеток и поступающей в них позиционной информации?

Все эти вопросы логически неизбежны, но ответы на них возможны лишь на основе изобретательных экспериментальных исследований, примеры которых были осуществлены, практически, только в 20-м веке. Первые исследования в духе такой постановки вопросов, приведшие к осмысливанию сути этих проблем и давшие примеры ответов на некоторые из приведенных вопросов, были осуществлены немецкими исследователями Шпеманом и Мангольд в 20х годах и удостоены Нобелевской премии за 1935 год.

Смысл позиционной информации, как мы говорили выше, указание клеткам **части тела**, в которой они находятся. Но для этого должно уже существовать само тело и его характерные места. Однако скажем, на стадии бластулы не видно в зародыше характерных частей тела. Они появляются позднее. Бластула амфибий, например, представляется радиально симметричной. У ней можно указать только одну ось, которая соединяет относительно бедный желтком анимальный полюс и наиболее богатый желтком вегетативный полюс. В теле же взрослой амфибии можно говорить о трех осях тела: 1) передне-задней (от

головы к хвосту), 2) дорзо-вентральной (от спины к животу) и 3) лево-правой осей.

“Задачей” развития радиально симметричной бластулы является “определение”, с какой стороны на ней будет развиваться голова, и с какой стороны спина. Иными словами, клетки должны получить позиционную информацию о своем месте (голова) **по отношению к другим частям тела, которых пока нет**. Ясно, что это невозможно. Но возможно “информировать” клетки об их положении относительно того, что, действительно, есть в бластуле (и даже раньше уже в яйцеклетке), т.е. относительно анимально-вегетативной оси. Материальным воплощением этой оси является, в частности, доля объема клетки занятого пассивным материалом желтком и активной собственно цитоплазмой. Эти показатели резко отличаются для клеток анимального полюса и для клеток вегетативного полюса и могут служить основой для разного их поведения в ходе морфогенеза, т. е. для выработки ими разных сигналов, включающих разные группы генов, контролирующих морфогенез ранних стадий. В яйцеклетках (вернее даже в овоцитах) эти различия в концентрации желтка видны уже в яичниках. Стабильность их обусловлена большей плотностью желтка, который под действием силы тяжести опускается на нижнюю сторону клетки, и после дробления разница между клетками, включившими в свой состав вегетативную перегруженную белком часть цитоплазмы яйцеклетки, и клетками, включившими бедную желтком активную цитоплазму, закрепляется появившимися у каждой клетки цитомембранами.

Анимально-вегетативная ось очень приблизительно соответствует будущей передне-задней оси тела амфибии (рис. 73). Во всяком случае, те из клеток бластулы, которые находятся на анимальном полюсе и те, которые вворачиваются в ходе гастрюляции и первыми продвигаются в сторону анимального полюса, образуют впоследствии передний конец тела, т.е. головные структуры. При этом нужно помнить, что вворачиваются первыми вовсе не структуры, расположенные в составе стенки бластулы ближе всего к анимальному полюсу. Совсем напротив. Первыми вворачиваются клетки, расположенные сравнительно далеко от анимального полюса, а позднее вслед за ними те, которые расположены ближе к анимальному полюсу. Иными словами, головные структуры формируются, с одной стороны, клетками у анимального полюса, а, с другой стороны, клетками, расположенными далеко от анимального полюса, но не теми, которые расположены посередине между ними на бластуле.

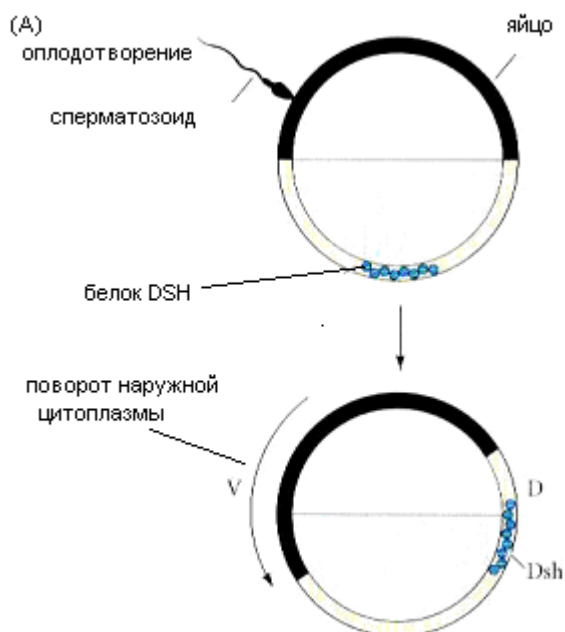


Рис.73 Механизм детерминации дорзовентральной оси у амфибий. Вверху: до момента оплодотворения яйцеклетка радиально симметрична: белок DSH расположен на вегетативном полюсе. После оплодотворения (внизу) наружный слой цитоплазмы (включая DSH и пигментированный слой цитоплазмы верхней половины) поворачиваются на 30 градусов, и со стороны входа спермии формируется вентральная сторона тела (V), а где DSH дорзальная (D). (S.F.Gilbert. "Developmental biology", 2003).

Для нас важно, что говорить о том, что анимальный полюс бластулы образует голову, неверно. Голову образуют и клетки вблизи анимального, и клетки вблизи вегетативного полюса.

“Смысл приказа”, передаваемого клеткам на стадии перехода от бластулы к гастрULE **при опоре** на сообщенную клеткам позиционную информацию, может быть интерпретирован, примерно, так: “клетки, расположенные **относительно анимально-вегетативной оси**, существенно ближе экватора бластулы **к вегетативному полюсу** должны вернуться в бластоцель и двинуться в нем **в направлении анимального полюса**”.

Выше мы отмечали, что бластула амфибий представляется радиально симметричной относительно анимально-вегетативной оси. В действительности, это не совсем так. У некоторых видов амфибий даже на глаз заметно присутствие недалеко от экватора в вегетативном “полушарии” бластулы, причем только с одной стороны от анимально-вегетативной оси группы клеток, отличающихся своей окраской из-за особенностей состава цитоплазмы. Эта группа клеток была названа “серым серпом”. Эта группа клеток соответствует участку цитоплазмы зиготы, который в неоплодотворенных яйцеклетках (овоцитах) отсутствует, но появляется вскоре после проникновения в цитоплазму яйцеклетки сперматозоида на стороне, противоположной той, куда проник сперматозоид. В дальнейшем именно в районе серого серпа начинается процесс вворачивания бластодермы и формируются структуры **спинной осевой мезодермы**, т.е. зачатки хорды и сомитов.

Таким образом, анимально-вегетативная ось в норме предопределяется еще на стадии овоцита неравномерностью (“градиентом”) концентрации желтка в разных участках цитоплазмы овоцита и, по-видимому с участием силы тяжести (гравитационного поля). Появление этой оси помогает предопределить положение головы, обеспечивая поступление в клетки позиционной информации об их положении относительно этой оси. С другой стороны, дорзо-вентральная

ось предопределяется точкой проникновения в яйцеклетку сперматозоида, вызывающего перемещение цитоплазмы яйцеклетки с образованием с противоположной стороны яйцеклетки цитоплазмы особого состава - “серого серпа”.

Белок Dsh (Disheveled) после дробления зиготы оказывается включенным ниже экватора бластулы в группу клеток энтодермы (рис. 73). Таким образом, первым презумптивным зародышевым листком, приобретающим дорзо-вентральную полярность у лягушек следует считать энтодерму.

Механизм действия белка Dsh в общих чертах сводится к следующему. По всему объему раннего зародыша на определенных этапах присутствуют: 1) транскрипционный фактор β -катенин; 2) протеинкиназа типа GSK-3, способная его инактивировать путем фосфорилирования. В свою очередь белок Dsh способен ингибировать ингибитор β -катенина (т.е. GSK-3). Dsh способен диффундировать на некоторое небольшое расстояние из области ниже экватора на будущей спинной стороне, где он оказался после поворота наружной цитоплазмы зиготы при оплодотворении. В результате, в области распространения Dsh киназа GSK-3 будет ингибирована, а в остальном эмбрионе она сохранится и ингибирует β -катенин. Таким образом, β -катенин останется только в области диффузии Dsh, т.е. в конечном счете, на спинной стороне энтодермы ближе к экватору (эта часть энтодермы получила название “ньюкуповский центр”).

Ньюкуповский центр играет важную роль в индукции презумптивной осевой мезодермы спины (зачатки хорды и сомитов), которая в свою очередь получила название “первичный организатор” (см. ниже). Под влиянием экспрессирующихся в энтодерме генов *Vg1* и *VegT* в ее клетках начинается экспрессия группы генов *Nodal-related* (т.е. “связанных с верхней губой бластопора”). Присутствие β -катенина усиливает экспрессию генов *Nodal-related*, что приводит к возникновению в энтодерме градиента концентрации этих белков: наивысшая концентрация на спинной стороне энтодермы, где присутствует β -катенин, а наименьшая на брюшной стороне. Кроме того, β -катенин включает в ньюкуповском центре транскрипцию гена *Siamois*. Клетки энтодермы, содержащие много белков *Nodal-related* и экспрессирующие ген *Siamois*, индуцируют в прилегающих клетках мезодермы (при участии белков энтодермы, кодируемых геном *TGF- β*) транскрипцию ключевого гена “первичного организатора” *Goosecoid*. Этот ген кодирует белок-регулятор активности ряда других генов, экспрессирующихся исключительно или преимущественно в первичном организаторе.

Энтодермальные клетки брюшной и латеральной сторон эмбриона, содержащие меньше белков *Nodal-related* индуцируют в презумптивных клетках вентральной и боковой мезодермы градиент концентрации белков паракринных факторов *BMP4* и *Xwnt8*, причем на этот раз наивысшая концентрация отмечается на вентральной стороне, а к первичному организатору она снижается. При высокой концентрации развиваются производные вентральной мезодермы (целомическая выстилка, наружные слои пищеварительной системы и пр.), а при меньшей концентрации производные промежуточной мезодермы (почки, гонады и пр.). При достаточно высокой концентрации белков *Nodal-related* в мезо-

дерме включается экспрессия гена *Xbra* (*Xenopus brachyury*), который является транскрипционным фактором, включающим ген паракринного фактора eFGF, который в свою очередь способен поддерживать экспрессию *Xbra* так, что экспрессия продолжается и после того, как индукторы белков Nodal-related перестают вырабатываться. Таким образом, в вентральной мезодерме надолго устанавливается экспрессия *Xbra*, одного из критически важных генов мезодермоспецифической экспрессии.

Итак, ньюкуповский центр индуцирует первичный организатор на стыке презумптивной спинной мезодермы с энтодермой. Индукция происходит с помощью вырабатываемого ньюкуповским центром белка *Siamois*. Для транскрипции его гена *Siamois* необходимо связывание его промоторной областью транскрипционного фактора Tcf-3, соединенного с β -катенином, присутствующим только в ньюкуповском центре. Белок *Siamois* в свою очередь является транскрипционным фактором, включающим во взаимодействии с белками, кодируемыми генами *Vg1* и *Nodal*, транскрипцию гена *Goosecoid*, который является ключевым для первичного организатора. Кодированный этим геном белок является транскрипционным фактором и прямо или через посредство других регуляторных белков включает транскрипцию генов паракринных и транскрипционных факторов, экспрессирующихся исключительно или преимущественно в первичном организаторе.

16.2. Опыты Г.Шпемана и “первичный организатор” и рождение понятий экспериментальной эмбриологии.

Для формулирования современных подходов и представлений к проблеме онтогенеза, как упоминалось выше, важную роль сыграли исследования Шпемана и его школы.

Презумптивное значение зачатка.

Для понимания опытов Шпемана нам предварительно необходимо усвоить важное понятие биологии развития “презумптивное значение” зачатка, которое возникло в связи с работами также немецкого исследователя Фогта. Сущность его подхода заключалась в следующем. Допустим, мы хотим узнать, какой орган или ткань получаются из вегетативного полюса бластулы амфибий или серого серпа. Фогт брал какую-нибудь “витальную” краску, т.е. краску, которая может проникнуть в цитоплазму клетки и окрасить, ее не причинив ей серьезного вреда, например, краситель нейтральный красный. Затем он пропитывал им кусочек геля, например, агар-агара, и маленький фрагмент такого пропитанного краской геля прикладывал к участку бластулы, судьба которого в процессе развития его интересовала, например, к анимальному полюсу бластулы, или вегетативному полюсу, или экватору бластулы на полпути между этими полюсами. После завершения гаструляции окрашенная группа клеток перемещалась в новое положение и принимала участие в формировании зачатка определенного органа, например, клетки вегетативного полюса оказывались в составе эпителия кишечника. Следовательно, презумптивное значение вегетативного полюса - энтодерма, а в дальнейшем кишечный эпителий и его произ-

водные. Таким путем была составлена карта презумптивного значения участков бластодермы (рис.74). Она позволяла, ориентируясь по положению (по “координатам”) участков бластулы относительно анимально-вегетативной оси и серого серпа (т.е. точки начала инвагинации и, следовательно, по будущей дорзо-вентральной оси) устанавливать, в какие ткани и органы данные участки бластулы превратятся.

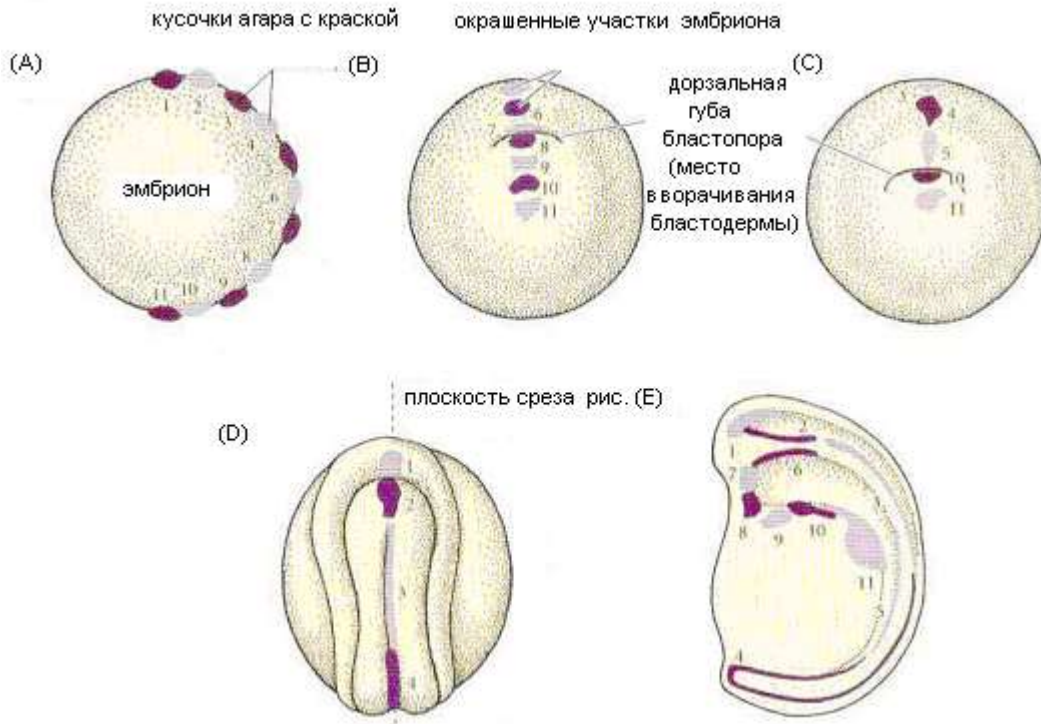


Рис. 74. Прослеживание Фогтом перемещений участков бластодермы в ходе последующего эмбриогенеза для определения их презумптивного значения. А) Нанесение 11 кусочков агара пропитанных витальными красками разного цвета на разные участки поверхности бластулы на будущей спинной стороне эмбриона от анимального до вегетативного полюсов бластулы тритона. В) начало перемещения окрашенных участков. Вид со спины и сзади. Дуга - образующееся впячивание - верхняя губа бластопора. С) То же на более поздней стадии. Участки 6, 7, 8 и 9 уже ввернулись в бластопор. D) Стадия нейрулы со спинной стороны. Метки 1-4 вошли в состав нервной пластинки - зачатка мозга. Сагитальный срез эмбриона. Видно, что участки 9-11 формируют переднюю часть дна гастроцеля (первичной кишки), развивающуюся в производные энтодермы. Метки 5, 6, 7, 8 оказываются в составе крыши и передней стенки первичной кишки (хорда и осевая мезодерма и передняя энтодерма). (По S.F.Gilbert. "Developmental biology", 2003).

Опыт Шпемана.

Презумптивная нервная трубка (зачаток головного и спинного мозга) располагается на бластуле, в “спинной” части анимального “полушария”. На “брюшной” стороне анимального полушария находится, в основном, презумптивный эпидермис. Если на стадии **ранней** гастрюлы с помощью микрохирургических инструментов:

- 1) удалить небольшой участок той части эктодермы, которая соответствует презумптивному эпидермису у эмбриона тритона,
- 2) на его место пересадить участок презумптивной нервной трубки дру-

того эмбриона той же стадии развития, то, вопреки своему презумптивному значению нервной ткани, трансплантат будет развиваться в направлении эпидермиса, и никакой нервной трубки из него не получится.

Если же этот опыт повторить на стадии **поздней** гаструлы (после того как под презумптивную нервную трубку переместится крыша первичной кишки, т.е. презумптивные хорда и сомиты), то трансплантат презумптивной нервной трубки даже оказавшись в окружении эпидермиса формирует вторую нервную трубку на брюшной стороне (в дополнение к той, которая естественным образом развивается на спинной стороне эмбриона).

Из этого следует, что между стадиями ранней и поздней гаструлы в эктодерме презумптивной нервной пластинки происходит физиологическое изменение, в результате которого эктодерма приобретает устойчивую тенденцию развиваться именно в нервную трубку.

Опыт можно поставить и иначе. У эмбриона на стадии ранней гаструлы можно вырезать верхнюю губу бластопора (т.е. вворачивающийся в бластоцель участок презумптивной хорды и сомитов) и пересадить (“трансплантировать”) другому эмбриону той же стадии развития в область презумптивного эпидермиса. Вворачивание хордо-мезодермы продолжится и в новом месте (рис.75). Хордо-мезодерма “подползает” под окружающий презумптивный эпидермис и индуцирует в нем развитие нервной трубки, а затем обеспечивает развитие и других осевых органов с последующим формированием двух сросшихся эмбрионов: один осевой комплекс (голова, позвоночник и пр.) развивается на основе собственной верхней губы бластопора эмбриона - реципиента на спинной стороне, а другой на основе пересаженной верхней губы бластопора эмбриона-донора на брюшной стороне эмбриона реципиента. Этот опыт не только подтвердил способность клеток верхней губы бластопора индуцировать нервную трубку в эктодерме, но и продемонстрировал разницу между эктодермой и губой бластопора ранней гаструлы в степени их детерминированности. Действительно, губа бластопора даже пересаженная в окружение презумптивного эпидермиса ведет себя так же, как и на своем “законном” месте, формируя хорду и осевую мезодерму (сомиты), т.е. она уже детерминирована. В то же время презумптивный эпидермис не детерминирован на этой стадии, так как способен превращаться в нервную трубку вместо эпидермиса. Таким образом, создавалось впечатление, что на стадии ранней гаструлы единственным детерминированным зачатком является верхняя губа бластопора - презумптивная осевая хордомезодерма. Ее детерминированность в сочетании со способностью индуцировать зачатки других органов представлялась организующей весь ход развития организма. Поэтому верхнюю губу бластопора называли **“первичным организатором”**.

Позднее были открыты многочисленные вторичные индукторы, в том числе индуктором многих позднее дифференцирующихся зачатков оказалась сама нервная трубка, индуцированная первичным индуктором. В свете этих данных онтогенез выглядит как своего рода древо, ствол которого является первичный индуктор, детерминирующий нервную трубку и некоторые другие зачатки, многие из которых являются, в свою очередь, индукторами других, позднее детерминирующихся зачатков, которые становятся индукторами еще

позднее развивающихся зачатков и т.д. до появления всех наиболее поздно детерминируемых зачатков. Некоторые из индукторов действуют даже

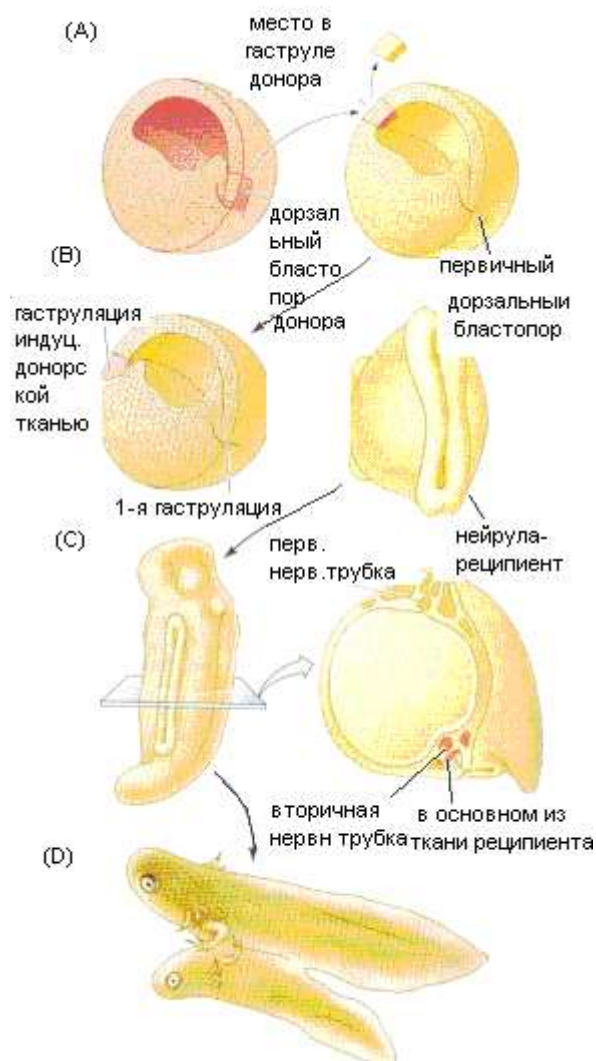


Рис. 75. Опыт Шпемана и Мангольд по индукции развития у эмбриона тритона дополнительной нервной системы с помощью трансплантации зачатка хордо-мезодермы (верхней губы бластопора) в область эмбриона, из которой развивается эпидермис. А) Верхняя губа бластопора вырезается у одного эмбриона (вид тритона с сильно пигментированными клетками) и пересаживается на место удаленного участка будущего брюшного эпидермиса другого эмбриона (вид с непигментированными клетками). В) У этого последнего в ходе вворачивания бластодермы в бластоцель и в нормальном месте и на месте, куда пересажена губа бластопора другого эмбриона, над ввернувшимися частями бластодермы формируются зачатки мозга - нервные пластинки. В месте пересадки добавочной губы бластопора нервная пластинка образуется из непигментированной эктодермы, которая развилась бы без пересадки губы бластопора не в мозг, а в эпидермис живота. С) и D) Как пигментированные клетки трансплантата, так и взаимодействующие с ними непигментированные клетки эмбриона-хозяина образовали также дополнительные осевые структуры тела так, что получился, по существу, второй эмбрион - сиамский близнец основного. (По S.F.Gilbert. "Developmental biology", 2003).

у взрослых животных (например, соединительнотканый сосочек луковицы волосяного фолликула способен индуцировать волосяной фолликул в эпидермисе мошонки мыши, где в норме волосы отсутствуют).

Более того, выяснилось, что есть индукции более ранние, чем те, которые осуществляет первичный организатор. Следовательно, строго говоря, первичный организатор не является первичным, а сам в известном смысле оказывается индуцированным при взаимодействии клеток вегетативного полюса, богатых желтком, со слоем клеток, расположенных вблизи экватора.

16.3. Теоретическое значение опытов Шпемана и основные понятия экспериментальной эмбриологии ("механики развития").

На основе этого и других аналогичных экспериментов сложились следующие понятия экспериментальной эмбриологии ("механики развития", как не

совсем удачно была названа эта сторона эмбриологии; на базе современной общенаучной терминологии лучше было бы назвать этот раздел “информационная система развития”).

Эмбриональная индукция - воздействие одного эмбрионального зачатка (органа или ткани) на другой, в результате которого в последнем происходит скрытое гистофизиологическое изменение, обуславливающее его последующую дифференцировку в направлении определенного органа или ткани даже при пересадке в новое тканевое окружение.

Индуктор - 1) зачаток, вызывающий индукцию другого зачатка,

2) химический (или иной) агент, выделяемый индуцирующим зачатком, посредством которого достигается индукция.

Компетенция - способность зачатка реагировать на индукционное воздействие. Процесс приобретения зачатком компетенции иногда называют **инструктирующей индукцией**. Когда индуктор, вызывающий сам процесс дифференцировки не создает компетенцию, а только “запускает” ее реализацию (“триггерный эффект”), такой индуктор называется “разрешающим” (“**пермиссивным**”). Иногда с его помощью уточняется локализация развития зачатка органа. В других случаях пермиссивный индуктор даже не носит локального характера (например, **индуктор эндокринного типа**, приносимый кровью). Примером может служить индукция роста волос бороды и усов под действием мужского полового гормона у мужчин или индукция метаморфоза головастика лягушки (т.е. гибели клеток личиночных структур, например, хвоста головастика, но не взрослых структур) гормоном щитовидной железы.

Детерминация зачатка - **скрытое** гистофизиологическое изменение, обуславливающее его последующую дифференцировку в направлении определенного органа или ткани даже при пересадке в новое тканевое окружение, наступающее в результате индукции. В литературе на английском языке в близком по значению смысле к термину детерминация употребляется термин **commitment** (“**фиксирование**” в памяти).

С этой точки зрения, **дифференцировка** (зачатка)- это **явное** проявление на морфологическом и биохимическом уровнях первоначально **скрытых** изменений зачатка, создающих его видимые отличия от первоначально сходных с ним соседних частей.

Эпигенетическая наследственность

Тот феномен развития, который описывается “совокупностью” терминов **детерминация и дифференцировка** позднее получил еще одно название “**эпигенетическая наследственность**”. Сущность его можно проиллюстрировать следующим простым опытом. У мыши выделяют кусочек почечного эпителия и фибробластов кожи, помещают в одну и ту же культуральную среду, позволяют клеткам выйти из кусочков и начать делиться. Генотип клеток почки и фибробластов один и тот же, так как они выделены из одной и той же мыши. С другой стороны, они находятся в одной и той же среде. Тем не менее почечный эпителий остается именно почечным эпителием, а фибробласты сохраняют свою тканевую специфику. Чем же объясняется теперь разница между клетками

этих тканей в культуре? Наследственность одна и та же. Среда одна и та же. Что же разное? - То, что обуславливает это различие между клетками разных тканей одного организма и есть эпигенетическая наследственность.

Генетическая наследственность, согласно замечательно лаконичной формулировке выдающегося русского генетика Тимофеева-Рессовского, “основана на конвариантной репликации ДНК”, т.е. на способности молекулы ДНК определять структуру вновь синтезируемой молекулы ДНК, иначе говоря “снимать с себя копию”, “реплицироваться”, причем даже в том случае, если структура ДНК подверглась случайному изменению - мутации (“конвариантная” репликация). В отличие от генетической, **эпигенетическая наследственность основана на способности клеток поддерживать “включенными” одни гены и “выключенными” другие гены при сохранении неизменной первичной структуры ДНК.** При этом списки включенных и выключенных генов в клетках разных тканей (т.е. при разных вариантах клеточной дифференцировки) оказываются различными. Под “включением” генов подразумевается, прежде всего, запуск его транскрипции, т.е. синтез “на нем” кодируемой данным геном РНК. Выключенный ген - это ген, транскрипция которого подавлена (“репрессирована”). “Включение” гена часто называют “дерепрессией”.

Несколько жаргонно-образный термин “включение гена”, применяемый для первого приближения к описанию природы эпигенетической наследственности, с точки зрения сущности молекулярнобиологических процессов, составляющих функцию гена в клетке, слишком условен. При более конкретном анализе этой функции более принят термин “экспрессия” гена, подразумевающий не только управляемую во времени его транскрипцию, но и дальнейшие этапы развития его функции, в частности процессинг РНК, трансляцию (синтез белка) и активацию биохимической функции синтезированного белка ферментами типа протеинкиназ и иными средствами.

Таким образом, сущностью эпигенетической наследственности является способность отдельных клеток или их ансамблей к устойчивому самоподдержанию возможности транскрипции одних генов и исключению существенной транскрипции других. К механизмам этой устойчивости мы еще вернемся позднее.

Теоретическое значение работ Шпемана и Мангольд исключительно велико, и присуждение им Нобелевской премии - естественная дань признательности этим выдающимся исследователям. Выработанные понятия и теоретические представления революционизировали науку об онтогенезе, которая из описательной и сравнительной по своим теоретическим подходам превратилась в экспериментальную “физиологическую” дисциплину со своими специфическими понятиями и подходами. Естественно, и до них проводились эксперименты на развивающихся эмбрионах, но они сами по себе не привели к созданию глубокой общей теории онтогенеза.

С позиций приведенной выше проблемы передачи позиционной информации Шпеману и его сотрудникам удалось на примере первичного индуктора ответить, по крайней мере, на 2 из перечисленных выше вопросов, связанных с этой проблемой:

1) Когда поступает позиционная информация (на какой стадии развития) в зачаток органа (в презумптивную нервную трубку)? - На стадии гаструляции.

2) Откуда она поступает в данный зачаток органа? - Из презумптивной хордомезодермы (верхней губы бластопора).

Попутно были осмыслены такие важные теоретические положения:

а) **Компетенция зачатка (скажем, нервной трубки) может быть шире его презумптивного значения.** Иными словами, из презумптивного эпидермиса может развиться не только эпидермис, но и другие ткани (в частности, нервная трубка (когда под презумптивный эпидермис помещают индуктор нервной трубки - зачаток хорды).

б) **Область компетенции к данному индукционному воздействию может быть шире области презумптивного значения индуцируемого органа.** Иными словами, реагировать на индуктор (в данном случае на хордомезодерму) способна не только та часть эктодермы, которая является презумптивной нервной трубкой), но и другие части эктодермы (презумптивный эпидермис).

в) **Презумптивное значение зачатка обусловлено не тем, что именно его клетки одни способны реагировать на индукционное воздействие, а тем, что они расположены в той части эмбриона, которая оказывается в ходе морфогенеза в необходимой близости от перемещающегося сюда индуктора данного зачатка - хордомезодермы.** Иными словами, в нервную трубку превращается область эктодермы, оказавшаяся в контакте с хордомезодермой. В норме это та часть эктодермы, которая лежит “над маршрутом” перемещения индуктора (хордомезодермы) и приходит с ним в контакт. Вот почему именно эта часть эктодермы является презумптивной нервной трубкой.

16.4. Другие примеры индукционных воздействий.

Одним из классических объектов механики развития стал глаз позвоночных. Принципиальный интерес глаза как объекта обусловлен тем, что важнейшая его часть, представленная во взрослом состоянии сетчаткой (относящейся по своей структуре к нервной ткани) представляет собой по происхождению выступ нервной трубки. Последняя, как мы помним, индуцируется на стадии гаструлы зачатком хордомезодермы, т.е. первичным организатором (условно **первичная индукция**). Этот зачаток сетчатки - выпячивание нервной трубки “**глазной пузырь**” оказался, в свою очередь, способным играть роль индуктора другой части глаза - **хрусталика**, который развивается из подвергшейся индукционному воздействию глазного пузыря части эктодермы головы. Выдвигающийся из той части головного отдела нервной трубки, которая соответствует промежуточному мозгу, глазной пузырек в ходе роста в латеральном направлении достигает эктодермы головы и входит в контакт с ней (Рис.58). **При таком контакте происходит индукция хрусталика в области контакта (условно вторичная индукция).**

Детерминированный как хрусталик участок эктодермы утолщается (“**хрусталиковая плакода**”) и вворачивается в медиальном направлении, принципиально, также как нервная трубка, только не в виде желобка, а в виде шарика

(“хрусталиковый пузырек”). Хрусталиковый пузырек отделяется (“отшнуровывается”) от эктодермы на поверхности головы 5) и эктодерма смыкается над погружившимся под нее хрусталиковым пузырьком, который оказывается полукруглым вогнувшимся, как дырявый мяч, бывшим глазным пузырьком, сохраняющим свою связь с промежуточным мозгом через “стебелек”. Вогнутый хрусталиком глазной пузырек со стебельком получил название **глазного бокала**. Из его наружного слоя развивается **пигментный эпителий**, а из внутреннего слоя **сетчатка глаза**, состоящая из нейронов и палочек и колбочек, которые также можно рассматривать как специализированные нейроны. Края глазного бокала (обращенные к эктодерме, и частично охватывающие хрусталик) участвуют в формировании радужной оболочки глаза и соответствуют краям зрачка взрослого животного. Позднее клетки соединительно-тканного характера образуют вокруг пигментного эпителия глаза сосудистую оболочку и склеру, а под эпителием эктодермы над глазом появляется упорядоченная соединительная ткань роговицы.

Для ряда исследованных видов амфибий и в этом случае показано, что область компетенции эктодермы к индукции хрусталика гораздо шире области его презумптивного значения. Пересаженный под латеральную эктодерму (позади головы) удаленный глазной пузырек способен и там индуцировать развитие хрусталика и всего глаза. Развивается головастики с третьим глазом на боку.

Аналогично хрусталику от эктодермы головы, но несколько позднее отшнуровывается **слуховой пузырек (зачаток внутреннего уха, т.е. улитки и полукружных каналов)**, который индуцируется зачатком **продолговатого мозга**. Слуховой пузырек, в свою очередь, индуцирует соединительно-тканную капсулу, которая его окружает и в конечном счете становится частью скелета черепа, заключающей в себе внутреннее ухо и т.д.

Есть основание полагать, что эктодерма последовательно приобретает (а позднее теряет) компетенцию в отношении индукторов нервной трубки, затем хрусталика и, наконец, глазного пузырька.

Тканевая дифференцировка не всегда связана с передачей именно позиционной информации. Известно, что стволовая клетка костного мозга, имеющая облик лимфоцита способна размножаться и формировать целые колонии в селезенке облученных мышей подобно тому, как на агаровой среде из одной бактерии вырастает колония таких бактерий. Однако между бактериальной колонией и колонией из стволовой клетки есть большая разница. По мере деления стволовой клетки костного мозга клетки становятся разными: одни становятся предшественниками эритроцитов, другие сегментоядерных лейкоцитов, третьи макрофагов и т.д. Вряд ли можно ожидать в колонии локального воздействия какого-то внешнего по отношению к колонии зачатка, индуцирующего развитие одних клеток колонии в сторону макрофагов, а других в сторону эритроцитов. Тем не менее дифференцировка наступает, причем, по видимому, нет связи между местом в колонии и направлением дифференцировки. Здесь приходится говорить о самоиндукции дифференцировки клеток, которая возможна в разных направлениях с определенной вероятностью. Возможно, клетки вырабатывают несколько аутоиндукторов разных направлений и

в случае начала реакции на один из них клетка теряет компетенцию к реакции на все остальные.

16.5. Общие представления о молекулярной природе компетенции, индукции и детерминации.

В ряде случаев удалось показать, что роль **веществ-индукторов играют белковые факторы с паракринным действием**, т.е. способные диффундировать из зачатка-индуктора вглубь компетентной ткани на незначительную глубину, порядка нескольких слоев клеток и меньше. Например, роль вещества-индуктора конечности у куриного эмбриона может играть белок FGF-10, т.е. фактор роста фибробластов. Если этим белком пропитать бусинку из

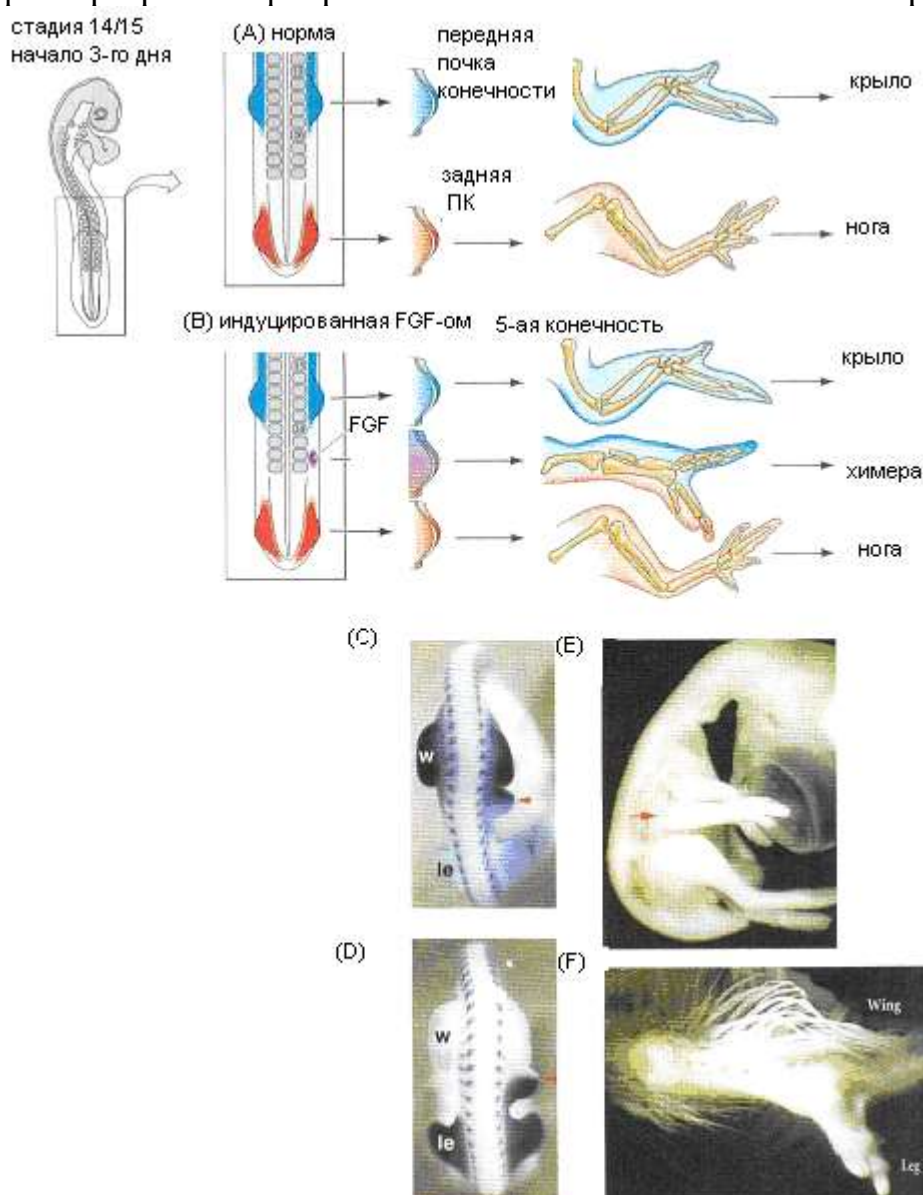


Рис. 76. Индукция 5й конечности у эмбриона курицы с помощью индуктора - фактора роста фибробластов (FGF), которым пропитали бусинку гидрофильного геля и поместили ее под боковую эктодерму между передней и задней почками конечностей. Слева вверху - общий вид трехдневного куриного зародыша. А) Участок туловища зародыша с передней и задней почками конечности. Справа - скелет крыла и ноги, развивающихся из передней и задней конечности. В) Место трансплантации бусинки с FGF. Справа - нормальные скелеты перед-

ней и задней конечности и “химерный” скелет добавочной пятой конечности, совмещающий признаки крыла и ноги. С) Экспрессия (черная окраска) гена **Tbx5** в почках передних (W), но не задних (le) конечностей, а также в передней половине добавочной почки конечности (стрелка). D) Аналогично экспрессия гена **Tbx4** в задней, но не в передней почке конечности и в задней части дополнительной почки конечности. E) Поздняя стадия развития цыпленка с индуцированной дополнительной конечностью (стрелка). F) Развившаяся “химерная” добавочная конечность. (По S.F.Gilbert. “ Developmental biology”, 2003).

гидрофильного геля и поместить ее под эктодерму бока эмбриона между презумптивными передней и задней конечностями, то в этом месте в дополнение к нормальным конечностям развивается 5я конечность (рис. 76). В норме этот агент вырабатывается двумя сегментами латеральной мезодермы: 1й сегмент расположен впереди 21 сомита (передняя конечность), а второй позади 25го сомита (задняя конечность). Мезодерма на уровне 21-25 сомитов в норме не вырабатывает FGF-8. Однако, если напротив этих сомитов поместить бусинку с FGF-8, она индуцирует добавочную конечность и в этом отделе.

Приобретение зачатком компетенции (способности реагировать на вещество-индуктор) - это нередко синтез в клетках белковых молекул-рецепторов. Они способны вступать в стереохимически специфическую связь с молекулами вещества-индуктора, и запускают после присоединения индуктора каскад реакций, приводящих к детерминации и дифференцировке этого зачатка. Это происходит например, путем “включения” в клетках зачатка транскрипции гена, кодирующего белок-регулятор, в свою очередь, включающий ансамбль генов, транскрипция которых необходима именно для морфогенеза зачатка данного органа.

Некоторые индукции не носят строго локального характера, как индукция хрусталика (глазной пузырек - > хрусталик) или нервной трубки (хорда -> нервная трубка). В этом случае локальность действия индуктора определяется не локализацией индуктора-зачатка, а локальной компетенцией. При этом индукция носит не инструктивный, а перmissive характер и нередко наступает под действием не паракринных, а эндокринных факторов, т.е. вещества-индукторы доставляются из эндокринных желез током крови. Примером может служить индукция метаморфоза головастика в лягушку. Метаморфоз достигается массовой гибелью (апоптозом) личиночных популяций клеток, индуцируемой тироксином (гормоном щитовидной железы). Компетенция к его действию личиночных клеточных популяций обусловлена синтезом рецепторов к тироксину. Белок - рецептор тироксина после присоединения молекулы этого гормона приобретает способность формировать димер с другим белком и эта “тройка” (гормон и два белка) проявляют свойства транскрипционного комплекса, т.е. присоединившись к промоторам генов, кодирующих белки апоптозной реакции клеток приводят к “самоубийству” этих клеток. К моменту начала метаморфоза во многих тканях головастика наряду с компетентными личиночными популяциями клеток появляются популяции некомпетентных “взрослых” клеток, по-видимому, лишенных рецепторов к тироксину. По мере гибели многочисленных клеток личиночных популяций их замещают в дефинитивных органах популяции “взрослых” клеток. В некоторых (не сохраняю-

щихся у взрослых лягушек) личиночных органах, например хвосте, погибают все клетки и такие органы целиком резорбируются.

Таким образом, молекулярной основой компетенции является присутствие в клетках молекул-рецепторов к индуктору. Молекулярной основой индукции является секреция зачатком-индуктором соответствующего паракринового или иного типа вещества-индуктора, а основой детерминации - запуск транскрипции и трансляции тканеспецифичных белков или сочетаний белков. Все это - частные проявления известных нам из общей цитофизиологии феноменов.

16.6. Принцип двойного обеспечения индукции и эволюция индукционных механизмов. Специфичность индукционных механизмов.

При изучении индукции зачатков некоторых органов у разных близких видов и родов было установлено, что иногда при удалении “главного” зачатка-индуктора до его воздействия на компетентную ткань развитие индуцируемого органа в ней все же происходит и без него, хотя часто не вполне типично. Так обстоит дело с развитием хрусталика у некоторых амфибий. У одних видов амфибий удаление глазного пузырька до индукции хрусталика предотвращает развитие последнего, тогда как у других хрусталик все же появляется даже в этом случае. Оказалось, что здесь индукторами могут служить наряду с глазным пузырьком (который и в этом случае является наиболее сильным индуктором) также энтодерма глотки, которая раньше глазного пузырька приходит в контакт с областью презумптивного хрусталика, а позднее мезодерма презумптивного сердца, также приходящая в район презумптивного хрусталика. Это интересное явление было названо принципом “двойного обеспечения”. Эволюционный смысл данного явления можно представить, если принять во внимание следующие моменты.

1) Компетенция эктодермы к формированию той или иной структуры означает готовность в ее клетках (из разных участков) цепи событий, ведущих к преобразованию ее клеток в клетки этой структуры (в данном случае хрусталика), причем для начала цепи реакций не хватает только спускового механизма - “триггера”. **Нередко подобная система может “запускаться” далеко не только единственным (естественным) агентом.** Приведем два примера. Один, связанный с рождением самого термина триггер (спусковой крючок огнестрельного оружия). “В норме” для выстрела патрона необходимы: спусковой крючок, затвор с пружиной, боек или курок, бьющий по капсюлю, сам капсюль, вызывающий детонацию пороха, выбрасывающего пулю. Однако можно вызвать выстрел и безо всей этой сложной “механики”, бросив патрон в костер. В этом случае для выстрела не требуется ни затвора, ни пружины, ни бойка. Примитивный фактор - высокая температура вызовет взрыв пороха. Аналогичный пример из биологии. Опасный нагрев (но не смертельный) может запустить развитие эмбриона в неоплодотворенной яйцеклетке бабочки, т.е. в этом смысле нагрев запускает начало дробления вместо проникающего в яйцеклетку сперматозоида, который в норме играет роль триггера дробления. Другой пример. Мышца в норме сокращается под влиянием пришедшего по нерву возбуждения. Но сокращение можно вызвать и, капнув на мышцу, разбавленную соля-

ную кислоту, т.е. крайне примитивным воздействием - сильным понижением рН окружающей мышцу среды.

2) Индуцировать, скажем, нервную трубку в эктодерме можно **не только естественным зачатком-индуктором**, т.е. хордой. Оказалось, что, если под эктодерму на стадии гастролы поместить кусочек печени морской свинки (т.е. заведомо чужеродный фактор), он индуцирует в эктодерме нервную трубку, во всяком случае, ее часть, соответствующую переднему мозгу. Это не значит, конечно, что любой чужеродный агент способен быть индуктором нервной трубки. Например, если под эктодерму поместить кусочек костного мозга морской свинки, нервная трубка не развивается, но индуцировались некоторые мезодермальные структуры.

Каким же образом чужеродный фактор - печень морской свинки способен индуцировать нервную трубку? Тут существуют целый набор возможностей. Например, печень может оказывать грубое воздействие на эктодерму посредством присутствующих в ней сильно действующих веществ (т.е. по типу действия соляной кислоты на мышцу, но, конечно, менее разрушительного). С другой стороны, нельзя исключить "случайного" содержания в печени и выделения (или присутствия на поверхности ее клеток) специфического химического агента, идентичного или химически очень близкого к нормальному индуктору, имеющемуся в зачатке хорды амфибий. Во всяком случае, в костном мозгу морской свинки ничего подобного не содержится.

Интересно, что ни печень, ни костный мозг не способны порознь индуцировать спинной мозг у зародыша при пересадке под эктодерму гастролы. Но при пересадке под эктодерму и кусочка печени, и кусочка костного мозга, помимо переднего мозга и мезодермальных осевых структур индуцируется и спинной мозг. Это объясняется тем, что для развития спинного мозга нужно последовательное воздействие на презумптивный зачаток нервной трубки обоих индукторов, т.е. содержащегося в печени и содержащегося в костном мозгу. В норме им соответствуют два индуктора, содержащиеся один в передней части крыши первичной кишки, а другой в ее задней части.

3) В свете этих данных можно предположить, что в зачатках глотки и сердца содержится то же вещество - индуктор хрусталика, что и в главном индукторе - глазном пузырьке, причем у одних видов амфибий в достаточном, а у других в недостаточном для индукции количестве.

Другая возможность заключается в том, что природе "посчастливилось" подобрать два или три разных вещества-индуктора хрусталика (выделяемых, соответственно, глазным пузырем, зачатком глотки и зачатком сердца), способных запускать реакцию превращения эктодермы в хрусталиковый пузырек, т.е. три неодинаковых ключа, открывающих один замок. В любом случае, это три "повторения" одной и той же позиционной информации (о месте развития хрусталика на поверхности эктодермы головы).

В этой связи уместно вспомнить интересное высказывание одного из двух прославленных открывателей структуры ДНК Крика. Он предупреждал об опасности заходить слишком далеко в аналогизации работы мозга и компьютера. "Компьютер создается на основе строгих математических принципов, а мозг

[в ходе эволюции] “подбирает, что попало, лишь бы работало”. Кстати, эта мысль у него родилась после его исследований в области экспериментальной эмбриологии.

Представим себе, что какой-то биологический агент появляется в таком месте и в такое время, что он мог бы служить для передачи позиционной (и/или временной) информации, запускающей развитие

органа. В этом случае у данного агента есть шанс превратиться в ходе филогенеза в соответствующий биологический сигнал (индуктор зачатка органа) путем формирования или, скорее, адаптации существующей трансдукционной цепочки к данному агенту, в которой он и станет первым звеном.

Из всего сказанного видно, что экспериментальная биология развития смогла сформулировать на сегодня больше вопросов, касающихся передачи позиционной информации, чем решить. Однако и это следует признать серьезным прогрессом в понимании одних из самых трудных, важных и интересных проблем современной общей биологии. В последние годы и десятилетия наблюдается бурный прогресс в исследовании проблем передачи позиционной информации в ходе развития отдельных органов. В следующей главе будут приведены примеры исследований в этом направлении.

ГЛАВА 17. ПРИМЕРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНАЛИЗА НЕКОТОРЫХ ЭТАПОВ ОНТОГЕНЕЗА

17.1. Свойства и роль первичного организатора

Клетки первичного организатора формируют в ходе развития верхнюю губу бластопора, т.е. область, где начинаются первые движения вворачивания. Из верхней губы бластопора образуются следующие **структуры** (в порядке от головного конца к хвосту) :

1) энтодерма глотки, 2) мезодерма головы (прехордальная пластинка и ее производные), 3) зачаток хорды (Рис. 77)

Важнейшие **функции** первичного организатора сводятся к следующему: 1) способность к самодифференцировке в прехордальную пластинку и хордомезодерму (“детерминированность”), 2) способность индуцировать дорзализацию (превращение в сомиты) окружающей мезодермы, 3) способность дорзализовать эктодерму, обеспечивая ее превращение в нервную трубку, 4) способность запустить клеточные процессы, связанные с гастрულიей (инвагинация, миграция крыши архентрона к будущему переднему концу тела по отложенным на внутренней стороне крыши бластоцеля волокнам фибронектина.

На основе молекулярно-генетических методов удалось показать, что “индуцирующее” действие клеток первичного организатора на эктодерму и мезодерму (пункты 2 и 3) у лягушек достигается на стадии гастрюлы с помощью паракринных факторов (таблица №), кодируемых генами специфично экспрессируемыми именно в первичном организаторе. Механизм действия этих факто-

ров, как оказалось, сводится не к “активной” индукции дифференцировки нервных клеток, а к предотвращению индукции в этих клетках дифференцировки в направлении эпидермиса. Индукция эпидермиса делает невозможным развитие в направлении дифференцировки нервной трубки и в дальнейшем мозга.

Таблица - Некоторые важнейшие паракринные белки-”индукторы”, кодируемые одноименными генами, экспрессирующимися исключительно или преимущественно в первичном организаторе

Название (и место экспрессии) белков-”индукторов”	Некоторые функции белков и механизм их действия
Noggin, Chordin, Xnr-3 Follistatin (зачаток хорды)	Связываются с паракринными факторами типа BMP4 и BMP2 и тем самым мешает их присоединению к клеткам презумптивной нервной ткани и дорзальной мезодермы, предотвращая их превращение в эпидермис и вентральную мезодерму, соответственно
Frzb (прехордальная пластинка мезодермы)	Связывается с паракриновым белком Wnt и предотвращает его контакт с рецептором Wnt в клетках эктодермы и мезодермы, что необходимо для развития передних отделов мозга и других головных структур
Dickkopf (прехордальная пластинка мезодермы)	Связывается с рецепторами Wnt в клетках эктодермы и мезодермы. Действие аналогичное Frzb.
Cerberus (энтодерма глотки)	Связывается с паракринными факторами BMP, Nodal, Xwnt8 и блокирует их ингибирующее действие на эктодерму презумптивных передних отделов головного мозга, носа, глаз, присосок, позволяя тем самым развиваться этим зачаткам, вместо эпидермиса или задних отделов мозга, в которые дифференцируется эктодерма при свободном действии всех или некоторых из этих факторов

В норме индуктором дифференцировки эктодермы в направлении эпидермиса, а мезодермы в направлении кровеносной системы и целомической выстилки полости тела и ее производных являются паракринные факторы серии BMP (в частности BMP2 и BMP4). Эти паракринные факторы сначала транскрибиру-

ются во всей эктодерме и мезодерме поздней бластулы. Там, где на их основе синтезируются белки, способные связываться с рецепторами эктодермы и мезодермы, в этих тканях начинается экспрессия генов (в частности, *Xvent1*, *Xmsx1*, *Vox*, *Xom*), направляющая дифференцировку эктодермы в сторону эпидермиса, а мезодермы в сторону развития кровеносной системы и др. производных вентральной мезодермы. В первичном организаторе на стадии гастрюлы в зачатке хорды синтезируются паракринные белки, кодируемых генами *chordin*, *noggin*, *follistatin*, *cerberus* и др. Эти белки диффундируют из хорды, связываются с BMP, и тем самым предотвращают соединение BMP с их рецепторами в клетках дорзальной эктодермы и мезодермы. В результате дифференцировка клеток будущей нервной системы в эпидермис, а мезодермы спинной стороны в органы кровообращения становится невозможной, что и позволяет в дальнейшем этим клеткам дифференцироваться в нервную систему и сомиты, дающие начало осевому скелету, мышцам спины и конечностей и кориуму кожи (Рис. 77).

Для развития наиболее передних структур головы, в том числе, передних отделов головного мозга нужно подавить не только воздействие BMP на эктодерму, формирующую в будущем мозг. Необходимо также подавить и воздействие на эти клетки паракринных белков семейства Wnt, в частности, *Xwnt8*, выделяемого вентральной и латеральной, но не осевой мезодермой. *Xwnt8* делает невозможной дифференцировку клеток эктодермы в передний мозг, если соединится с рецепторами к нему у соответствующих клеток нейральной эктодермы. *Xwnt8* не оказывает соответствующего действия, если домен его молекулы, “предназначенный” для соединения с рецепторами клеток нейральной эктодермы, оказывается “занятым” паракринными агентами, выделяемыми энтодермой зачатка глотки (*Cerberus*) или мезодермой прехордальной пластинки (*Frzb*). Другой способ предотвращения действия *Xwnt8* заключается в соединении паракринного агента медуллярной пластинки (*Dickkopf*) с самими рецепторами к *Xwnt8* в клетках нейральной эктодермы. Сам по себе *Dickkopf* не вызывает такой активации рецептора, как *Xwnt8*, но мешает молекулам последнего соединиться с рецепторами, которые оказываются таким образом заблокированными.

Специфичность и универсальность действия белка, кодируемого геном *Cerberus*, настолько велика, что при введении на ранней стадии дробления (32-клеточный зародыш) в один из брюшных вегетативных бластомеров иРНК, транскрибированную на гене *Cerberus*, то у развивающегося эмбриона на задней части туловища развиваются дополнительные головные структуры (Рис. 79'''). При этом в их формировании принимают участие не только потомки клеток, в которые ввели иРНК *Cerberus*, но и окружающие “местные” клетки, подвергшиеся индукционным воздействиям со стороны дифференцирующихся клеток, в которые ввели *Cerberus*.

Изложенные данные суммированы на рис. 77:

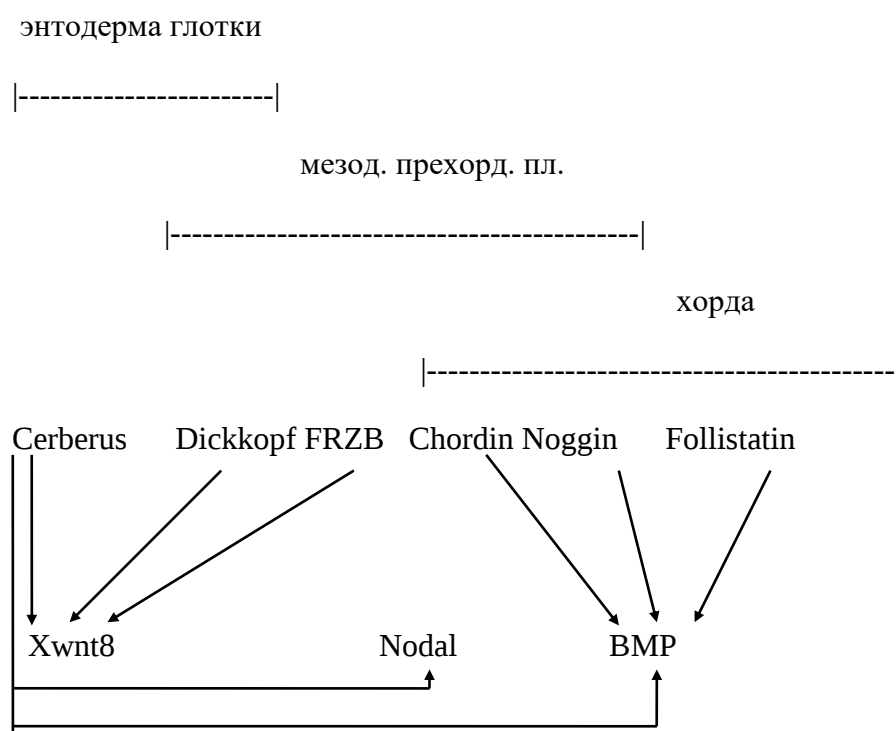


Рис. 77. Схема ингибирующего воздействия (стрелки) паракриновых белков, синтезируемых производными первичного организатора, на индукторы эпидермиса BMP и Nodal, а также на эффективность ингибитора развития переднего мозга Xwnt8. Пунктирными линиями, ограниченными вертикальными черточками, показано взаимное расположение производных первичного организатора и области организатора, синтезирующие соответствующие разные ингибиторы.

Предотвращение производными первичного организатора индуцирующего эпидермис воздействия BMP приводит к запуску каскада реакций, ведущих к включению генов, специфично экспрессирующихся в зачатке нервной системы. Ниже приведены некоторые элементы этого каскада:

Отсутствие воздействия BMP на эктодерму --> низкое отношение концентрации белков Smad1 / Smad7 --> экспрессия нейтрализующих транскрипционных факторов SoxD и Xrou2 --> экспрессия ключевого для развития нервной трубки гена neurogenin --> экспрессия гена neuroD --> нейральная дифференцировка.

Каскад альтернативной дифференцировки в эпидермис выглядит следующим

образом:

Воздействие BMP на эктодерму --> высокое отношение концентрации белков Smad1 / Smad7 --> совместное действие Smad1 и Smad 4 --> экспрессия эпидермализирующих факторов Msx1, GATA1, Vent --> экспрессия гена LEF1 --> дифференцировка эпидермиса.

На примере первичного организатора видно, что то, что мы называем индукцией, может носить характер не столько активного воздействия, включающего экспрессию тканеспецифичных генов индуцируемой ткани, сколько действия по предотвращению развития в направлении альтернативной дифференцировки (в направлении эпидермиса) и сохранения тем самым потенции к иной дифференцировке (в нервную ткань).

17.2. Развитие конечностей.

Экспериментальный анализ развития конечностей позвоночных как пример попытки комплексного микрохирургического и молекулярно-генетического подхода к решению фундаментальных проблем биологии развития.

Конечность представляет собой орган с морфологически сложной структурой и на ее примере целесообразно рассмотреть круг морфогенетических процессов, которые “задействованы” в развитии этого органа и сведения о генетическом “обеспечении” этих процессов.

В формировании конечности участвуют:

I. Клеточная и тканевая дифференцировка в узком смысле этих слов, т.е., прежде всего, образование “классических” тканей - костной, мышечной, эпидермиса с его производными, сухожилий, кориума и др.

Главным признаком дифференцировки клеток этих тканей на ее завершающем этапе является синтез белков главной функции этих тканей, которые не являются сами по себе специфичными именно для конечности, а тем более для того или иного ее сегмента.

Действительно, поперечно полосатые мышцы, например, встречаются не только в конечностях, но и на ребрах, на спине в области позвоночника, на голове. То же можно сказать о костной ткани, дерме и эпидермисе. Белками “главной” функции каждой данной ткани во всех органах являются, в частности, актин и миозин для мышц, коллаген для соединительной ткани и т.д. Эти белки, не отличаются в конечностях от аналогичных белков в других органах, а если некоторые из них и отличаются, то очень слабо, так, что эти различия не могли бы определять главные черты специфики формообразовательного процесса в конечности.

Эпидермис конечности происходит из эктодермы латеральной поверхности эмбриона. Кориум, хрящевая и костная ткань из боковой пластинки (париетального листка вентральной мезодермы), а мышечная ткань из мезенхимы сомитного происхождения (миотома наиболее краниального сомита грудного от-

дела туловища). Передний краниальный край грудной клетки определяется передней (краниальной) границей экспрессии гена Нохс-6 как у птиц, так и у млекопитающих, хотя номер первого грудного позвонка у птиц и млекопитающих не совпадает, так как в состав шеи млекопитающих входит только 7 позвонков, а у курицы, например, гораздо больше.

Это с новой стороны освещает проблему природы такого понятия как гомология. Действительно, у кур и мышей число позвонков почти одинаково. Если признавать гомологичными их позвонки с одинаковым номером, то 1й грудной позвонок у этих животных отнюдь не гомологичен. Если гомологичными считать структуры, развитие которых определяется гомологичными Нохс-генами, то 1й грудной позвонок курицы и мыши гомологичны.

II. Собственно органная дифференцировка, определяющая не цито- и гистоморфологическую специфику, а анатомическую (макроморфологическую) специфику конечности.

Развитие конечности можно разделить на следующие крупные этапы:

1) Поле конечности, 2) почка конечности, 3) дифференцировка основных скелетных и других элементов, 4) рост дифференцированных элементов.

Поле конечности - область латеральной поверхности тела зародыша, не проявляющая морфологических признаков формирования конечностей, но приобретающая известную способность к саморазвитию в конечность. Поле конечности (Рис. 78) содержит клетки презумптивной конечности в центральной части и наружное кольцо клеток, в норме не участвующих в формировании конечности, но способных ее формировать в случае удаления клеток презумптивной конечности (т.е. центральной части поля конечности).

Почка конечности - сформированный на латеральной поверхности эмбриона растущий в объеме бугорок из клеток эпителия и мезенхимы, представляющий собой самое раннее анатомическое воплощение зачатка конечности, не обнаруживающий поначалу видимого подразделения на характерные сегменты стилопод (плечо/бедро, зейгопод (предплечье/голень) и аутопод (кисть/стопа).

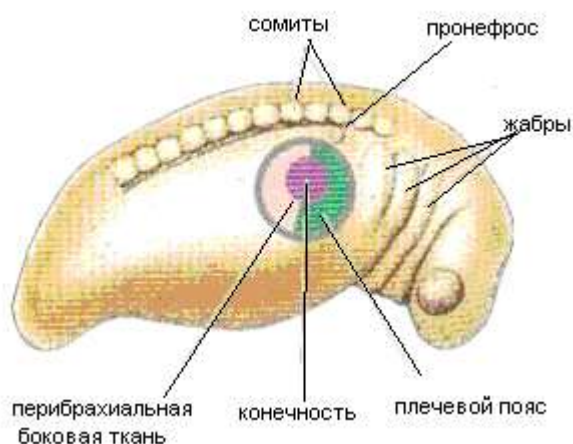


Рис. 78. Поле передней конечности у зародыша амфибии. В центре поля - презумптивная конечность. Передняя часть круга - презумптивный пояс конечности (лопатка, ключица и пр.) Задняя часть и периферия поля способны сформировать конечность после удаления презумптивной конечности. (По S.F.Gilbert. "Developmental biology", 2003).

Дифференцировка основных скелетных элементов первоначально в виде уплотнений мезенхимы, затем хрящей и позднее трубчатых костей. Формирование изолированных пальцев и костей зейгопода при участии локального апоптоза - программируемой гибели клеток (в частности, клеток первоначально имеющих перегородки между пальцами).

Рост дифференцированных скелетных и иных структур конечности продолжается после формирования основных структур как в пренатальный период, так и постнатальный период (у млекопитающих) и характеризуется неравномерностью при общей тенденции конечностей с возрастом зародыша и постнатально становиться все крупнее относительно туловища.

Как и к развитию многих других органов, к развитию конечности в той или иной форме приложимы базовые понятия биологии развития, отражающие эмбриофизиологические процессы, обуславливающие дифференцировку органов: а) приобретение **компетенции** (часто связанное с **инструктирующей индукцией**), б) **пермиссивная индукция**, в) **детерминация**, г) морфологическая (анатомическая) **дифференцировка**. Эти понятия имеют смысл применительно не только к развитию конечности в целом, но и к развитию ее частей, а также анатомических осей. Необходимо принимать во внимание, что конечности разных наземных позвоночных имеют не только “единый план строения” в анатомическом смысле: по три кости поясов конечности, по одной проксимальной кости собственно конечности - **стилопода**, по две кости среднего отдела **зейгопода** (лучевая и локтевая, большая и малая берцовые), по группе костей дистального отдела **аутопода** (кисть и стопа). Они имеют много общего в эмбриофизиологических механизмах своего развития, наряду, естественно, и с некоторыми особенностями этих механизмов и приводящих к анатомическим особенностям их строения. У человека и, по крайней мере, некоторых других высших позвоночных почки конечностей образуются в области на стыке шеи и грудного отдела (передняя конечность) и на стыке поясничного отдела с крестцовым.

В почке конечности, выступающей латерально из боковой поверхности тела, а затем и во взрослой конечности принято различать, по крайней мере, три оси: **проксимодистальную** (направление от головки бедра или плеча к кончикам пальцев), **передне-заднюю (кранио-каудальную)**, т.е. направление от большого пальца к мизинцу) и **дорзо-вентральную** (направление от ногтей к подушечкам пальцев). Та половина почки конечности, которая лежит краниальнее и включает области будущего большого пальца и лучевой кости называется **преаксиальной** (т.е. лежащей впереди оси конечности), а остальная половина, включающая мизинец и локтевую кость - **постаксиальной**. У взрослых млекопитающих конечности торчат не вбок, как у эмбриона, а вниз, и кранио-каудальная ось становится медио-латеральной.

Потоки информации в развитии конечности.

А. “Указание” места развития конечности.

Как и во многих других случаях в создании компетенции к индукции поля конечности важную роль играет градиент ретиноевой кислоты. Этот градиент обусловлен синтезом ретиноевой кислоты в районе гензеновского узелка и прямо или косвенно обуславливает включение в разных сегментах туловища (будущие шейный, грудной, поясничный, крестцовый и хвостовой отделы) разных наборов Нох-генов (“**анатомический код**”) в зависимости от concentra-

ции ретиноевой кислоты на разных расстояниях от гензеновского узелка. Это и предопределяет развитие соответствующих сегментов и даже подсегментов в рамках этих отделов, вплоть до отдельных позвонков. Во всяком случае при медикаментозном подавлении синтеза ретиноевой кислоты конечности в последствии не развиваются. С другой стороны, если у головастика лягушки отрезать часть хвоста и обработать начинающий регенерировать хвост ретиноевой кислотой, на его месте развивается целый “пучок” задних конечностей. Это означает, что ретиноевая кислота способна направить развитие дедифференцированных у места ампутации клеток регенерационной бластемы по пути, характерному не для хвоста, а для более краниально лежащего сегмента тела.

Передняя конечность закладывается на уровне передней границы экспрессии гена *Nox-6*, что соответствует первому грудному позвонку. Передняя почка конечностей у цыпленка располагается на уровне 16го - 19го сомитов, а задняя на уровне 27го - 30го сомитов (рис. 79).

Индукция конечностей цыпленка осуществляется с участием париетального листка вентральной (целомической мезодермы), секретирующей паракринный индуктор FGF-10. Во всяком случае, при помещении под боковую эктодерму между зачатками передней и задней конечности на уровне 21-25 сомитов, где никогда в норме не развивается конечность, шарика из геля, пропитанного белком FGF-10, развивается добавочная 5я конечность (рис. 74). Характер конечности (передняя или задняя) зависел от места пересадки. При трансплантации шарика в область вблизи **передней** конечности развивалась передняя конечность, а при трансплантации в область задней конечности развивалась задняя. Если шарик пересаживался посередине между передней и задней конечностями развивалась химерная конечность с краниальной частью, похожей на переднюю, а каудальной частью, похожей на заднюю. В этом случае в зачатке конечности экспрессировались и ген белка транскрипционного комплекса *Tbx5*, и *Tbx4*. Воздействие FGF-10, по-видимому, приводит к формированию в эктодерме почки конечности валикообразного утолщения - AER (апикального эктодермального гребня, рис. 80), играющего важную “информационную” (“трандукционную”) роль в последующем развитии конечности. FGF-10 - паракринный агент, относящийся к серии родственных по структуре и происхождению (отчасти взаимозаменяемых в эксперименте) белков, получивших общее название факторов роста фибробластов (Fibroblast Growth Factor). Название отражает, в основном, историю открытия этих белков, а не всю многообразную роль, которую они играют в жизни организмов. “Информационная” роль AER проявляется в его способности синтезировать под влиянием FGF-10 паракринный фактор - белок *Wnt3a* (известный также под названием β -катенин), провоцирующий экспрессию и выделение другого паракринного фактора - FGF-8.

Область компетенции эктодермы к развитию конечности ограничена строго латеральной поверхностью тела. Это видно из опыта по имплантации такой бусинки под дорзальную или вентральную эктодерму. В этом случае никакой добавочной конечности не образовалось. Б. Расчленение зачатка конечности на сегменты вдоль проксимо-дистальной оси.

Развитие почки конечности включает взаимодействие мезодермальных и

эктодермальных компонентов латеральной поверхности туловища, которые совместно и образуют растущую почку конечности. По мере роста зачатка конечности он постепенно дифференцируется на отделы, соответствующие элементам пояса конечностей (лопатка, ключица), плеча, предплечья, запястья, пясти, пальцев, которым в задней конечности соответствуют бедро, голень и элементы стопы. При этом необходимо помнить, что из одних клеток почки конечности развиваются более проксимальные структуры, например, плечо, а из других более дистальные - кисть, хотя генотип тех и других групп клеток остается одинаковым. Следовательно, в процессе развития почки конечности в них должна поступить позиционная информация о том, насколько проксимально или дистально в рамках зачатка конечности они расположены. Эта информация должна

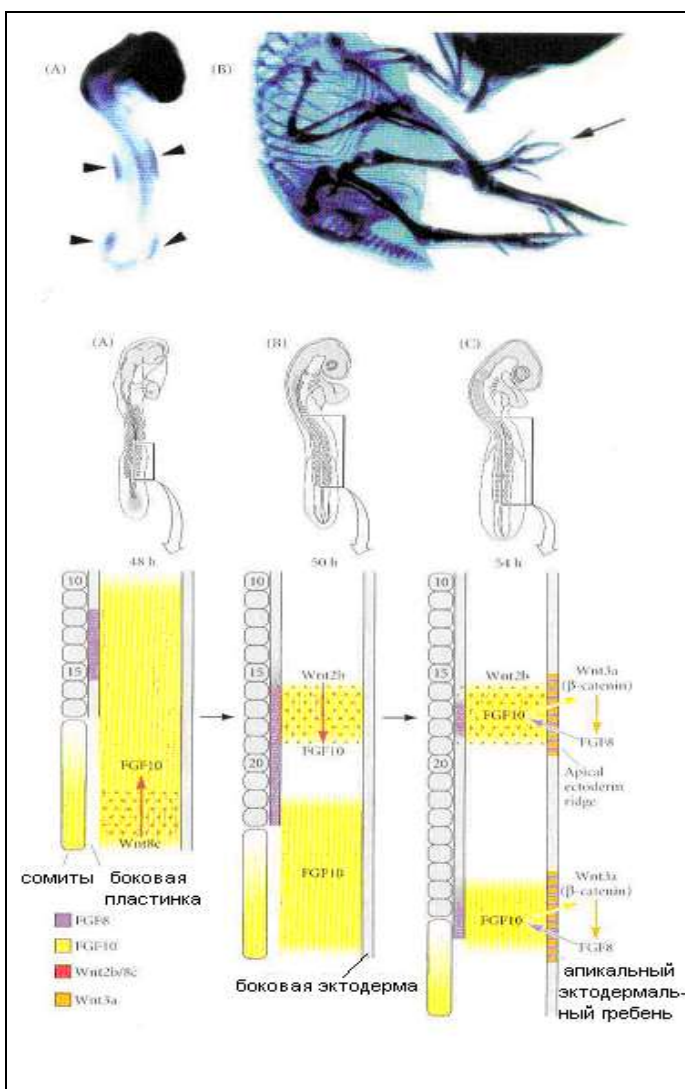


Рис. 79. Индукция конечностей у куриного эмбриона. А) Стадия 48 часов.

Слева номера дифференцированных сомитов. Правее полоска мезонефроса с экспрессией FGF8. Еще правее широкая полоска мезодермы париетального листка целома (боковой пластинки) с начальной экспрессией FGF10. Самая правая полоска - эктодерма бока. В) 50 часов. Белок Wnt2b стабилизирует синтез FGF10 только против сомитов 16-19. С) 54 часа. FGF10 индуцирует в эктодерме апикальный эктодермальный гребень с экспрессией гена Wnt3a, который, в свою очередь индуцирует экспрессию в гребне гена FGF8. Это индуктор роста и дифференцировки клеток мезодермы почки конечности. Ниже индукция задней конечности по той же схеме.

включить в работу разные ансамбли генов, что, в конечном счете, и приведет к формированию данными клетками именно плеча или кисти. Таким образом, должен существовать механизм детерминации проксимально-дистальной оси конечности путем передачи разной позиционной информации в разные клетки почки конечности. Каким же образом он действует?

Как сказано выше, на “вершине” почки конечности эктодерма образует утолщение (рис. 80), названное апикальным эктодермальным гребнем (АЭГ,

или английская аббревиатура AER- apical ectodermal ridge). Выделение гребнем белка FGF-8 (и других FGF) воздействует на мезенхиму почки конечности. Градиент его концентрации на стадии ранней почки конечности и/или продолжительность пребывания делящихся клеток мезенхимы в “поле” диффундирующего FGF-8, по-видимому, определяет, какой сегмент конечности формируют эти клетки. Чем дальше от АЕТ они находятся и/или чем кратковременнее их пребывание в “поле”, тем более проксимальный конец конечности они формируют. Преждевременное удаление АЕР ведет к развитию только проксимальных, но не дистальных сегментов конечности. Удаленный АЕР можно заменить шариками гидрофильного геля, пропитанными раствором FGF-8 и вставленными под эпидермис почки конечности (рис. 77).



Рис. 80. Дистальный участок почки конечности куриного эмбриона. Виден апикальный эктодермальный гребень и клетки эктодермы

При достаточной продолжительности диффузии FGF-8 из шариков развивается конечность со всеми нормальными сегментами. Молекулы этого белка выступают как паракринный фактор с невысокой способностью к диффузии и проникают в подстилающий эктодерму слой мезенхимы на глубину всего около 200 мкм.

Этот тонкий слой мезенхимы был назван “зоной прогресса” (ЗП, или в английской транскрипции PZ). В ходе роста и развития почки конечности как клетки эктодермы, так и клетки мезенхимы делятся. После очередного цикла деления клеток в ЗП их становится больше, толщина их слоя возрастает, но глубина диффузии FGF-8 (200 мкм) остается прежней. Это значит, что часть клеточного потомства ЗП оказывается вне досягаемости индуктора и, следовательно, должна считаться покинувшей ЗП. Вне этой зоны клетки также делятся, но вне влияния FGF-8.

В основу современных представлений о позиционной информации, обеспечивающей дифференцировку зачатка конечности на разные сегменты вдоль проксимально-дистальной оси лежат следующие экспериментальные

данные:

1) Если на стадии ранней почки конечности куриного эмбриона удалить ее АЭГ, в крыле цыпленка будет присутствовать только плечо, но не будет более дистальных сегментов (предплечья и кисти). Стоит, однако, имплантировать на вершину почки конечности с удаленным АЭГ бусинку геля, пропитанного FGF-8 (или другими FGF), развивается уже крыло, содержащее не только плечо, но и предплечье, а если через сутки после 1й имплантации 2ю такую же бусинку, то развивается вся конечность (рис. 81).

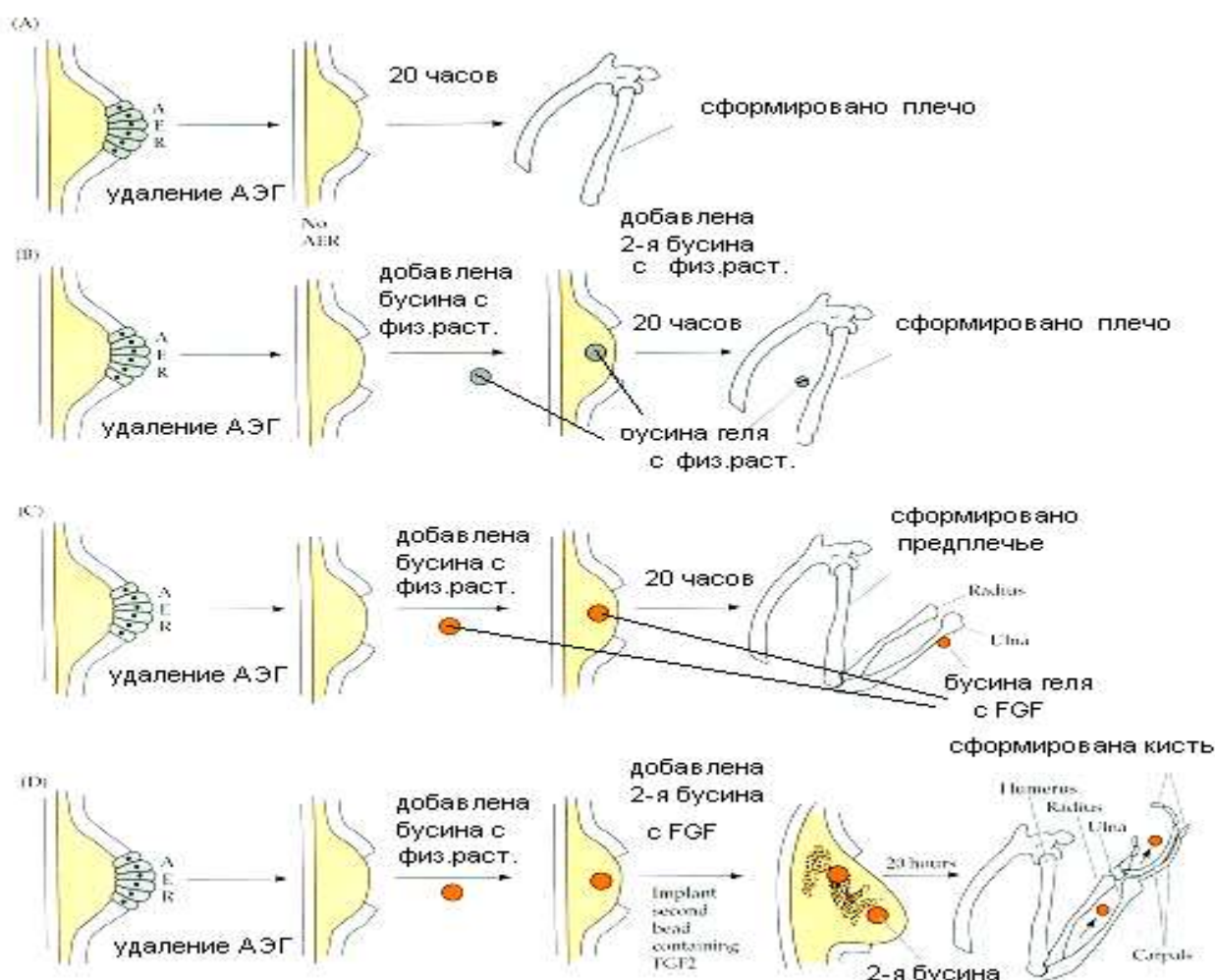


Рис. 81. Доказательство роли белка FGF в индукции роста и дифференцировки почки конечности. А) Удаление АЭГ со стадии почки конечности приводит к недоразвитию дистального скелета конечности (нед предплечья и кисти). В) Пересадка шарика геля, пропитанного физраствором в почку конечностей с удаленным АЭГ ничего не меняет в развитии дистального скелета. С) Введение шарика, пропитанного FGF, приводит к развитию также предплечья, но не кисти. D) Пересадка после 1го шарика с FGF еще и 2-го шарика с FGF приводит к развитию полной конечности.

2) Если у уже продвинувшейся в своем развитии почки конечности (24я стадия куриного эмбриона) удалить как АЭГ, так и ЗП и на их место пересадить

те же структуры от более молодой хвостовой почки, развивается крыло, в котором к плечевому поясу примыкает плечо, дистальнее располагается предплечье, еще дистальнее снова плечо, затем предплечье и кисть (рис. 82). Наоборот, если удалить у молодой почки конечности АЭГ вместе с ЗП и на их место пересадить аналогичные структуры старой почки конечности, то в развившемся крыле к туловищу примыкают структуры кисти, а плечо и предплечье вообще отсутствуют.

3) Методами “молекулярно-генетической гистохимии” (с помощью меченных зондов, распознающих иРНК) показано, что расчленение конечности на характерные сегменты (стилопод, зейгопод и аутопод) реализуется через экспрессию разных наборов Нох-генов на разных этапах развития зачатка конечности, т.е. и здесь работает “анатомический код”. Так у куриного эмбриона в дистальной части почки конечности на стадии выхода из ЗП клеток будущего **стилопода** выявлена экспрессия только *Noxd-9* и *Noxd-10* генов.

На стадии детерминации предплечья в дистальной почке конечности экспрессируются уже не 2, а 5 генов серии d (9-13). Наконец на стадии детерминации кисти утрачивается экспрессия гена d-9, но экспрессируются гены d-10-13, а также гены другой серии Нох-генов a-12 и a-13.

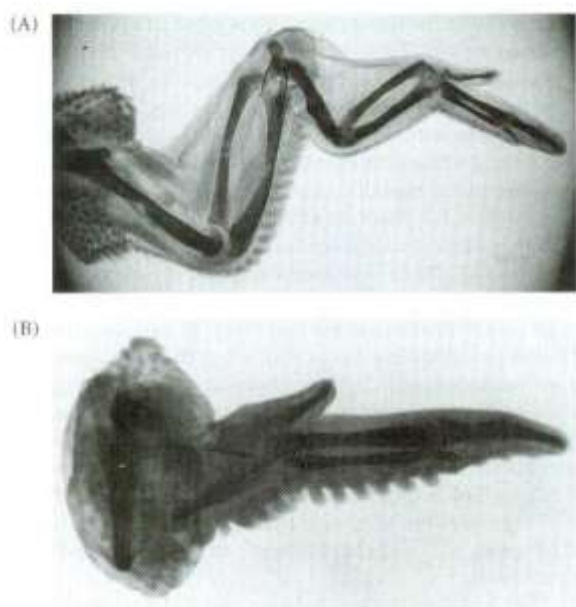


Рис. 82. А) Удаление АЭГ с поздней почки конечности и замена его на АЭГ ранней почки конечности приводит к развитию конечности, состоящей из плеча, предплечья, снова плеча и предплечья и кисти. В) Обратная пересадка АЭГ поздней почки, на раннюю приводит к развитию конечности с кистью без плеча и предплечья.

4) У мышей, гомозиготных по делеции (отсутствию) генов *Noxa-11* и *Noxd-11* в развившейся конечности после плеча сразу идет кисть, а предплечье вообще отсутствует (рис. 83). У людей, гомозиготных по мутации *Noxd-13* кисть имеет грубые дефекты (в частности срастание пальцев). Таким образом, **кодирование** позиционной информации, определяющей дифференцировку вдоль проксимо-дистальной оси, осуществляется посредством градиента концентрации FGF-8 в клетках мезенхимы ЗП ранней почки конечности и/или числа делений клеток в ЗП до выхода из нее. **Декодирование** этой информации проявляется во включении определенных номеров серии Нох-генов, а при их участии ансамблей других генов, вероятно, генов белков клеточной адгезии и

др.

Обычно для перехода клетки на новый этап дифференцировки требуется ее “критический” митоз. Вероятно, это связано с тем, что митозу предшествует репликация ДНК, связанная с прохождением молекул ДНК- полимераз по всем генам, в том числе и промоторам, которые, по-видимому, на это время должны освобождаться от белков ТК. Это может создать условия для присоединения к промоторам ранее репрессированных генов новых белков ТК и тем самым изменения состояния дифференцировки, точнее, эпигенетической наследственности. Естественно, и топографически ранее вышедшие из ЗП клетки оказываются лежащими более проксимально, чем вышедшие позднее (дистальнее лежащие).



Рис. 83. Детерминация включением определенных Нох-генов сегментов конечностей. А – скелет нормальной конечности мыши, В – скелет конечности у мыши с делецией Нох-11 и Нохd-11 лишен предплечья, С – кисти человека с мутацией Нохd-13, D – схема хромосомы с серией генов Нох-генов и их соответствие сегментам конечности, развитие которых они запускают.

В. Дифференцировка зачатка конечности вдоль передне-задней (кранио-каудальной) оси.

Другое определяющее ход развития событие - индукция ZPA (зоны поляризующей активности), предопределяющей место развития мизинца (или другого пальца, характерного для заднего края стопы или ладони у данного вида) (рис. 84) . Если пересадить в **краниальный** край почки конечности дополнительную ZPA , образуется зеркально симметричная удвоенная кисть с мизинцами как у краниального конца, так и у каудального конца, а в центре кисти разовьются большие пальцы (рис. 84).

Самым важным ранним проявлением детерминации ZPA является экспрессия гена Shh. Эта область индуцируется в компетентной мезенхиме **каудальной части** почки конечности с помощью FGF-8 из AER. Компетенция к

индукционному действию FGF-8 ограничена каудальным краем почки конечности. Компетенция вероятно связана с экспрессией в постаксиальной, но не в преаксиальной мезенхиме почки конечности генов *Hoxb-8* и *dHand*. В генно-инженерных опытах, где удалось получить “эктопическую” экспрессию *Hoxb-8* (т.е. не только на “нормальном” месте у каудального края хвостовой почки, а и вне границ нормальной области экспрессии) по всей мезенхиме почки конечности, развилась удвоенная зеркально симметричная кисть с пальцами, характерными для каудального края, как на нормальном месте, так и на краниальной стороне такой двойной кисти. При этом посредине между передним и задними краями кисти развились пальцы, которые обычно присутствуют на переднем крае кисти.

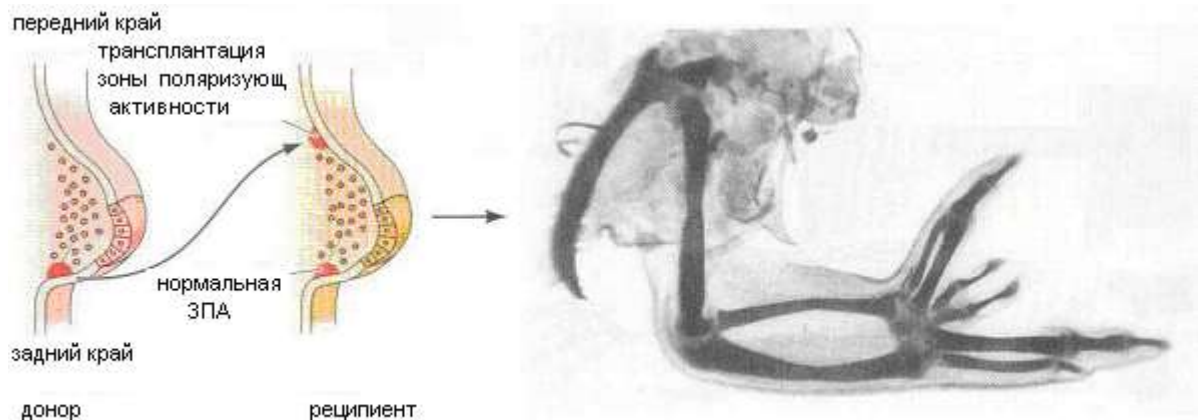


Рис. 84. Эксперимент по пересадке клеток зоны поляризующей активности (ЗПА) из каудальной части почки конечности крыла цыпленка в краниальную часть такой же почки конечности другого эмбриона (стрелка). Справа - скелет развившейся конечности с зеркально симметричной удвоенной кистью. Пальцы, которые в норме находятся на переднем (краниальном) краю кисти оказались в ее средней части, а те, которые расположены в норме на заднем краю, присутствуют как на заднем, так и на переднем краях удвоенной кисти.

Еще один ген, экспрессирующийся только в постаксиальной, но не в преаксиальной мезенхиме почки конечности - это ген *dHand*. Его эктопическая экспрессия по всей мезенхиме почки конечности также приводит к формированию зеркально-симметрично удвоенной кисти. Он, повидимому, необходим для включения транскрипции главного гена, определяющего кранио-каудальную полярность конечности - *Shh*. Белок *Shh* запускает синтез паракринных факторов BMP2 и BMP7, диффундирующих от ЗПА у заднего края конечности (сторона мизинца) к передней (сторона большого пальца). Градиент концентрации BMP предопределяет какие именно пальцы будут развиваться. При высокой концентрации развивается мизинец, при наименьшей - большой палец, а промежуточные пальцы, соответственно, при промежуточных концентрациях BMP. Показано, что для дифференцировки определенного пальца важен уровень концентрации BMP не столько в самом пальце сколько в эмбриональной межпальцевой перепонке, примыкающей к зачатку пальца с каудальной стороны. Удаление межпальцевой перепонки или подавление в ней активности паракринного агента BMP с помощью специфического ингибитора BMP - *Noggin*, вставляе-

мого в перепонку в форме пропитанного этим белком шарика из геля приводит к уподоблению пальца, расположенного краниальнее перепонки, в палец, расположенный краниальнее данного пальца. Например, если удалить перепонку между средним и указательным пальцем, то на месте указательного пальца разовьется 2й большой палец так, что получается 2 больших пальца в кисти вместо одного, а указательного пальца вообще не будет.

Кроме передачи информации мезенхиме о типе пальца белки BMP на стадии ранней почки конечности детерминируют апоптоз (программируемую клеточную гибель) самих межпальцевых перепонок, которые разрушаются позднее, изолируя пальцы (у уток это действие белков BMP предотвращается белком-ингибитором (Gremlin) и перепонки между пальцами сохраняются. Вводя такой белок в перепонку ноги эмбриона курицы можно сохранить и у нее перепонку между пальцами. Другие белки семейства BMP, в частности, BMP2 и GDF5 экспрессируются в области образования суставов, мешая слиянию скелетной мезенхимы в нерасчлененную хрящевую массу. Мутация дисфункции гена *Noggin*, сдерживающего мощное действие гена BMP7, превращающего мезенхиму почки конечности в хрящ, предотвращает развитие суставов.

Ключевой белок дифференцировки конечности вдоль кранио-каудальной оси - *Shh*, способен также воздействовать на посттранскрипционные преобразования регуляторного белка транскрипционного комплекса Gli3, который в “нативном” виде, присоединяясь к промоторам или энхансерам ряда генов, запускает их экспрессию. Сохранению нативного вида содействует белок *Shh*. Однако большая или меньшая часть белка Gli3 подвергается расщеплению с образованием фрагментов, сохраняющих способность связывания с теми же сайтами ДНК, но уже в качестве репрессора. В присутствии активного белка *Shh* возникает крутой градиент соотношения транскрипционного фактора Gli3 в активаторной и репрессорной формах, смещая соотношение в пользу активаторных форм вблизи зоны экспрессии *Shh* при убывании этого соотношения к краниальному краю. При низких соотношениях развивается краниальная часть ладони, а при высоких каудальная.

При мутации потери функции гена Gli3 у мышей образуется 6 - 11 пальцев, неузнаваемых по номеру (большой? мизинец?). Аналогичная мутация этого гена известна у человека с развитием лишних пальцев и необычно высокого лба из-за нарушения развития мозга (синдром Грига). Возможно, правильное соотношение активаторной и репрессорной форм способствует детерминации определенных пальцев и ограничивает их количество.

При другом мутантном аллеле Gli3 кодируемый им белок становится репрессором ряда генов. В этом случае не только развиваются лишние пальцы, но имеет место недоразвитие ряда структур: гипофиза, гипоталамуса, почек, ануса. Эта плейотропность эффекта означает, что нормальный аллель данного гена кодирует белок, участвующий в регулировании нескольких разных морфогенетических процессов в разных частях тела.

При мутации гена *Shh*, напротив, **образуется меньше пальцев или не образуется ни одного, т.е. формируется “ампутированная” конечность без дистальных отделов, вероятно, из-за необходимости белка Shh для поддер-**

жания активности АЭГ.

Появление различий между краниальными и каудальными (т.е. преаксиальными и постаксиальными частями конечности базируется на экспрессии Нох-генов, упомянутых в пункте "3)" на странице 240. Действительно, места экспрессии разных Нох-генов, транскрибирующихся в почке конечности при детерминации предплечья, расположены в почке конечности не одинаково. Так в преаксиальной (краниальной) части почки экспрессируются только гены d-9 и d-10, тогда как в постаксиальной к ним добавляется экспрессия d - 11, d-12 и d - 13. Чем дальше к каудальному концу, тем больше Нох- генов экспрессируется причем, у каудального конца почки включаются гены с самыми большими номерами, т.е. гены, расположенные в хромосоме ближе к 5'- концу смысловой цепочки ДНК. Это может означать, что различия в структуре лучевой кости (преаксиальная часть предплечья) и локтевой кости (постаксиальная часть предплечья) обусловлены включением разных наборов Нох-генов. В частности, для развития структурных особенностей локтевой кости должны быть "задействованы" гены d-11-13, тогда как для развития лучевой кости они, видимо, не являются обязательными.

Тем более, без дифференциальной экспрессии Нох-генов не обходится кранио-каудальная дифференцировка **кисти**. В наиболее краниальной зоне (область большого пальца) дистальной части почки конечности в период детерминации кисти экспрессируется ген Ноха-13. Несколько каудальнее - гены a-13, d-13; еще каудальнее (область мизинца)- a-12, a-11, d -10-12.

Г. Дифференцировка зачатка конечности вдоль дорзо-вентральной оси.

Третье определяющее ход развития конечности событие - индукция в эпителии верхней (дорзальной) части почки конечностей дорзальных элементов пальцев, в частности, ногтей. Первым транскрибируемым в дорзальном, но не вентральном эпидермисе почки конечности геном, имеющим отношение к детерминации дорзо-вентральной оси пальцев, является ген Wnt7a, кодирующий паракринный белок-индуктор, который индуцирует в дорзальной мезенхиме синтез белка Lmx1, являющегося транскрипционным фактором. **Делеция Wnt7a приводит к отсутствию ногтей (когтей) и развитию подушечек пальцев не только на их вентральной, но и на дорзальной стороне. Из тератологии человека известна мутация Lmx1, при которой не развиваются ногти и коленная чашечка.**

В процессе анализа механизмов детерминации структурных элементов конечностей мы условно разделяем эти механизмы в зависимости от выбранной для исследования оси. В действительности эти механизмы работают во взаимодействии друг с другом. Так белок FGF-8, контролирующий дифференцировку проксимо-дистальной оси конечности, обеспечивает в сочетании с dHAND индукцию экспрессии Shh, контролирующего дифференцировку вдоль кранио-каудальной оси. Ген Wnt7a, экспрессирующийся в дорзальной эктодерме почки конечности и определяющий дорзовентральную дифференцировку конечностей (ногти на вентральной стороне пальцев), участвует и в детерминации кранио-

каудальной оси. У мышей, лишенных гена *Wnt7a*, и у куриных эмбрионов с удаленной дорзальной эктодермой почки конечности не только не развиваются ногти, но и отсутствуют некоторые пальцы на каудальной стороне кисти. Это связано с ингибированием в отсутствие белка *Wnt7a* синтеза *Shh*. Следовательно, *Wnt7a* необходим для поддержания синтеза *Shh* в ZPA.

Генно-инженерная вирусная конструкция с экспрессией *Wnt7a*, введенная в мезенхиму почки конечности, из которой удалили дорзальную эктодерму, оказалась способной нормализовать синтез *Shh* и развитие каудальных пальцев.

Активный рост почки конечности определяется наличием АЭГ, выделяющего FGF. Введение в АЭГ экзогенного BMP вызывает превращение АЭГ в обыкновенный эпителий эктодермы и прекращение выделения FGF. На определенной стадии развития конечности АЭГ в норме прекращает свое существование. Если, однако, ввести белок - ингибитор BMP *Noggin*, то деградация АЭГ задерживается на несколько дней. Значит в норме действие BMP блокируется до определенного времени, что позволяет поддерживать АЭГ в течение раннего развития конечности. Белок *Shh* вызывает экспрессию гена белка *Gremlin*, который, по-видимому и блокирует преждевременное действие BMP и тем самым предотвращает преждевременную деградацию АЭГ, а также преждевременное прекращение экспрессии *Wnt7a* в дорзальном эпидермисе почки.

Передняя и задняя конечности

Все перечисленные процессы происходят в передней и задней конечностях на базе, в основном, единого морфогенетического процесса (с точки зрения списка задействованных генов), хотя отличия в деталях все же имеются, чем и обусловлены различия в структуре задних и передних конечностей, существующие, несмотря на общность их “плана строения”. Как указывалось выше, установлена важная роль экспрессии генов транскрипционных факторов *Tbx5* в индукции передней конечности и *Tbx4* в индукции задней конечности. Трансфекция генно-инженерной конструкции на основе вируса, в который вставлен ген *Tbx4* в латеральную область эмбриона курицы часто приводила к развитию вместо крыла на его месте второй ноги. Особенности формы передней и задней конечности так или иначе связаны с особенностями экспрессии генов клеточной адгезии в них, так как именно процессы адгезии в буквальном смысле “формируют” и обособляют структурные элементы организма, а позднее дополняются процессами локального роста сформированных структур.

После того, как закладываются основные структурные элементы конечности у эмбриона им предстоит многократное увеличение в размерах, замена хрящевых элементов костными и др. изменения.

Остается много загадок в удивительной степени согласованности роста левой и правой конечности, в отношении резкого изменения относительного размера передних и задних конечностей и позвоночника по мере роста плода и постнатального роста.

При наступлении бурного роста в длину хрящевых предшественников бедра и костей голени активизируются гены, названные генами брахиоподии

(br) за то, что их рецессивные мутантные аллели вызывают торможение роста хрящей в течение немногих дней экспрессии данного гена в хрящах и других структурах даже за пределами конечности. Это приводит у гомозигот по рецессивной мутации (br /br) к необратимому отставанию в росте этих частей тела по сравнению с нормой, и у взрослых особей конечности оказываются гораздо короче нормы (карликовость) при нормальных размерах туловища. Интересно, что для проявления ингибирующего рост эффекта необходимы продукты нормальных генов, экспрессирующихся только в постаксиальных частях конечности. Хрящевой зачаток большой берцовой кости из преаксиальной части конечности мыши с мутантным аллелем br /br при эксплантации *in vitro* не проявляет признаков ингибирования роста, в то время как такой же зачаток малой берцовой кости (постаксиальная структура) отстает в росте *in vitro* также, как и *in vivo*. Совместное культивирование малой и большой берцовых костей приводят к ингибированию роста обеих. Хрящевые зачатки гетерозигот (br /+) по мутации сначала несколько отстают в росте, но после прекращения экспрессии мутантного гена растут быстрее, чем в норме и “нагоняют” зачатки нормальных мышей по длине.

17.3. Развитие глаза.

Зачатки глаз (глазных пузырьков) индуцируются с участием экспрессии генов Pax 6, Six, Rx1, причем как потенциально непарный орган. Однако преоральная пластинка, лежащая под непарным зачатком глаз в отделе нервной трубки, соответствующем промежуточному мозгу, выделяет паракринный фактор Shh в среднюю часть зачатка и ингибирует в этой части экспрессию гена транскрипционного фактора Pax6 и зависимую от Pax6 пролиферацию и разрастание центральной части зачатка. Латеральные же части растут, формируя по одному выступу (глазному пузырьку) каждая (рис. 58). В отсутствии функционального Shh развивается непарный глаз (синдром “циклопия”), сопровождающийся и отсутствием гипофиза, что делает организм нежизнеспособным после рождения.

Как говорилось выше, глазной пузырек способен индуцировать хрусталик в компетентной эктодерме головы лягушки (Xenopus). Условием возникновения компетенции является экспрессия полноценного гена Pax6 в эктодерме. Этот ген экспрессируется и в глазном пузырьке. При определенной мутации гена Pax6 индукция хрусталика становится невозможной даже в том случае, когда под эктодерму с мутантным Pax6 помещают глазной пузырек с нормальным генотипом. Если же под эктодерму с нормальным Pax6 поместить глазной пузырек с мутантным геном хрусталик успешно развивается. Следовательно, для развития хрусталика важно присутствие нормального гена Pax6 именно в реагирующей (компетентной) эктодерме, а не в индуцирующем глазном пузырьке.

Показано, что глазной пузырек оказывает индукционное воздействие на эктодерму посредством двух паракринных факторов:

- 1) BMP4, который индуцирует появление в эктодерме 2 транскрипционных факторов (Sox 2 и Sox 3) и
- 2) FGF8, который индуцирует появление в эктодерме транскрипционного

фактора L-Maf. Экспрессия в соответствующей части эктодермы головы Pax 6 и трех этих транскрипционных факторов обеспечивает развитие хрусталика из индуцированных клеток эктодермы.

Хрусталик, в свою очередь, индуцирует в эктодерме над ним столбчатый эпителий роговицы, выделяющий в сторону хрусталика коллагенсодержащее межклеточное вещество, способствующее проникновению под этот эпителий эктомезенхимы, происходящей из нервного гребня и формирующей своеобразную строму роговицы, которая несколько обезвоживается под действием гормона щитовидной железы и приобретает высокую прозрачность. Кроме того, хрусталик, поидимому, индуцирует дифференцировку глазного бокала на сетчатку и пигментный эпителий.

17.4. Развитие органов, связанных с полом

Напомним, что в список органов, связанных с полом, наряду с гонадами входят структуры, обеспечивающие выведение половых продуктов или развившихся в теле матери дочерних организмов из тела родителей, и специализированные органы, необходимые для выращивания потомства, например, молочные железы.

У позвоночных гонады формируются из двух типов зачатков: собственно первичных половых клеток (ППК) и половых валиков, выдающихся из области промежуточной мезодермы в целом со спинной стороны вблизи брызжейки. При этом первичные половые клетки впервые выявляются не в гонадах, а совсем в других местах тела зародыша, причем ППЛ в конечном счете мигрируют в ходе развития в зачаток гонады, развившийся из полового валика.

Развитие первичных половых клеток.

У бесхвостых амфибий (*Xenopus*) уже в неоплодотворенной яйцеклетке на вегетативном полюсе различимы цитоплазматические детерминанты будущих первичных половых клеток, тесно связанные с желточными гранулами. Их можно выявить, в частности, по присутствию в них транскриптов гена *Xcat2*. В составе этой цитохимически специфичной зоны цитоплазмы содержатся белки и некоторые РНК, включая митохондриальные рибосомные РНК. Эта цитоплазма представлена герминальными гранулами и матриксом между ними. Цитохимической особенностью этой цитоплазмы является способность подавлять транскрипцию и трансляцию. На ранних стадиях дробления эта цитоплазма с участием врезающихся в бластомеры борозд дробления переносится на дно бластоцеля и оказывается в составе нескольких клеток, расположенных среди клеток энтодермы в каудальном отделе кишки. Оттуда они мигрируют по зачатку брызжейки в зачатки гонад - половые валики (рис. 85). Направление миграции, по-видимому, определяется соответственно ориентированными волокнами фибронектина, вдоль которых вытягиваются псевдоподии мигрирующих ППК. Обработка мезентерия антителами против фибронектинов *Xenopus* препятствует как адгезии ППК к фибронектину, так и их миграции в зачаток гонады. В ходе миграции они трижды делятся и в зачаток гонады проникает около

30 ППК, которые продолжают делиться уже в ее составе, образуя половые клетки.

У хвостатых амфибий подобных цитоплазматических детерминант половых клеток не отмечено. По-видимому, первичные половые клетки индуцируются в той части мезодермы, которая вворачивается в ходе гаструляции через вентролатеральные губы бластопора. У птиц и рептилий раньше всего удается заметить первичные половые клетки в средней части *zona pellucida* в гипобласте, которые затем перемещаются вперед в зону внезародышевых тканей, где занимают область серповидной формы (герминальный серп). Здесь они пролиферируют, проникают в кровеносные сосуды и током крови переносятся в область задней кишки. Далее они покидают сосудистое русло, проходя подобно лейкоцитам в щели между эндотелиальными клетками, проникают в зачаток брызжейки и, вероятно, с помощью хемотаксиса мигрируют из нее в половые валики.

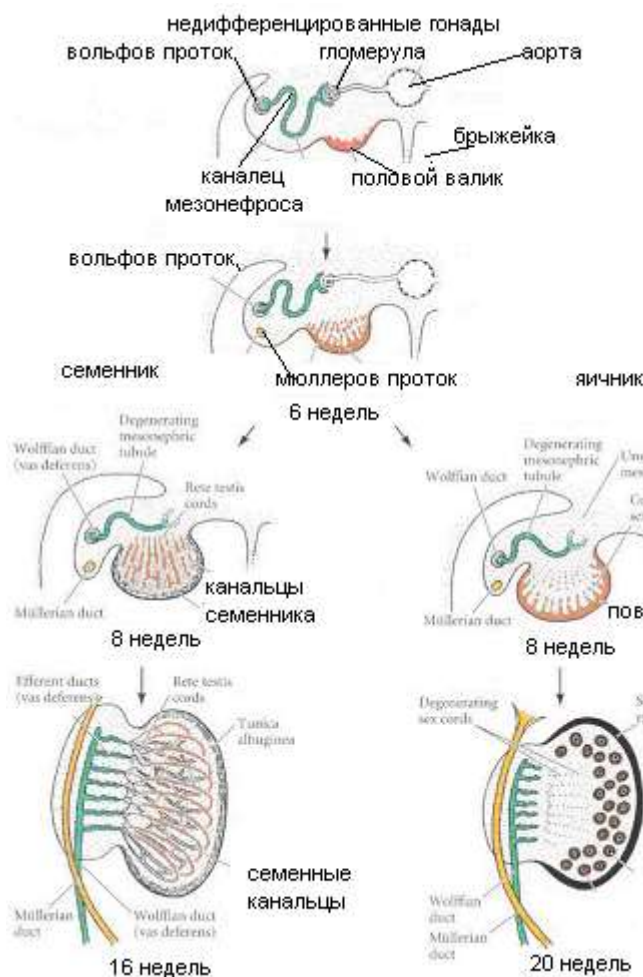


Рис. 85. Развитие гонад у человека. Вверху (4 недели беременности) - закладка полового валика, выступающего в полость целома вблизи зачатка брызжейки. Виден вольфов проток и каналцы мезонефроса.

Ниже (6 недель) . Целомический эпителий валика пролиферирует и образует тяжи, врастающие в мезенхиму полового валика . Это зачатки фолликулярных клеток яичника или клеток Сертоли канальцев семенника. Формируется мюллеров проток. К 8 неделям беременности уже ясно видна разница между семенниками и яичниками. В семенниках эпителиальные тяжи усиленно развиваются и теряют связь с целомическим эпителием, а в яичниках тяжи частично деградируют и сохраняют связь с эпителием. К 16 неделям отростки вольфова протока врастают в семенник и вступают в контакт с тяжами эпителия. В яичниках к 20 неделям фолликулы тяжей эпителия распадаются на отдельные фолликулы. Связи с вольфовым протоком не возникает.

У млекопитающих первичные половые клетки впервые удастся различить (по их гистохимическим особенностям, в частности по значительному содержанию в ППК щелочной фосфатазы) в каудальной части эпибласта (район каудального конца первичной бороздки) на стыке со внезародышевой эктодер-

мой. Последняя, по-видимому, индуцирует их появление на краю эпибласта. Интересно, что на стадии раннего дробления во всех клетках эмбриона экспрессируется ген *Ost4*, который перестает экспрессироваться по мере утраты новыми поколениями делящихся клеток их тотипотентности. На стадии бластоцисты он экспрессируется уже только во внутренней клеточной массе, но не в трофобласте, а по мере развития зародыша экспрессия *Ost4* сохраняется только в первичных половых клетках, незрелых сперматогониях эмбриональных семенников и в овоцитах. Таким образом, по крайней мере, в женском организме экспрессия гена *Ost4* как бы “метит” клетки зародышевого пути. Экспрессия этого гена отражает сохранение тотипотентности клеток, т.е. отсутствие эпигенетической наследственности, придающих клетке определенную тканевую специализацию. На стадиях органогенеза (у мыши на 8-ой день беременности) ППК можно видеть в энтодерме задней кишки. К 11 дню по зачатку брызжейки они мигрируют в зачатки гонад (половые валики). В процессе миграции они размножаются, для чего необходим их контакт на маршруте миграции с белком SCF (stem cell factor - фактор стволовых клеток). Этот белок входит в состав цитомембран тех клеток, с которыми вступают в контакт ППК на маршруте своего движения к зачатку гонад. Мутации гена SCF или его рецептора C-kit, имеющегося в составе цитомембран ППК, нарушающие функции этих белков, приводят к дефициту ППЛ, а также меланоцитов и клеток костного мозга, для функционирования которых также необходим SCF и трансдукционная цепочка передачи его сигнала. Помещенные *in vitro* ППК 11-дневного мышиноного эмбриона подвергаются апоптозу в отсутствии SCF. Апоптоз задерживается при добавлении SCF и белка LIF (ингибирующий лейкемию фактор), стимулирующие пролиферацию ППК и задерживающие их апоптоз. При добавлении FGF2 (фактора роста фибробластов) клетки приобретают способность к длительной пролиферации и проявляют тотипотентность как клетки внутренней клеточной массы бластоцисты. Полагают, что культуры таких клеток можно использовать в медицине как универсальный источник клеточного материала для замены вышедших из строя тканей, не обладающих способностью к восстановлению.

У ряда беспозвоночных, в том числе дрозофил, в яйцеклетках имеются хорошо выраженные цитоплазматические детерминанты первичных половых клеток. В частности у дрозофил они расположены на заднем полюсе яйца и включают белки, гомологичные тем, которые имеются в соответствующих цитоплазматических детерминантах бесхвостых амфибий.

Развитие гонад

Рассмотрим развитие гонад на примере человека. **Половой валик** намечается уже на **4й неделе** развития (рис. 86). В нем гистологически различаются мезенхима и генитальный гребень, представляющий собой утолщение эпителия, выстилающего целом (брюшную полость), над половым валиком. От этой стадии и до **7 недель** **яичник и семенник гистологически не отличаются**. Из генитального гребня тяжи эпителия вырастают в мезенхиму валика, сохраняя

связь с гребнем (первичные половые тяжи). Латеральное полового валика расположен валик, из мезенхимы которого формируются каналы мезонефроса, а также мюллерова и вольфова протока. Каналы мезонефроса и **вольфова протока** на уровне гонады различимы уже на **4й неделе**. **Мюллеров проток** появляется на этом уровне позднее (он хорошо виден на **6й неделе**) и расположен вентральнее и латеральнее вольфова протока.

К 8 неделям беременности первичные половые тяжи у эмбрионов женского пола сохраняют связь с одевающим гонаду целомическим эпителием, причем самые глубокие врастания эпителия в мезенхиму гонады начинают дегенерировать. У эмбрионов мужского пола первичные половые тяжи развиваются все сильнее, но утрачивают связь с целомическим эпителием, покрывающим гонаду.

Некоторые данные по генетике развития пола

В развитии пола различают его первичную детерминацию и вторичную детерминацию. Под первичной понимают детерминацию типа гонад (семенник или яичник), а под вторичной детерминацию других органов имеющих непосредственное отношение к размножению.

Первичная детерминация пола.

В норме мужской пол у млекопитающих определяется Y-хромосомой, в коротком плече которой имеется ген, названный **SRY** (Sex determining Region of Y-chromosome). При делеции только этого участка Y-хромосомы развивается женский организм, даже если длинное плечо Y-хромосомы сохраняется.

Дифференцировка гамет как яйцеклеток или сперматозоидов не может определяться их собственным генотипом, так как половина сперматид, из которых развиваются сперматозоиды содержит только X-хромосому, но не содержит у-хромосомы, как и яйцеклетка и, тем не менее, развивается сперматозоид.

Специфический для мужчин белок SRY насчитывает 223 аминокислоты. Он имеет домен связи с ДНК, сходный с теми, которые есть у некоторых транскрипционных факторов, способных локально сгибать участок ДНК.

Женщины в норме лишены Y-хромосомы в кариотипе. Однако, изредко встречаются женщины с кариотипом XY. В этом случае фрагмент Y-хромосомы с SRY утрачен или в нем присутствуют мутации, делающие кодируемый белок неспособным связываться с ДНК или сгибать ее.

Непосредственно перед возникновением гистологических особенностей гонады, характерных для семенника, наблюдается экспрессия SRY-локуса, которая позднее прекращается. Введение в мужской пронуклеус зиготы мыши с женским кариотипом XX выделенного участка ДНК, содержащего ген SRY, с последующим возвращением развивающегося эмбриона в половые пути матки, приводит к развитию у эмбриона семенников и полового члена, хотя сперматозоиды в семенниках не развиваются как при аналогичном генотипе человека ХХУ (синдром Кляйнфельтера у человека).

Конкретных данных о генах, которые непосредственно включает транскрипционный фактор, кодируемый геном SRY, нет. Не исключается, что одним из таких генов является **Sox9**, располагающийся не в половых хромосомах, а в аутосомах. Этот локус, в отличие от SRY, не специфичен для млекопитающих, а имеет гомологов в других классах позвоночных, где также участвует в детерминации пола. Если в геноме мыши с женским кариотипом XX вместо 2 копий гена Sox9 присутствует 3 копии (в опыте по трансгенозу дополнительной копии Sox9 в зиготу), то развивается самец даже в отсутствие Y-хромосомы. Напротив, если один из двух генов Sox9 в генотипе отсутствует, в 3 из 4 случаев развивается самка или гермафродит даже при генотипе XY. При этом нехватка 2й копии Sox9 в геноме вызывает множественные дефекты скелета (“кампомелическая дисплазия”). Возможно, роль SRY сводится только ко включению Sox9, с которым он имеет значительную гомологию (вероятно их общее происхождение в филогенезе от одного и того же гена предков нынешних млекопитающих). Оба эти гены могут выступать, судя по их структуре и как транскрипционные факторы, и как регуляторы сплайсинга, т.е. вырезания интронов из иРНК. Недавно было показано, что в период, когда структура гонады становится разной у самцов и самок, белок Sox9 проникает в ядра клеток Сертоли, соединяется с промотором гена антимюллеровского гормона и запускает его транскрипцию. Это приводит к синтезу и выделению этого **гормона, провоцирующего распад мюллеровского протока и предотвращению развития у особей мужского пола развития его в яйцевод и матку**, как это в норме происходит у женщин. Вероятно, белок Sox9 репрессирует в мужском организме важнейший ген, экспрессия которого обеспечивает развитие гонады по направлению к яичнику, Wnt4 (см. ниже).

Есть данные, позволяющие предполагать, что механизм индукции мужских структур в гонаде идет через включение с помощью SRY или Sox9 (прямо или через промежуточные агенты) в эпителии полового гребня синтеза и выделения паракринного фактора **FGF9**. Этот фактор способен через механизм хемотаксиса **привлекать в зачаток гонады клетки зачатка мезонефроса**. Клетки мезонефроса и являются, вероятно, индукторами превращения клеток нейтрального по полу эпителия зачатка гонады в клетки Сертоли семенника. При нокауте (отключении) гена FGF9 почти всегда развиваются самки. При совместном культивировании *in vitro* эксплантированных зачатков гонады (с кариотипом XX) и зачатков мезонефроса клетки мезонефроса в гонаду не врастают, тогда как в гонаду из клеток с кариотипом XY врастают клетки мезонефроса как с кариотипом XY, так и с кариотипом XX. Вращение происходит и в том случае, если гонада берется от животного с кариотипом XX, но которому методом трансгеноза ввели ген SRY или которую культивируют совместно с клетками мезонефроса в среде с добавлением FGF 9. Канальцы самого семенника образуются только при условии миграции клеток мезонефроса в гонаду, но при наличии в клетках гонады двух X-хромосом сперматозоиды в образовавшихся канальцах не дифференцируются. Показано, что кроме привлечения клеток мезонефроса в гонаду FGF9 провоцирует пролиферацию в гонаде эндокринных клеток Лейдига (секретирующих тестостерон) и способствует диффе-

ренцировке клеток Сертоли.

В опыте по получению химерных мышинных эмбрионов, где один из соединяемых ранних эмбрионов имел кариотип XX, а другой XY тип гонады (семенник или яичник) зависел от преобладания в среде неполовых клеток гонады того или иного кариотипа. В случае развития яичника, среди его фолликулярных клеток наряду с XX-клетками встречались и XY-клетки. Присутствие Y-хромосомы не мешало дифференцировке клетки по типу, характерному для женского организма. Однако в случае развития семенника среди клеток Сертоли не удалось найти клеток с кариотипом XX. Очевидно, без запуска транскрипции гена *Sox9* белком *SRY*, ген которого находится в у-хромосоме, невозможна экспрессия гена *FGF9*, необходимая для индукции клеток Сертоли. Если же экспрессия *Sox9* обеспечивается трансгеном, вставленным в зиготу с кариотипом XX, развивается как сказано выше мужской организм и в отсутствии Y-хромосомы, причем формируются каналцы семенника, клетки Сертоли с кариотипом XX, продуцирующие антимюллеровский гормон, но из-за наличия в клетках Сертоли двух X-хромосом зрелые сперматозоиды не появляются как и у людей и мышей с кариотипом XXУ (синдром Кляйнфельтера).

Важным белком транскрипционного комплекса, включающего, в частности, гены, ответственные за развитие гонад, является **SF1** (стероидогенный фактор 1). Он задействован уже в процессе развития полового валика, т.е. недифференцированной по полу гонады. Однако в женских эмбрионах с кариотипом XX его активность постепенно падает, а в мужских эмбрионах с кариотипом XY экспрессия гена *SF1* сохраняется и он играет важную роль в маскулинизации как лейдиговских клеток, так и клеток Сертоли. Таким образом ответ на стандартный вопрос: “Где и когда экспрессируется ген *SF1*?” должен быть следующим. Сначала это эпителий полового гребня как семенника, так и яичника, а позднее это эмбриональные клетки Сертоли, происходящие из этого эпителия, а также лейдиговские клетки, происходящие из мезенхимы зачатка гонады. Для достаточной транскрипции гена антимюллеровского гормона (АМГ), разрушающего мюллеровский проток, требуется активность и *SF1* и *Sox 9*. Таким образом, на вопрос: “Как действует ген *SF1*?” - ответ заключается в следующем - обеспечивает синтез белка транскрипционного фактора, который содействует экспрессии гена АМГ, т.е. синтезу АМГ в клетках Сертоли, а в лейдиговских клетках экспрессия *SF1* включает экспрессию ферментов стероидного обмена, обеспечивающих синтез тестостерона. Длительная экспрессия гена *SF1* поддерживается прямо или косвенно геном *SRY*. При гетерозиготности по наличию в клетках гена *SF1* (т.е. при уменьшении дозы гена) у пациента сохранились производные мюллеровского протока матка и яйцевод, а семенники обнаруживали признаки фиброза.

Другим геном, который включается на стадии полового валика как у мужских, так и у женских эмбрионов, является ген **Wnt4**, локализованный в аутосоме (неполовой хромосоме). В развивающихся семенниках его экспрессия вскоре угасает, а в яичниках удерживается. В отсутствии гена *Wnt4* (трансгенозное выключение) у XX - особей нормальное развитие яичника предотвращается, и в гонаде синтезируются АМГ и тестостерон. Напротив, при дупликации

Wnt4 (увеличении дозы гена) даже из ХУ-зигот развивается женский организм. Функция белка Wnt4, по-видимому, включение транскрипции субъединицы Taf_{II}105 белка, связывающегося с промоторами генов и обеспечивающего присоединение к нему РНК-полимеразы. Ген Taf_{II}105 экспрессируется только в фолликулярных клетках яичника. В отсутствие данной субъединицы яичник не развивается. Другой функцией белка Wnt4 является включение транскрипции гена **DAX1**, кодирующего белок, репрессирующий экспрессию гена Sox9 и блокирующего тем самым развитие в направлении мужского организма.

Подобно тому, как при высокой дозе Sox9-гена мужской пол проявляется даже в отсутствии Y-хромосомы, при высокой дозе гена **DAX1** (дупликация участка X-хромосомы), локализованного в X-хромосоме, развивается женский организм даже из зигот ХУ с нормальной Y-хромосомой. Белок DAX1 является внутриядерным рецептором, конечный эффект которого сводится к подавлению экспрессии гена Sox9. На стадии полового валика DAX1 экспрессируется и в мужском и в женском зародышах, причем на определенном этапе в одних и тех же клетках мужского зародыша экспрессируются и ген DAX1 и ген SRY. Однако позднее в мужском организме экспрессия гена DAX1 падает, тогда как в женском экспрессия сохраняется и позднее. При наличии единственной копии гена DAX1 в мужском организме его действие оказывается недостаточным и ген SOX9 все-таки экспрессируется. Однако при двух копиях этого гена в нормальном женском организме или при мужском кариотипе ХУ с дупликацией DAX1 в единственной X-хромосоме ингибирующий эффект проявляется и формируется женский организм с недоразвитой гонадой, не выделяющей ни АМГ, ни тестостерон. Таким образом, экспрессия DAX1 нужна для развития гонады вообще и для исключения появления мужских признаков путем ингибирования экспрессии Sox9.

Вторичная детерминация пола.

Развитие других органов, связанных с полом, определяется гормонами, вырабатываемыми семенником (АМГ, тестостерон, дигидротестостерон) или яичником (эстроген). Часть морфогенезов этих органов протекает в эмбриональный период, а другая часть при наступлении половой зрелости и беременности. Так АМГ, вырабатываемый клетками Сертоли в эмбриональный период, связывается рецепторными молекулами мезенхимных клеток, окружающих эпителий мюллерова протока, что ведет, по-видимому, к выделению мезенхимой паракринного фактора, запускающего апоптоз в эпителии. Пересадка в культуру *in vitro* эмбриональных клеток Сертоли вместе с зачатками мюллеровского и вольфова протоков приводит к деградации мюллеровского, но не вольфова протока.

Для развития семявыносящих канальцев, семенных везикулов, эпидидимиса необходимо действие **тестостерона** на канальцы мезонефроса и вольфов проток. Однако для образования наружных половых органов: мошонки и пениса, а также простаты требуется другой гормон - дигидротестостерон, который образуется позже путем биохимической модификации тестостерона в уrogenи-

тальном синусе. При отсутствии эффективного фермента **5 α -кетостероидредуктазы 2**, преобразующего тестостерон в дигидротестостерон, из-за мутации соответствующего гена, дети с генотипом ХУ имеют функциональные семенники, но наружные половые органы сформированы по женскому типу : есть влагалище, которое однако заканчивается слепо (нет производных мюллерова протока), есть клитор, но увеличенный, мошонка отсутствует. По-видимому, по характеру воздействия на ткани дигидротестостерон не отличается от тестостерона, но он на единицу дозы гораздо эффективней. Когда у таких “лжедевочек” начинается половое созревание и уровень тестостерона радикально возрастает, ткани наружных половых органов реагируют на этот новый уровень с образованием полового члена и мошонки и “лжедевочка” оказывается мальчиком. В медицине препарат **финастерид**, ингибирующий преобразование тестостерона в дигидротестостерон, используется для подавления чрезмерного роста простаты и облысения скальпа по мужскому типу.

При отсутствии рецептора к тестостерону из-за мутации его гена из зиготы с кариотипом ХУ также развивается внешне женский организм, хотя имеются неопущенные в мошонку семенники, способные вырабатывать и АМГ и тестостерон. Зачатки матки и яйцеводов дегенерируют под действием АМГ. Влагалище поэтому представляет собой слепо заканчивающийся карман.

Гормон яичника **эстроген** влияет на дифференцировку слизистой оболочки яйцеводов и матки. Повышенные дозы гормона или его синтетических аналогов (диэтилстилбестрол, используемый иногда ради сохранения беременности при риске спонтанного аборта) способны изменить структуру слизистой таким образом, что в яйцеводе возникает структура эпителия, типа маточной, а в матке эпителия, типа шейки матки. У взрослых мутантных мышей-самок с дефектными генами рецепторов эстрогена наступает гибель половых клеток , а фолликулярные клетки яичника после этого превращаются в клетки Сертоли. Эстрогены способствуют росту и дифференцировке канальцев молочной железы в период полового созревания и беременности. У взрослых мутантных мышей-самцов с дефектными генами рецепторов эстрогена сперма оказывается очень разбавленной, что влечет за собой бесплодие. Таким образом в организме самцов вырабатывается некоторое количество эстрогена, необходимого для откачки воды из спермы стенками семявыносящего канала (vas deferens) и обеспечение, тем самым, ее высокой концентрации в эякуляте.

Вторичные половые признаки не исчерпываются перечисленными выше. К ним относятся также борода и усы мужчин, строение гортани, обеспечивающее обычно более низкий голос у мужчин, особенности функционирования некоторых центров головного мозга, обеспечивающие разное поведение, связанное с полом от непосредственно связанного со спариванием, до пения самцов птиц. Многие из них прямо связаны с действием половых гормонов (как усы и борода, которые могут формироваться только при выработке в организме достаточного количества тестостерона, а при его введении женщинам у них усиливается рост волос в местах, соответствующих бороде и усам).

На рис. 83 кратко суммированы некоторые данные о потоках информации в эмбрионе, определяющие дифференцировку организма млекопитающих по по-

лу.

Формирование первичных и вторичных признаков пола представляет общебиологический интерес как пример невероятно плеiotропного действия гена SRY, локализованного в Y-хромосоме. Единственный ген, кодирующий белок-регулятор, связывающийся с промоторными областями других генов, вызывает целый каскад событий, проявляющихся как морфологическая и функциональная дифференцировка в самых разных органах от наружных половых

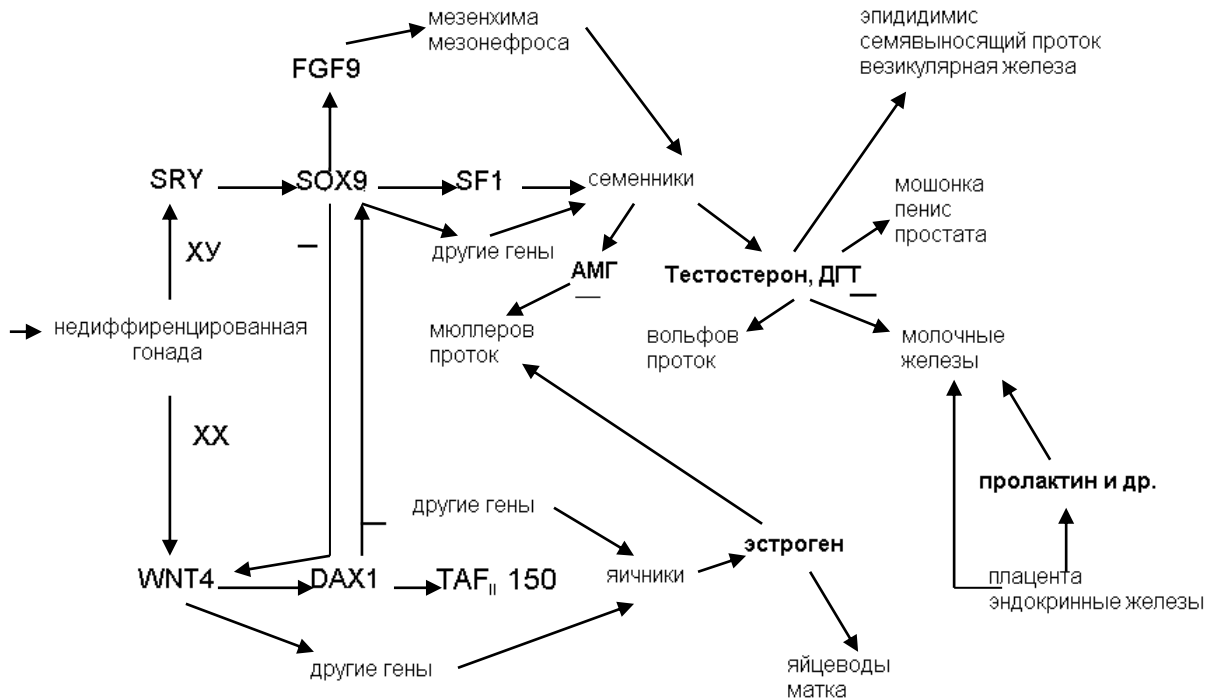


Рис. 86. Схема потоков информации при развитии половых признаков. Стрелка означает стимулирующий эффект экспрессии гена или гормона на процесс экспрессии другого гена или развитие органа. Стрелка со знаком “-” означает ингибирующее действие.

до некоторых участков мозга и роста волос на определенных участках поверхности кожи. Более или менее непосредственно регуляторный белок действует на гены немногих других белков. Однако эти белки, сами являясь регуляторными, обеспечивают включение генов ферментов, обеспечивающих синтез гормонов, в частности антимюллеровского, тестостерона и дигидротестостерона. Эти гормоны, воздействуя на целый ряд тканей, имеющих рецепторы к этим гормонам, радикально меняют их морфофункциональное состояние, разрушая одни структуры (матку, яйцевод, молочную железу) и стимулируя развитие многочисленных других органов или состояний, специфичных для мужского организма (половой член, усы и борода, простата, мошонка, тип гортани и зависящий от него голос и т.д.).

Приведенные примеры организации морфогенезов наглядно демонстрируют нам, что ген не «волшебная палочка», одного наличия которой достаточно

для появления того или иного признака. Каждый ген, определяющий «признак» имеет определенное время, место экспрессии и вполне познаваемый и требующий пояснения гисто- и цитофизиологический способ действия на формирование признака. Именно такая постановка вопроса о генетической обусловленности морфогенезов становится в наши дни одной из самых актуальных и перспективных в биологии развития.

17.5. Развитие сомитов и тканей, развивающихся из них

Сомиты – форма сегментации осевой мезодермы (примыкающей к непарным структурам спины - хорде и нервной трубке). Сегментация - это распадение тянущихся от головы к хвосту слева и справа от нервной трубки полосок мезенхимы на обособленные шарообразные или почти кубические сегменты (см. рис. 62 на стр. 174). Смысл сегментации заключается в формировании из сомитов периодически повторяющихся в направлении от головы к хвосту структур таких, как позвонки, ребра, межреберные мышцы и др. При этом каждый позвонок образуется из задней части очередного переднего сомита и передней части следующего за ним сомита. Обособление порций мезенхимной полосы в сомиты происходит не одновременно для всех сомитов, а последовательно от головы к хвосту.

Дифференцировка сомита в несегментированной мезенхиме начинается с эпителизации будущего переднего края сомита. Детерминация переднего края реализуется через экспрессию в соответствующих клетках гена *Notch*. Индукция активности *Notch* достигается выделением гензеновским узелком белка *Lupatic fringe*. Гензеновский узелок выделяет и паракринный фактор, препятствующий формированию сомитов - FGF8. Деграция важной структуры, характерной для стадии гастролы, – первичной полосы происходит спереди назад. Лишь по мере отодвигания переднего конца первичной полосы каудальнее презумптивные передние сомиты оказываются вне поля ингибирующего действия FGF8, и становится возможной дифференцировка очередного сомита. Для активации *Notch* и эпителизации переднего края сомита у человека необходим белок *Delta-like 3*, вступающий во взаимодействие с *Notch*. Для завершения обособления сомита необходима эпителизация и заднего края сомита с последующим обособлением от каудальнее расположенной мезенхимы.

На формирование пары (левого и правого) сомитов у куриного эмбриона требуется 1.5 часа. По числу уже образовавшихся сомитов даже стали определять стадию развития эмбриона.

Такая периодичность и последовательность обособления сомитов от несегментированной мезенхимы осевой мезодермы базируется на интересном волновом процессе распространяющемся по мезенхиме. Обособление заднего края сомита от переднего края сопровождается экспрессией в задних клетках сомита гена *Hairy1*. Экспрессия этого гена затем сохраняется в задних, но отсутствует в передних частях сомитов, обособившихся раньше от мезенхимы. Включение экспрессии *Hairy1* в клетках мезенхимы, которые должны сформировать задний край очередного сомита протекает следующим образом. Сначала

в каудальном конце полосы мезенхимы, далеко отстоящем от последнего сомита начинается волна экспрессии *Hairy1*, тогда как в клетках будущего еще ненаметившегося сомита ее нет. Передний фронт зоны экспрессии движется вперед к последнему сомиту и одновременно длина участка мезенхимы, где видна экспрессии сокращается так, что в каудальном конце полосы мезенхимы экспрессия прекращается. Суженная полоска зоны экспрессии достигает места, где в дальнейшем окажется задняя часть очередного сомита, и здесь происходит отделение заднего края очередного сомита от пока несегментированной мезенхимы. К этому моменту в хвостовом конце несегментированной мезенхимы вновь начинается волна экспрессии *Hairy1*, и цикл повторяется с образованием нового сомита.

Ген *Hairy1* – транскрипционный фактор, прямо или косвенно включающий экспрессию генов паракринного фактора *ephrin* и его рецептора *Eph*, которые запускают цепь событий, приводящих к обособлению сомита от расположенной каудальнее несегментированной мезенхимы. Еще до обособления сомита от мезенхимы клетки сомита превращаются из мезенхимы в эпителий с помощью синтезируемых белков фибронектина и β -cadherin. Для их образования клетками сомита необходима экспрессия транскрипционного фактора *Paraxis* и активация регулирующего цитоскелет белка *Rac1*, достигающаяся путем связывания интегрин клеток с фибронектином.

Сформировавшиеся шарики сомитов подвергаются нескольким индукционным воздействиям с разных сторон:

1) На медио-вентральную сторону сомита со стороны хорды и нижней части нервной трубки воздействует паракринный фактор *Shh*, провоцируя в соответствующей части сомита экспрессию транскрипционного фактора *Rax1*, включающего гены, необходимые для развития хрящевых клеток скелета. Таким образом, медиовентральная часть сомита становится склеротомом и участвует в формировании позвоночника, ребер и некоторых других частей осевого скелета. Образование этих структур связано с распадением этой части эпителия сомита на мезенхиму и формированием из нее хрящевых структур и связок.

2) На дорзальную сторону сомита со стороны дорзальной части нервной трубки действует нейротрофин NT-3. Под его влиянием эпителиальная структура сомита с этой стороны разрушается, и клетки данной части сомита формируют соединительнотканную основу кожи – кориум спинной поверхности тела. Поэтому дорзальная сторона сомита получила название дерматом.

3) На дорзо-медиальной стороне сомита под влиянием индуктора *Wnt*, выделяемого из верхней половины нервной трубки включается экспрессия транскрипционного фактора *Myf5*, характерного для мышечной ткани. После распада эпителия на мезенхиму эти клетки формируют мышцы спины. Наконец, на латеральную сторону сомита со стороны дорзальной эктодермы спины действует паракринный фактор *Wnt*, а со стороны боковой мезодермы паракринный фактор *BMP* и, возможно, *FGF-5*. Под их воздействием в этих клетках сомита включается экспрессия транскрипционных факторов *MyoD* и *Myf5*, также включающих гены, необходимые для формирования мышц (брюшного пресса и конечностей). Обе эти части сомита являются, таким обра-

зом, миотомом, разделенным склеротомом на две части.

ГЛАВА ВОСЕМНАДЦАТАЯ

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИМЕДИЦИНСКИЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

Клонирование животных. Однояйцевые близнецы, как пример природных клонов. Практическое значение клонирования животных. Методические подходы к проблеме получения клонов. Краткая история искусственного клонирования позвоночных. Работы Г.В.Лопашова, Кинга, Бриггса, Д.Гердона. Первые эксперименты по клонированию эмбрионов млекопитающих. Работы по клонированию овец и КРС Уилладина, Уилмута. Исследования по получению трансгенных животных. Методы переноса генов млекопитающих. Основные практические направления геноинженерии животных. Исследование стволовых клеток. Теоретическое и практическое значение.

Огромный объем информации, накопленный учеными в области биологии индивидуального развития позволил развернуть исследования, имеющие не только чисто научное, но и огромное прикладное значение. Среди них, в частности, можно отметить работы по клонированию животных, изучению стволовых клеток, биологии размножения, трансгенозу.

Большой интерес привлекают в последние годы исследования в области клонирования животных. Клонирование -это процесс создания клонов или организмов, имеющих одинаковый набор генов или генотип. Классическим примером клонов у человека и животных являются очень похожие друг на друга однояйцевые близнецы, которые возникают вследствие естественного деления оплодотворенной яйцеклетки на два отделяющихся друг от друга и в последующем самостоятельно развивающихся бластомера. Как известно, в процессе размножения подавляющего большинства высших организмов дочерняя особь получает половину генов от отца, а половину - от матери. В результате полученная особь отличается по генотипу, а, значит, и по фенотипу, как от отца, так и от матери. Именно этим достигается такое разнообразие морфологических (внешних) признаков особей даже в пределах одного вида.

В случае же клонов - внешние отличия если и имеют место, то они незначительны и формируются под влиянием внешних факторов и так называемых стохастических (случайных) процессов. Именно этим обусловлена сугубо индивидуальная картина пигментации покрова у пегих животных, однояйцевых близнецов, различия в папиллярных пальцевых узорах близнецов и т.д.

В чём же практический смысл создания клонов? В том, что это дает возможность повторить какую-либо биологическую особь, отличающуюся выдающимися качествами. В практическом плане создание клонов привле-

кательно в области животноводства для дублирования, к примеру, коров с высоким надоем молока или овец с большим настригом шерсти. В более отдалённой перспективе клонирование можно использовать как метод дублирования не всего организма в целом, а лишь отдельных его частей или органов для нуждающихся в них пациентов, тем самым, обходя проблемы неприживляемости трансплантантов, возникающих вследствие генетической неидентичности донора и реципиента. Однако для клонирования взрослых позвоночных животных существуют многочисленные препятствия, главным из которых является то, что соматические клетки в животных в эмбриогенезе лишаются тотипотентности (клетки растений это свойство сохраняют).

Одним из вариантов получения клонов является партеногенез (см. главу 7). Естественно, что те особи, которые развиваются из потомков той или иной исходной половой клетки, будут в генетическом отношении одинаковыми и могут составить клон. Получают клоны и в экспериментальной эмбриологии. Если зародыша морского ежа на стадии раннего дробления искусственно разделить на составляющие его клетки - бластомеры, то из каждого разовьётся целый организм. В ходе последующего развития зародышевые клетки теряют эту замечательную способность и становятся все более специализированными. У многих животных объектов можно также использовать ядра так называемых стволовых эмбриональных клеток от какого-нибудь конкретного раннего эмбриона, которые еще не являются очень специализированными (таковым будет их потомство). Эти ядра пересаживают в яйцеклетки, из которых удалено собственное ядро, и такие яйцеклетки, развиваясь в новые организмы, опять-таки могут образовать клон генетически идентичных животных.

Отметим, кстати, что получение клона еще не означает получения точной копии клонированного животного. В описанных в главе 7 исследованиях В.А. Струнникова было показано, что в партеноклонах шелкопряда разнообразие по многим признакам может быть даже выше, чем в обычной популяции. Даже у однойяйцевых (монозиготных) близнецов человека обнаруживают отличия, иногда существенные.

История искусственного клонирования позвоночных начинается в 40-е годы, когда советский эмбриолог Г.В.Лопашов разработал метод пересадки (трансплантации) ядер в яйцеклетку лягушки. В 50-е годы американские эмбриологи Бриггс и Кинг выполнили сходные опыты на лягушках. Они разработали микрохирургический метод пересадки ядер эмбриональных клеток с помощью тонкой стеклянной пипетки в лишённые ядра (энуклеированные) яйцеклетки. Ими было показано, что если брать ядра из клеток зародыша леопардовой лягушки (*Rana pipiens*) на стадии бластулы, то примерно в 80% случаев зародыш благополучно развивается дальше и превращается в нормального головастика. Если же донорами ядер являлись клетки гастролы или нейрулы, то лишь менее чем в 20% или 5% случаев соответственно, оперированные яйцеклетки развивались нормально. То-есть, в ходе развития соматические клетки

становятся все более детерминированными и дифференцированными, а их потенции снижаются. Эти результаты позже были подтверждены и в других работах.

Большой вклад в разработку этой проблемы внес английский биолог Джон Гердон. При этом им были получены гораздо более внушительные результаты, главным образом потому, что он экспериментировал с более примитивными, чем *Rana pipiens*, южноафриканскими лягушками *Xenopus laevis* (1962). В качестве донора ядер Гердон использовал не только клетки раннего зародыша, но и вполне специализировавшиеся клетки эпителия кишечника плавающего головастика. Ядра яйцеклеток реципиентов он не удалял хирургическим путем, а разрушал ультрафиолетовыми лучами. В большинстве случаев реконструированные яйцеклетки не развивались, но примерно десятая часть из них образовывала эмбрионы. 6,5% из этих эмбрионов достигали стадии бластулы, 2,5% - стадии головастика и только 1% развился в половозрелых особей. Однако появление нескольких взрослых особей в таких условиях могло быть связано с тем, что среди клеток эпителия кишечника развивающегося головастика довольно длительное время присутствуют первичные половые клетки, ядра которых могли быть использованы для пересадки. В последующих работах как сам автор, так и многие другие исследователи не смогли повторить данные этих первых опытов (таково значение элемента удачи!).

Позже (1966) Гердон модифицировал схему эксперимента. Поскольку большинство реконструированных яйцеклеток (с ядром клетки кишечного эпителия) погибают до завершения стадии гаструлы, он попробовал извлечь из них ядра на стадии бластулы и снова пересадить их в новые энуклеированные яйцеклетки (такая процедура называется "серийной пересадкой" в отличие от "первичной пересадки"). Число зародышей с нормальным развитием после этого увеличивалось, и они развивались до более поздних стадий по сравнению с зародышами, полученными в результате первичной пересадки ядер.

Затем Гердон вместе с Ласки (1970) стали культивировать *in vitro* (в питательной среде вне организма) клетки почки, легкого и кожи взрослых животных и использовать уже эти клетки в качестве доноров ядер. Примерно 25% первично реконструированных яйцеклеток развивались до стадии бластулы. При серийных пересадках они развивались до стадии плавающего головастика. Таким образом было показано, что клетки трех разных тканей взрослого позвоночного (*X. laevis*) содержат ядра, которые могут обеспечить развитие по крайней мере до стадии головастика.

Несколько позднее Ди Берардино и Хофнер использовали для трансплантации ядра неделящихся клеток крови - эритроцитов лягушки *Rana pipiens* (1975). После серийной пересадки таких ядер 10% реконструированных яйцеклеток достигали стадии плавающего головастика. Однако, даже с помощью многократных серийных пересадок (более 100 клеточных циклов) реконструированные яйцеклетки дальше стадии головастика не развивались.

Таким образом, во многих работах показано, что в случае амфибий донорами «полноценных» ядер могут быть лишь зародыши на ранних стадиях раз-

вития. Некоторые авторы называют подобные эксперименты клонированием амфибий, хотя правильнее называть их клонированием эмбрионов амфибий, так как в этом случае экспериментаторы размножают бесполом путем не взрослых животных, а ранних зародышей.

Дифференцировка клеток в ходе развития позвоночных сопровождается инактивацией неработающих генов. Именно поэтому клетки теряют тотипотентность и дифференцировка становится необратимой. В конце концов у одних клеток происходит полное репрессирование генома, у других - в той или иной степени деградирует ДНК, а у эритроцитов млекопитающих разрушается даже ядро. Однако наряду с дифференцированными клетками, культивируемые *in vitro* клеточные популяции организма содержат малодифференцированные стволовые клетки, которые и могут быть использованы как доноры ядер для клонирования млекопитающих.

Опыты с амфибиями показали, что ядра различных типов клеток одного и того же организма генетически идентичны и в процессе клеточной дифференцировки постепенно теряют способность обеспечивать развитие реконструированных яйцеклеток, однако серийные пересадки ядер и культивирование клеток *in vitro* в какой-то степени увеличивает эту способность.

Успешные опыты с амфибиями заставили ученых задуматься о клонировании эмбрионов млекопитающих. Работа методически оказалась довольно трудной, прежде всего потому, что объем яйцеклетки у млекопитающих примерно в тысячу раз меньше, чем у амфибий. Однако эти трудности были успешно преодолены. Вначале экспериментаторы научились микрохирургически удалять пронуклеусы из зигот (оплодотворенных яйцеклеток) мыши и пересаживать в них клеточные ядра ранних эмбрионов. Однако все полученные разными способами зародыши мышей неизменно развивались лишь до стадии бластоцисты.

Значительно усовершенствовав методы извлечения ядер и введения их в клетку, МакГрат и Солтер провели серию экспериментов и сообщили, что высокий выход живых мышей они получили, когда в качестве доноров ядер использовали зиготы, но если донорами были ранние эмбрионы, то реконструированные яйцеклетки, как и прежде, развивались только до стадии бластоцисты.

Метод МакГрата и Солтера стал широко использоваться разными экспериментаторами. Так, Манн и Ловел-Бадж выделяли пронуклеусы из яиц, активированных к партеногенезу, и пересаживали их энуклеированные зиготы мышей. В этих случаях эмбрионы погибали на ранних стадиях. Если же наоборот, пронуклеусы получали из оплодотворенных яиц и пересаживали в партеногенетически активированные и лишённые ядра яйца, то такие зародыши развивались нормально до рождения. Сурани с соавторами установили, что если добавить женский пронуклеус из зиготы мыши к гаплоидному набору хромосом яйцеклетки, то нормального развития не происходит, добавление же мужского ядра приводит к нормальному развитию. С другой стороны, рекомбинации мужского и женского пронуклеусов из разных оплодотворенных яйцеклеток мышей обеспечивает нормальное развитие, а комбинация двух мужских или

двух женских пронуклеусов останавливает развитие эмбриона.

Эти опыты показали, как уже говорилось ранее (в главе 7), что для нормального развития млекопитающих требуются два набора хромосом - отцовский и материнский. Поэтому ни у одного из известных видов млекопитающих не описан партеногенез.

Гибель партеногенетических (гиногенетических) и андрогенетических зародышей у млекопитающих связана с различной активностью в онтогенезе материнского и отцовского геномов. Механизм, регулирующий эти функциональные различия, был назван геномным импринтингом и изучался в ряде работ, где было показано, что для нормального развития млекопитающих требуется наличие мужского генома.

МакГрат и Солтер показали, что ядра 8-клеточных зародышей и клеток внутренней клеточной массы бластоцисты мышей не обеспечивают развитие *in vitro* реконструированных яйцеклеток даже до стадии морулы, которая предшествует стадии бластоцисты. Небольшая часть (5%) ядер 4-клеточных зародышей дает возможность развиваться только до стадии морулы. В то же время 19% реконструированных яйцеклеток, содержащих ядра 2-клеточных зародышей, смогли достичь стадии морулы или бластоцисты.

Эти и многие другие данные показывают, что в эмбриогенезе у мышей клеточные ядра очень рано теряют тотипотентность, что связано, очевидно, с очень ранней активацией генома мышинного зародыша - уже на стадии 2-х клеток. У других млекопитающих, в частности, у кроликов, овец и крупного рогатого скота, активация первой группы генов в эмбриогенезе происходит позднее, на 8-16-клеточной стадии. Возможно, поэтому первые значительные успехи в клонировании эмбрионов были достигнуты на других видах млекопитающих, а не на мышах. Тем не менее, работы с мышами значительно расширили современные представления о методологии клонирования млекопитающих.

Американские исследователи Стик и Робл, используя методику МакГрата и Солтера, получили 6 живых кроликов, пересадив ядра 8-клеточных эмбрионов одной породы в лишенные ядра яйцеклетки кроликов другой породы. Фенотип родившихся полностью соответствовал фенотипу донора. Однако только 6 из 164 реконструированных яйцеклеток (3,7%) развились в нормальных животных.

Работа с реконструированными яйцеклетками крупных домашних животных, коров или овец шла несколько по-другому. Их сначала культивировали не *in vitro*, а *in vivo* - в перевязанном яйцевом - промежуточного (первого) реципиента. Затем их оттуда вымывали и трансплантировали в матку окончательного (второго) реципиента - коровы или овцы соответственно, где их развитие происходило до рождения детеныша. Уилдсин предложил заключать реконструированные яйцеклетки в агаровый цилиндр, который он затем трансплантировал в перевязанный яйцевод овцы. По данным одних авторов реконструированные зародыши лучше развиваются в яйцеклетке, чем в культуральной среде, хотя некоторые исследователи получили неплохие результаты и при культивировании. Уилдсин еще в 1986 году показал, что и у эмбрионов овец на 16-клеточной стадии развития ядра сохраняют тотипотентность. Реконстру-

ированные яйцеклетки, содержащие ядра бластомеров 16-клеточных зародышей, развивались нормально до стадии бластоцисты в перевязанном яйцеводе овцы (в агаровом цилиндре), а после освобождения от агара и пересадки в матку овцы - второго реципиента - еще 60 дней. В другом случае донорами служили ядра 8-клеточных зародышей и были получены 3 живых ягненка, фенотип которых соответствовал породе овец - доноров. Зародыши в этой работе развивались только в тех случаях, когда в зиготы пересаживали пронуклеусы: 17% таких зародышей достигли стадии морулы или бластоцисты.

Позднее Уиладсину удалось получить четырех генетически идентичных бычков голштинской породы в результате пересадки в реципиентные яйцеклетки ядер бластомеров одного 32-клеточного зародыша. Автор утверждал, что большинство ядер сохраняет тотипотентность на 32-клеточной стадии, а значительная их часть даже и на 64-клеточной стадии, обеспечивая нормальное развитие реконструированных яйцеклеток до стадии ранней бластоцисты в яйцеводе овцы. После пересадки в матку коров - окончательных реципиентов, как полагает автор, они могут и дальше нормально развиваться (схема эксперимента приведена на рис.87).

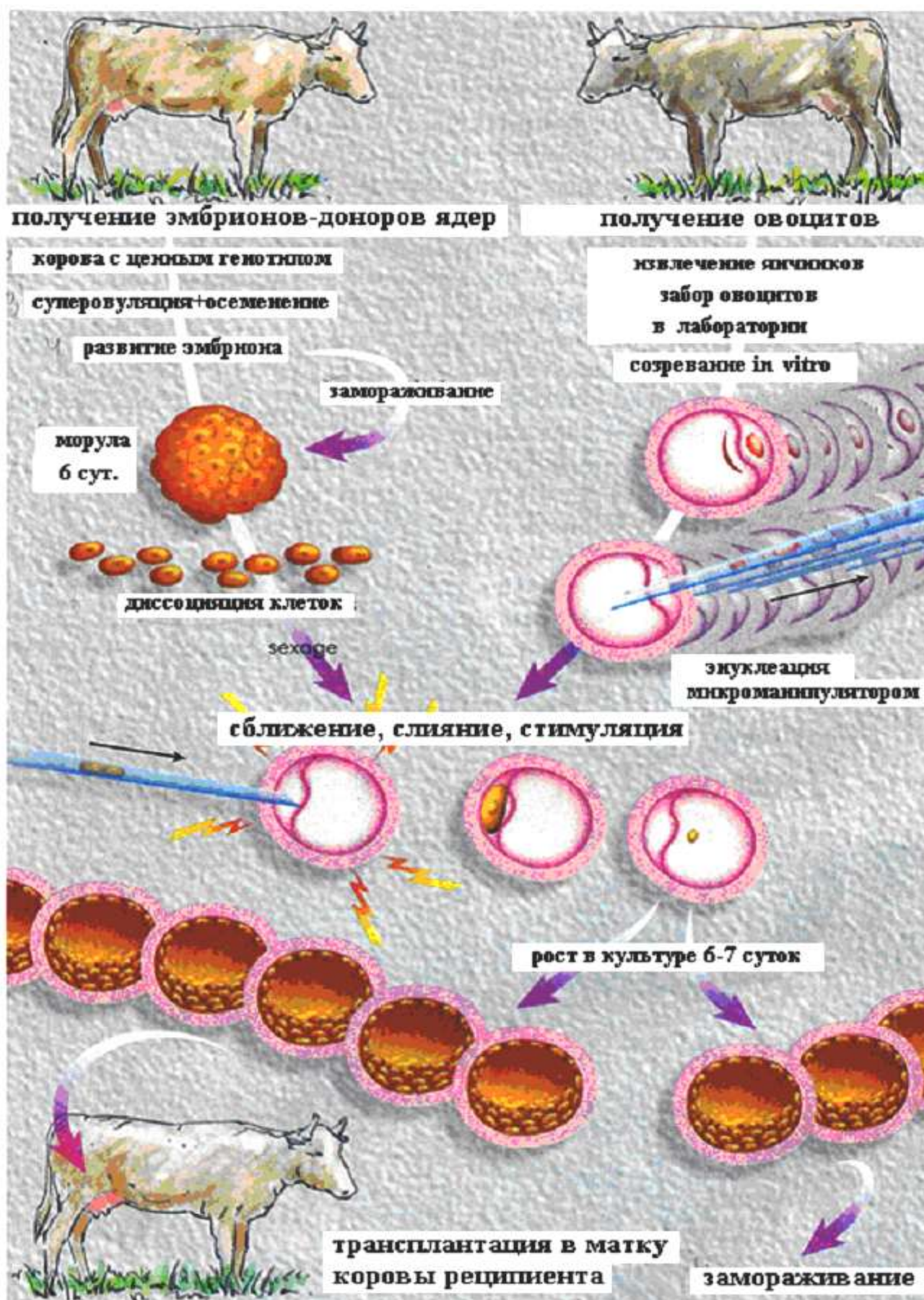


Рис. 87. Клонирование клеток морулы крупного рогатого скота.

Наибольший общественный резонанс получили проведенные в конце

1990-х годов замечательные эксперименты по клонированию овец. В 1989 году Смит и Уилмут из Рослинского института (Эдинбург, Шотландия) трансплантировали ядра клеток 16-клеточного эмбриона и ранней бластоцисты в лишенные ядра неоплодотворенные яйцеклетки овец. В первом случае было получено два живых ягненка, фенотип которых соответствовал породе овец - доноров ядер. Во втором случае один полностью сформировавшийся ягненок погиб во время родов. Его фенотип также соответствовал породе - донору. Авторы считали, что в ходе дифференцировки эмбриональных клеток происходит инактивация некоторых важных для развития генов, в результате которой ядра бластоцисты уже не могут репрограммироваться в цитоплазме яйцеклетки и обеспечить нормальное развитие реконструированного зародыша. Поэтому, по мнению авторов, в качестве доноров ядер лучше использовать 16-клеточные эмбрионы или культивируемые *in vitro* линии эмбриональных клеток, ядра которых обладают тотипотентностью.

Позднее, в 1993-1995 годах, группа исследователей под руководством Уилмута получила клон овец - 5 идентичных животных, донорами ядер которых была культура эмбриональных клеток. Клеточную культуру получали следующим образом: выделяли микрохирургически эмбриональный диск из 9-дневного овечьего эмбриона (бластоцисты) и культивировали клетки *in vitro* в течение многих пассажей (по крайней мере до 25). Сначала клеточная культура напоминала культуру стволовых недифференцированных эмбриональных клеток, но вскоре, после 2-3-х пассажей, клетки становились уплотненными и морфологически сходными с эпителиальными. Эта линия клеток из 9-дневного зародыша овцы была обозначена как TNT4.

Чтобы донорское ядро и реципиентная цитоплазма находились на сходных стадиях клеточного цикла, останавливали деление культивируемых клеток TNT4 на определенной стадии (G_0) и ядра этих клеток пересаживали в энуклеированные яйцеклетки (соответственно на стадии метафазы II). Реконструированные эмбрионы заключали в агар и трансплантировали в перевязанные яйцеводы овец. Через 6 дней эмбрионы вымывали из яйцевода первого реципиента и исследовали под микроскопом. Отбирали те, которые достигли стадии морулы или бластоцисты и пересаживали их в матку овцы - окончательного реципиента, где развитие продолжалось до рождения. Фенотипически все ягнята были сходны с породой овец, от которой получали исходную линию клеток TNT4. Это подтвердил и генетический анализ.

Эта работа, особенно в части культуры эмбриональных клеток, - значительное достижение в клонировании млекопитающих, хотя она и не вызвала столь шумного интереса, как статья того же Уилмута с соавторами, опубликованная в феврале 1997 года, где сообщалось, что в результате использования донорского ядра клетки молочной железы овцы было получено клональное животное - овца по кличке Долли. Яйцеклетки для этой цели извлекли из овец породы шотландская черномордая, затем поместили их в искусственную питательную среду с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки при температуре 37°C и удалили собственное ядро. В энуклеированные яйцеклетки вводи-

лись разные клетки животного -донора, но наиболее приемлимыми оказались диплоидные клетки молочной железы взрослой беременной овцы породы финский дорсет. Эти клетки выводили из стадии роста клеточного цикла, разбавляя сыворотку, и через пять дней сливали с энуклеированным ооцитом. Последний затем активировали к развитию посредством электрического разряда. Развивающийся зародыш культивировали в течение 6 дней в искусственной химической среде или в яйцевом овцы, перетянута лигатурой ближе к рогу матки. На стадии морулы или бластоцисты эмбрионы (от одного до трех) трансплантировали в матку приемной матери, где они могли развиваться до рождения. Из 236 опытов успех сопутствовал лишь одному, в результате которого и родилась овечка Долли. Позднее, в ответ на сомнения ряда крупнейших ученых, точными молекулярно-генетическими исследованиями было доказано, что Долли является клонированной.

Следует, однако, отметить, что в 2002 году у Долли было отмечено развитие артрита, который как предполагается мог стать результатом генных мутаций, инициированных процессом клонирования. Помимо артрита у животного наблюдался еще целый ряд отклонений от нормального развития. Животное аномально быстро старело и в феврале 2003 года ученые усыпили знаменитую овечку из-за прогрессирующей болезни легких в возрасте 6 лет. После нее осталось 4 нормальных ягненка.

Успех авторов этой работы прежде всего связан с использованием длительных клеточных культур, так как после многих пассажей в культуре клеток могли быть отобраны малодифференцированные стволовые клетки, которые, вероятно, и были использованы как доноры ядер. Большое значение также имел тот факт, что авторы, учитывая результаты своих предыдущих работ, синхронизировали стадии клеточного цикла яйцеклеток реципиентов и клеток доноров.

Большой интерес вызвали опыты группы ученых из университета в Гонолулу во главе с Р. Янагимачи. Авторам удалось усовершенствовать метод Уилмута, они отказались от электрической стимуляции слияния донорской соматической клетки с яйцеклеткой и сконструировали такую микропипетку, с помощью которой можно было безболезненно извлекать ядро из соматической клетки и трансплантировать его в энуклеированную яйцеклетку. Кроме того, авторы использовали в качестве донорских относительно менее дифференцированные ядра клеток, окружающих ооцит. Наконец, как бы удалось синхронизировать процессы, протекающие в яйцеклетке и трансплантируемом в нее ядре, что позволило обеспечить естественные ядерно-цитоплазматические взаимоотношения между ядром и цитоплазмой, поскольку трансплантируемое дифференцированное в определенном направлении ядро и цитоплазма яйцеклетки до того работали как бы в разных режимах. Янагимачи использовал для трансплантации ядра клеток, окружающих ооцит, клеток Сертоли из семенников и клеток, выделенных из мозга (авторы утверждают, что из нейронов). Ядра, выделенные из соматических клеток, инъецировали в энуклеированное яйцо с помощью микропипетки. Яйцо активировали к развитию, поместив в специальный раствор

(так называемый NEPES-CZB), свободный от кальция, и добавляя стронций и цитохалазин. Стронций активировал яйцо, а кальций подавлял образование полярных телец. Эмбрионы культивировали до стадии 2-8 клеток, а затем трансплантировали в матку приемной матери, где многие из них имплантировались и некоторые (15-16%) продолжали развитие. Процент выхода рожденных мышат (их извлекали с помощью кесарева сечения на 18,5-19-й дни беременности) был, однако, низок - в разных сериях экспериментов от 2 до 2,8%. Молекулярные исследования доказали принадлежность ядер рожденных мышат к клеткам донора соматических клеток.

На сегодняшний день в мире клонированы овцы, мыши, кролики, коровы, козы, кошки, собаки, свиньи, лошади и мулы. Однако, хотя эти работы являются, бесспорно, выдающимся достижением, перспективы их дальнейшего развития следует оценивать с осторожностью. На самом деле получить абсолютно точную копию данного конкретного животного (а именно такая конечная цель ставится сейчас в экспериментах по клонированию) намного сложнее, чем это представляется при поверхностном знакомстве с проблемой. И дело вовсе не в технической разработке методов клонирования, а в том, что структурно-функциональные изменения ядер в ходе индивидуального развития животных достаточно глубоки: одни гены активно работают, другие инактивируются и "молчат", при этом сам зародыш представляет собой своеобразную мозаику полей распределения таких функционально различных генов. И чем организм более специализирован, чем выше ступенька эволюционной лестницы, на которой он стоит, тем эти изменения глубже и труднее обратимы. У некоторых организмов, например у известного кишечного паразита аскариды, генетический материал в будущих зародышевых клетках остается неизменным в ходе развития, а в других, соматических клетках выбрасываются целые большие фрагменты ДНК - носителя наследственной информации. В красных кровяных клетках (эритроцитах) птиц ядра сморщиваются и не работают, а из эритроцитов млекопитающих, стоящих эволюционно выше птиц, вообще удаляются в процессе эритропоэза. У плодовой мушки дрозофилы особенно четко выражены процессы, свойственные и другим организмам: селективное умножение или, наоборот, недостатка каких-то участков ДНК, по-разному проявляющиеся в разных тканях. Недавно было показано, что в соматических клетках в ходе их развития и деления хромосомы последовательно укорачиваются на своих концах, в зародышевых клетках специальный белок - теломераза достраивает, восстанавливает их, то есть полученные данные опять-таки свидетельствуют о существенных различиях между зародышевыми и соматическими клетками. И, следовательно, встает вопрос, способны ли ядра соматических клеток полностью и эквивалентно заменить ядра зародышевых клеток в их функции обеспечения нормального развития.

Итак, работы по клонированию позвоночных были начаты на амфибиях в начале 50-х годов и интенсивно продолжаются вот уже более четырех десятилетий. Что касается амфибий, то, как было сказано ранее, несмотря на значительные достижения, проблема клонирования взрослых особей остается до сих

пор не решенной. Установлено, что в ходе клеточной дифференцировки у позвоночных происходит или потеря определенных генных локусов или их необратимая инактивация. Судя по всему, утрачивается та часть генома, которая контролирует не ранние, а более поздние этапы онтогенеза, в частности, метаморфоз амфибий. Механизм этого явления пока не поддается научному объяснению. Но очевидно, что для клонирования взрослых позвоночных необходимо использовать малодифференцированные делящиеся клетки. Это методически важное положение было учтено в более поздних работах.

Другим обстоятельством на пути к получению точной копии клонируемого индивидуума является роль эпигенетических факторов. Согласно закономерностям двух основных разделов генетики - наследственности и изменчивости, - становление любого признака происходит в результате взаимодействия генов и среды. Роль этих факторов не одинакова: в развитии качественных признаков влияние среды сказывается существенно меньше, чем в формировании количественных. В последнем случае доля участия среды устанавливается статистически. Однако генетическая идентичность вовсе не означает абсолютного повторения морфологии, характера и темперамента клонов. Так, например, у клонов наблюдаются значительные физические различия в густоте шерсти и количестве зубов.

В ближайшие годы главная задача исследователей, работающих в данной области - это, по-видимому, создание культивируемых *in vitro* линий малодифференцированных стволовых клеток, характеризующихся высокой скоростью деления. Ядра именно таких клеток должны обеспечить полное и нормальное развитие реконструированных яйцеклеток, формирование не только морфологических признаков, но и нормальных функциональных характеристик клонированного организма.

Особенно большой ажиотаж нагнетается вокруг идеи о клонировании человека. В сущности речь идет даже не о клонировании, а о получении копии отдельного индивида, поскольку термин "клонирование" предполагает получение некоего множества особей. В этом вопросе в настоящее время существует как техническая, так и большая этическая проблемы.

Актуальнее, с практической точки зрения, работы по клонированию домашних животных. Использование технологии клонирования предоставляет уникальную возможность получать фенотипически и генетически идентичных животных, которые могут быть использованы для решения различных теоретических и практических задач, стоящих перед биомедициной. В частности, использование клонирования животных должно способствовать изучению проблемы тотипотентности дифференцированных клеток, развития и старения организмов, злокачественного перерождения клеток. Клонирование животных позволит проводить испытания медицинских препаратов на идентичных животных. В медицине представляется перспективной клеточная терапия на базе использования клонированных клеток. Такие клетки должны компенсировать недостаток и дефект собственных клеток организма и, главное, они не будут отторгаться при трансплантации.

Несколько слов о трансгенных животных. Современные методы се-

лекции сельскохозяйственных животных базируются на использовании внутри-видовой генетической изменчивости. При этом возможности селекции ограничены рамками генома. Преодолеть биологические границы видов и использовать межвидовую генетическую изменчивость для создания новых форм животных можно с помощью переноса генов из генома одного вида в геном другого вида. Если рекомбинантная конструкция гена интегрировалась в геном другого животного, то такой ген обозначается как **трансген**. Кодируемый трансгеном белок носит название **трансгенного продукта**. Животное, которое содержит в своем геноме трансген, называется **трансгенным**. Если животные передают трансгены своим потомкам, то образуются родственные группы трансгенных животных — **трансгенные линии**.

Для переноса генов млекопитающих в настоящее время используют четыре основных метода:

- микроинъекцию рекомбинантной ДНК в пронуклеус зиготы;
- опосредованный ретровирусами перенос генов;
- перенос трансформированных ядер половых и соматических клеток;
- использование спермиев как переносчиков ДНК;

Все методы переноса генетической информации млекопитающих охватывают ранние этапы онтогенеза- от оплодотворенной яйцеклетки до формирования бластоцисты, способной имплантироваться в матку реципиента.

Рассмотрим в качестве примера перенос генов методом микроинъекции ДНК в пронуклеус зиготы мыши. Суть метода заключается в следующем. Из яйцевода самки извлекают зиготы, освобождают их от окружающих фолликулярных клеток, инкубируют в специальных средах под объективом микроскопа. Затем зиготу фиксируют микропипеткой, а с противоположной стороны подводят инъекционную микропипетку, в которой находится раствор с геном. Для инъекции чужеродной ДНК в мужской пронуклеус зиготы используют плазмиды с конструкциями, промотор и структурный ген. В мужской пронуклеус инъецируют буферный раствор с рекомбинантной ДНК, содержащей до 100 и более копий гена. Как правило, 60-80% реконструированных зигот хорошо переносят микроманипуляции. После оценки жизнеспособности зиготы трансплантируют ложнобеременной самке-реципиенту другой генетической линии. Для подтверждения интеграции чужеродного гена от детенышей, родившихся из реконструированных зигот, извлекают кусочек ткани из хвоста или печени. ДНК из ткани этих органов анализируют с помощью дот - и блот – гибридизации. В большинстве экспериментов выход трансгенных мышей, оцененных по методу дот - и блот- гибридизации, составляет 1%. Однако экспрессия чужеродного гена происходит у 5-10% полученных трансгенных мышей. Для оценки стабильности наследования чужеродных генов в процессе смены поколений методами дот - и блот - гибридизации анализируют потомство трансгенных животных.

Успешные эксперименты по получению трансгенных мышей с новыми генетическими признаками способствовали проведению подобных работ и с другими видами млекопитающих- кроликами, овцами, свиньями, крупным ро-

гатым скотом. Технология получения трансгенных сельскохозяйственных животных имеет свои особенности. Это связано с тем, что у крупных сельскохозяйственных животных зиготы содержат значительные количества жировых и пигментных включений, что существенно затрудняет визуализацию пронуклеусов. Для лучшей визуализации требуются дополнительные микроманипуляции: центрифугирование, флуоресцентная микроскопия, что снижает жизнеспособность зигот и выход полноценных потомков.

Считается, что в настоящее время имеют практическое значение три направления геноинженерной работы с животными. Первое — продовольственное. Например, трансгенные свиньи растут гораздо быстрее «традиционных». Кроме того, такие свиньи «откладывают» значительно меньше жира, то есть их мясо полезнее для здоровья. Результат получен всего за несколько лет — в геном животных внедрен один ген. Традиционной селекции на это понадобились бы десятилетия.

Второе направление — животные, генетически устойчивые к болезням. В цену животноводческой продукции, среди прочего, заложены немалые расходы на вакцинацию. Но такие расходы неизбежны, так как, например, лейкозом крупного рогатого скота в России заражено 25% поголовья. В России уже получены животные с геном, который препятствует развитию лейкоза.

Третье, пожалуй, самое важное направление — животные, продуцирующие лекарства. Например, препараты с гормоном роста для детей, которые из-за нарушений в эндокринной системе рискуют остаться карликами на всю жизнь. Сегодня производить их сложно и дорого. Препараты, полученные их молока трансгенных коров несравнимо дешевле. Следует отметить, что для того чтобы получать лекарственные вещества, не обязательно генетически изменять все животное. Можно модифицировать отдельные органы, в данном случае, лишь молочные железы. Цены на современные лекарства постоянно растут, что сужает круг больных способных лечиться ими. С помощью трансгенных животных многие из этих препаратов могут стать более доступными. При введении сельскохозяйственным животным генов пептидов и белков можно получить их в больших масштабах. Такие гены получили название *Gene farming*. Теоретически возможно промотор коровьего или овечьего белка соединить со структурной частью желаемого гена, например гена инсулина, интерферона, фактора свертываемости и гормонов. Такие гены, как показали эксперименты, экспрессируются в молочной железе и выделяются с молоком. Например, трансгенных сельскохозяйственных животных используют для продуцирования человеческого инсулина. Экспериментально было доказано, что ген инсулина человека, введенный в геном мыши, функционирует в мышечных клетках поджелудочной железы. Другими словами, ген инсулина человека проявляет себя в организме мыши, как его собственный.

Другим, весьма перспективным направлением современной биологии является исследование стволовых клеток. Стволовые клетки — это клетки, сохраняющие потенциал к развитию в разных направлениях. Из них могут возникнуть и кожная, и нервная клетки, и клетки крови. Считалось, что во взрослом

организме стволовые клетки отсутствуют, что их существование ограничивается самым ранним периодом эмбрионального развития. Однако в конце 60-х годов А.Я. Фриденштейн с соавторами обнаружили эти клетки в мезенхиме (строме) взрослого костного мозга. По принадлежности к строме их в дальнейшем стали называть стромальными стволовыми клетками. В 70-е годы были опубликованы работы, демонстрировавшие наличие стволовых клеток практически во всех органах взрослых животных и человека. В связи с этим принято разделять стволовые клетки на эмбриональные стволовые клетки - ЭСК (их выделяют из эмбрионов на стадии бластоцисты) и региональные стволовые клетки - РСК (их выделяют из органов взрослых особей или из органов эмбрионов более поздних стадий). Будучи мультипотентными, стволовые клетки составляют регенерационный резерв организм.

Особое удивление вызывает наличие стволовых клеток в центральной нервной системе. Они отвечают на различные поражения нервной ткани размножением (сами нервные клетки, как известно, утрачивают способность к размножению уже на стадии нейробласта) и дифференцировкой в нервные и глиальные клетки. Полагают, что изолированные нейральные РСК способны превращаться и в другие производные.

Способность стволовых клеток (как РСК, так и ЭСК) трансформироваться в разных направлениях делает их весьма удобной модельной системой для изучения молекулярно-генетических процессов, обуславливающих дифференцировку клеток в разных направлениях. Действительно, стволовые клетки можно изолировать, так сказать, в чистом виде и затем анализировать функции генных сетей на последовательных этапах их дифференциального развития. Оказалось, в частности, что время последовательного включения генов, контролирующих развитие, совпадает в постимплантационных зародышах и в культуре эмбрионидных тел, образованных ЭСК. Анализ культур стволовых клеток с помощью молекулярно-генетического микроэлектронного метода продемонстрировал, что в одном клоне мезенхимных стволовых клеток синтезируется по крайней мере 1200 матричных РНК. В разных стволовых клетках присутствует похожий набор предсинтезированных матричных РНК- копий многих генов. По мере дифференцировки стволовых клеток наблюдаются изменения спектра экспрессирующихся генов. При этом удалось выяснить, что, как и случае дифференцировки в составе целостного эмбриона, в мезенхимных стволовых клетках взрослой гематогенной ткани содержится практически весь набор матричных РНК, которые функционируют в зародышевых листках и на стадии органогенеза. Идентифицированы также матричные РНК ключевых генов, регулирующих созревание клеток мезенхимального и мезодермального происхождения, а также энто- и эктодермы. Большинство матричных РНК НОХ-генов присутствует уже в яйцеклетке и презумптивных зародышевых клетках. Следовательно, в стволовых клетках проявляется общий принцип онтогенеза - функция генов с опережением, т.е. синтез тех матричных РНК, которые будут нужны на более поздних стадиях развития.

Исследовательский бум вокруг стволовых клеток ослабил внимание к так называемым "камбиальным клеткам". На Западе их теперь называют *transit amplifying cells*, т.е. рассматривают как некую преходящую фазу развития, а не как самостоятельную популяцию клеток как это было принято раньше. Иногда о них вообще забывают. А между тем, обычно восстановительные процессы в тканях протекают при их непосредственном участии - наглядный тому пример клетки росткового слоя кожи, пополняющие постоянно расходуемый запас зрелых клеток кожного покрова. Более того, до открытия стволовых клеток речь шла только о таком способе репарации. В нервной ткани камбиальных нервных клеток, сохранивших способность к размножению, нет (о глии речь не идет), но там сохраняется резерв нейробластов, посредством своей дифференцировки способных восполнить возникающие при различных формах патологии дефекты, сохраняя тем самым функциональную дееспособность соответствующего отдела мозга или периферической нервной системы. В этом случае встает чрезвычайно важный вопрос о взаимоотношении стволовых и камбиальных клеток. Возможны ли их взаимопревращения? Может ли региональная стволовая или прогениторная клетка дать начало камбиальной и, наоборот, имеет ли место этот процесс в целостном организме, каково его значение для нормального течения восстановительных процессов и каков (если он существует) его молекулярно-генетический механизм. Решение этой проблемы имеет важное не только фундаментальное, но и практическое значение. Исследование стволовых клеток в разных экспериментальных условиях, бесспорно, поможет этому решению и позволит представить в новом свете тонкие механизмы восстановительных процессов, протекающих в организме. Работы подобного рода уже начаты, в частности, на примере стволовых клеток эпителиального покрова кожи. Результаты, свидетельствующие, по крайней мере, о "порождении" камбиальных клеток стволовыми впечатляющи, но нередко противоречивы и дают повод для дискуссий. Стволовые клетки, которые порою находят в шиповатом слое эпидермиса кожи, как раз и могут быть мигрантами из эпидермального очага стволовых клеток. Важную роль в подобных случаях играет микроокружение клеток, которое оказывает существенное влияние на направление процесса детерминации и дифференцировки. Иными словами, ситуация с превращениями стволовых клеток и их взаимоотношениями с камбиальными клетками далеко не так проста, как это может показаться на первый взгляд.

Плюри- и мультипотентность стволовых клеток делает их идеальным материалом для использования в трансплантационных методах клеточной и генной терапии. При этом следует учитывать то, что наряду с «местными» стволовыми клетками, которые при повреждении тканей соответствующего органа мигрируют к зоне повреждения, делятся и дифференцируются, образуя в этом месте новую ткань, существуют и «центральные» стволовые клетки, локализованные в строге костного мозга. Эти клетки универсальны, они, по-видимому (полученные многочисленные данные такого рода все же требуют дополнительной проверки), способны поступать с кровотоком в поврежденный орган или ткань, и на месте под влиянием различных сигнальных веществ дают нача-

ло нужным специализированным клеткам, которые замещают погибшие. В частности, установлено, что введение стромальных клеток костного мозга в зону повреждения сердечной мышцы (зону инфаркта) устраняет явления постинфарктной сердечной недостаточности у экспериментальных животных. Так, стромальные клетки, введенные свиньям с экспериментальным инфарктом, уже через восемь недель полностью перерождаются в клетки сердечной мышцы, восстанавливая ее функциональные свойства. Результаты такого лечения инфаркта впечатляющи. По данным Американского кардиологического общества за 2000 год у крыс с искусственно вызванным инфарктом 90% стромальных клеток костного мозга, введенных в область сердца, трансформируется в клетки сердечной мышцы.

Большое значение придают стволовым клеткам (и, в частности, стромальным) при лечении различных нейродегенеративных и неврологических заболеваний паркинсонизма, болезни Альцгеймера (старческое слабоумие), хореи Гентингтона, мозжечковых атаксий, рассеянного склероза и др. Группа неврологов из Американского национального института неврологических заболеваний и Стэнфордского университета обнаружили, что стромальные клетки костного мозга могут дифференцироваться в нейральном направлении. Следовательно, костный мозг человека может быть использован в качестве источника стволовых клеток для восстановления поврежденных тканей в головном мозгу. Возможна также трансформация этих клеток в печеночные, почечные клетки, а также в клетки, синтезирующие инсулин, что может быть использовано для лечения диабета. Следовательно, пациент может стать собственным донором, что предотвратит реакцию иммунологической несовместимости тканей. Международная группа ученых под руководством Евы Мизей (2005г.) полагает, что стволовые клетки, куда бы они ни имплантировались, могут достигать поврежденного места, в частности, мозга и обеспечивать там восстановительные процессы. Так, после внутривенного введения взрослым мышам стромальных стволовых клеток, различные нейральные производные были ими обнаружены во многих областях мозга, включая неокортекс, гиппокамп, таламус, ствол мозга и мозжечок. Предпринимаются успешные попытки разработать методы клинического использования стволовых клеток пуповины и плаценты, отбрасываемых при родах.

Открытие стволовых клеток во взрослом организме изменило наши представления об организации тканей и о механизмах восстановительных процессов, в них протекающих. Был сделан новый и очень важный вывод о том, что эмбриональные клетки с высоким потенциалом к развитию сохраняются и во взрослом организме. Более того, они составляют важнейшее звено в цепи репаративных процессов, о чем ранее не подозревали. В ходе клеточного деления стволовых и камбиальных клеток возникают материнская и дочерняя клетки. Материнские клетки используются для самоподдержания популяции, а дочерние в случае стволовых выходят либо в стволовую клетку, либо непосредственно в дифференцировку, а в случае камбиальных - непосредственно в дифференцировку. На стадии камбиальной клетки сохраняются свойства ранних эмбрио-

нальных клеток развиваться в разных направлениях, на стадии камбиальной клетки эта способность утрачивается, они производят лишь региональные структуры.

Помимо вышеописанных направлений, продолжаются многочисленные исследования в области биологии размножения, а также работы, конечной целью которых является ранняя диагностика нарушений эмбриогенеза и разработка методов их коррекции. Традиционно большой удельный вес составляют научные проекты, посвященные изучению механизмов старения с целью замедлить процессы старения.

Вопросы для самоконтроля:

1. Клонирование, теоретическое и практическое значение.
2. Работы Г.Лопашова, Бриггса, Кинга и Д.Гердона по клонированию амфибий.
3. Почему в процессе дифференцировки клетки теряют тотипотентность?
4. Первые работы по клонированию млекопитающих Мак Грата, Солтера, Манна, Ловел-Баджа, Сурани.
5. Исследования по клонированию млекопитающих Уилдсина, Смита, Уилмута, Янагимачи.
6. Современные методы получения трансгенных животных.
7. Плюсы и минусы направления по получению трансгенных животных.
8. Основные направления практического использования генетической инженерии в животноводстве.
9. Понятие о стволовых и камбиальных клетках.
10. Перспективы работ со стволовыми клетками.

Рекомендуемая литература

1. Астауров Б.Л. Партеногенез, андрогенез и полиплоидия. Изд-во «Наука» М., 1977.
2. Белоусов Л.В. Основы общей эмбриологии. Изд-во «Наука», изд-во МГУ., М., 367с.
3. Бредли М. Пэттен ., Эмбриология человека., Изд- во: М.: Медгиз., 1959., 768с.

- 4.Бочаров Ю.С. Эволюционная эмбриология позвоночных. Изд-во МГУ, М., 1988.,286с.
- 5.Газарян К.Г., Белоусов Л.В. Биология индивидуального развития животных. Из-во «Высшая школа» М., 1983.
- 6.Гилберт С. Биология развития (в 3-х томах) Изд-во «Мир» М., 1993-1995.
- 7.Голиченков В.А. Биология развития. Изд-во МГУ, 1991
- 8.Голиченков В.А. и др. Эмбриология : Учебник – М., 2004 – 224 с.
- 9.Корочкин Л.И. Биология индивидуального развития (генетический аспект). 2002. Твердый переплет. 264 с.
10. Токин Б.П. Общая эмбриология. Изд-во «Высшая школа» М., 1987.,487с.
- 11.Данилов Р.К., Боровая Т.Г., Общая и медицинская эмбриология, изд-во: Специальная Литература.,231с.

УКАЗАТЕЛЬ УПОМИНАЕМЫХ ГЕНОВ И БЕЛКОВ

Название гена или белка	Страница учебника
Активин	180
актин	170, 181,189, 204
Актинин	189
АМГ (антимюллеров ский гормон)	255 - 258

антионкоген	168
аутокринный фактор	182
гемоглобин	204
гликогенсинтаза	187
гистон	204
динеин	169, 170
ДНК-полимераза	197, 198
Интегрин	172, 189
Интерлейкины	180
Казеин	181, 186
β -казеин	189
Каспаза 3	178
Каспаза 8	178, 189
Каспаза 9	178, 189
β -катенин	187, 219, 220, 239
кератин	204
5 α -кетостероидредуктаза ²	257
коллаген	169, 172, 189
Коннексин	189, 190
Ламин	204
Ламинин	189
Микрофальмии ген	184, 185, 186
миозин	170, 204
молекулы клеточной адгезии	173
нейротрофин	262
Паракринный индуктор или фактор	165
Пролактин	258
Проонкоген	168
Протеаза	178
ПФ (паракринный фактор)	165
Рецептор (молекула)	165
β -рецептор адреналина	181
Рецептор ретиноевой кислоты	183
Рецептор тироксина	230
Рецепторная тирозинкиназа (РТК)	184, 189
Рецепторы ретиноевой кислоты	183
Рецепторы стероидных гормонов	183
РНК-полимераза	198
РТК	184-186
Талин	189
Тирозиназа	186, 189
Транскрипционный фактор (ТФ)	165
Тубулин	170
Фактор стволовых клеток (SCF)	180, 184, 185, 189, 252
Фактор роста гепатоцитов	180
Ферменты цикла Кребса	181, 204
фибрин	172
Фибронектины	170, 172, 189, 233, 250, 262
Циклин	167
Цинковые пальцы	183
Щелочная фосфатаза (маркер первичных половых клеток)	251

Эпидермальный фактор роста	180
Эритропоэтин	180
Ядерные рецепторы гормонов	183
AP1	183
Apaf1	189
APC	187
Bcl2	189
bHLH	183
Bik	189
BMP	180, 234 – 236, 245 – 248, 262
BMP2	234, 245, 246
BMP4	188, 219, 233, 245, 246, 249
BMP7	246
bp	249
bZip	183
C	186
β -cadherin	262
CAM (cell adhesion molecule s)	173-176
cell adhesion molecules (CAM)	173-176
CBP	188
cdc2	167
Ced-3	189
Ced-4	189
Ced-9	189
C/EBP	183
Cerberus	234 - 236
Chordin	234, 236
Ci	187, 188
C-kit (рецептор SCF)	252
Cos2	187, 188
Csl	189
DAX1	256- 258
Delta-like 3	261
Desert hedgehog	179
dHand	245, 247
dhh (desert hedgehog)	179
Dickkopf	234 - 236
Dsh (Disheveled)	187, 218
eFGF	220
Egl-1	189, 218, 219
Eph	262
Ephrin	262
ERK	184, 185
FGF	179, 183, 186, 229, 242, 247, 248
FGF2	179, 252
FGF4	179
FGF5	262
FGF7	179
FGF8	179, 230, 239 – 242, 244, 247, 249, 261
FGF9	254, 255, 258
FGF10	179, 228, 239, 240

FGFR	179
FGFR3	186
Follistatin	234, 236
Forkhead	183
Frzb	234 - 236
Frizzled	187, 234
Fused	187, 188
GAP	184
GATA1	236
GDF5	246
GDNF	180
Gli3	188, 246
GNRP	185
Goosecoid	218, 220
Gremlin	246
GSK-3	187, 219
Hairy 1	261, 262
Hedgehog	179, 187, 188
Hox	183, 239
Hoxa-1	183
Hoxa-11	183, 247
Hoxa-12	183, 243, 247
Hoxa-13	183, 243, 247
Hoxb-8	183, 245
Hoxc-6	183, 239
Hoxd-9	183, 243, 247
Hoxd-10	183 243 247
Hoxd-11	183, 243, 244, 247
Hoxd-12	183, 243, 247
Hoxd-13	183, 243, 244, 247
ihh (indian hedgehog)	179
Indian hedgehog	179, 186
JAK	186, 188
JAK-STAT	186, 189
Kit	184 - 186
LEF	187
LEF1	236
LIF (ингибирующий лейкемию фактор)	252
Lim	183
Lim-1	183
L-Maf	250
Lmx1	247
Lunatic fringe	261
MEK	184, 185
Mitf	183 – 186, 189
MPF	167
Msx1	236
Myf5	262
MyoD	182, 183, 262
NeuroD	235
Neurogenin	235

Nodal (-related)	180, 219, 220, 234-236
Noggin	234 – 236, 245 - 248
Notch	189, 245, 261
NT-3	262
Oct4	183, 252
p21	186, 189
P300/CBP	184, 185
Paraxis	262
Patched	187
Pax	183, 188
Pax-1	183, 262
Pax 6	183, 249, 250
Pit1	183
PKA	188
POU	183
Rac1	262
Raf	184, 185
Ras	184, 185
Rho ГТФаза	187
Rx1	249
SCF (Stem cell factor)	252
SF1 (Стероидогенный фактор1)	255, 258
Shh (Sonic hedgehog)	179, 180, 183, 244, 246 -249, 262
Siamois	219, 220
Six	249
Slimb	188
Smad	186
Smad1	187, 235, 236
Smad2	187
Smad3	187
Smad4	236, 187
Smad5	187
Smad7	235, 236
Smoothened	187, 188
Sonic hedgehog	188
SOS	184, 185
Sox	183
Sox 2	183, 249
Sox 3	249
Sox 9	254 - 256, 258
SoxD	183, 235
SRY (Sex determining region of Y-chromosome)	183, 253, 254, 255, 256, 258
STAT	186, 189
Steel	184, 186
Stem cell factor	252
Taf ₁₁ 105	256, 258
Tbx4	229, 239, 248
Tbx5	229, 239, 248
Tcf-3	187, 220
Tgf- β	180, 186, 219
Unc-86	183

VegT	219
Vent	236
Vg1	180, 219, 220
Vox	234
White	186
Wnt	180, 187, 234
Wnt 1	180
Wnt2b	240
Wnt 3a (β -катенин)	239, 240
Wnt4	180, 254 - 256, 258
Wnt7	180
Wnt7a	247, 248
WT1	183
Xbra	220
Xcat2	250
Xmsx1	234
Xnr-3	233
Xom	234
Xpou2	235
Xvent1	234
Xwnt8	219, 234, 235

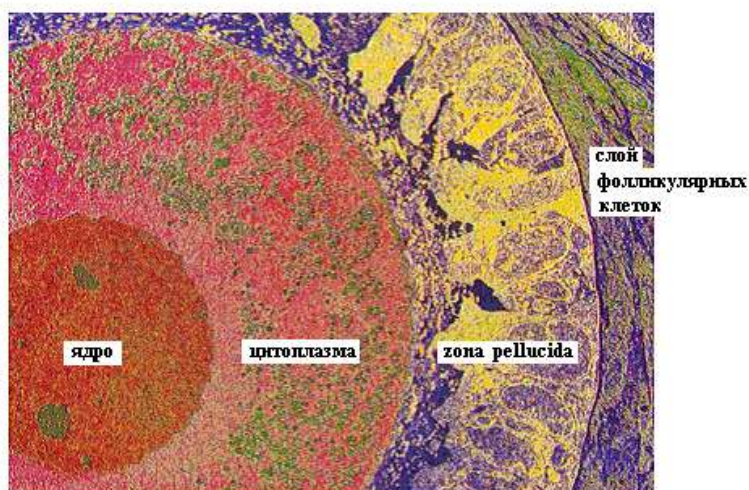


Рис. 88. Примордиальный женский овоцит перед созреванием.