



БИОЛОГИЧЕСКИЙ  
ФАКУЛЬТЕТ  
МГУ ИМЕНИ  
М.В. ЛОМОНОСОВА



*teach-in*  
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

# ЭМБРИОЛОГИЯ

ГОЛИЧЕНКОВ  
ВЛАДИМИР АЛЕКСАНДРОВИЧ

БИОФАК МГУ

КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН  
СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ  
ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ  
СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ.  
СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ  
НА [VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ  
ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ,  
ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ,  
НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ  
[VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).



БЛАГОДАРИМ ЗА ПОДГОТОВКУ КОНСПЕКТА  
СТУДЕНТКУ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА МГУ  
**АЛЕШИНУ НИНУ МАКСИМОВНУ**



## Оглавление

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Лекция 1. Введение.....</b>                                | <b>6</b>  |
| История изучения биологии развития .....                      | 6         |
| Понятие онтогенеза .....                                      | 7         |
| Возникновение онтогенеза .....                                | 9         |
| Опыты Шпемана на дробящихся эмбрионах тритонов .....          | 11        |
| Клонирование.....   | 12        |
| Пересадка ядер.....   | 12        |
| Создание химерных животных .....                              | 13        |
| Экстракорпоральное оплодотворение .....                       | 14        |
| <b>Лекция 2. Оогенез.....</b>                                 | <b>15</b> |
| Яйцеклетка в онтогенезе. Характеристика яйцеклетки.....       | 15        |
| Происхождение яйцеклетки .....                                | 16        |
| Происхождение первичных половых клеток.....                   | 17        |
| Бипотенциальная гонада .....                                  | 19        |
| Этапы оогенеза.....   | 21        |
| Классификации яйцеклеток.....                                 | 22        |
| Строение фолликула яичника млекопитающих .....                | 24        |
| Блок мейоза у разных животных.....                            | 25        |
| <b>Лекция 3. Сперматогенез.....</b>                           | <b>27</b> |
| Преформизм и эпигенез .....                                   | 27        |
| Характеристика сперматозоида .....                            | 28        |
| Формирование мужских гонад. Строение семенного канальца ..... | 28        |
| Этапы сперматогенеза.....                                     | 30        |
| Типы семенников.....  | 32        |
| <b>Лекция 4. Оплодотворение.....</b>                          | <b>34</b> |
| Функции оплодотворения.....                                   | 34        |
| Этапы оплодотворения .....                                    | 34        |
| Активация яйцеклетки .....                                    | 36        |

|  |           |
|--|-----------|
| Слияние гамет .....  | 38        |
| Оболочки яйцеклетки при оплодотворении .....                   | 39        |
| <b>Лекция 5. Дробление .....</b>                               | <b>42</b> |
| Дробление как последовательность митозов. Клеточный цикл ..... | 42        |
| Особенности делений дробления. Правила Гертвига-Сакса .....    | 43        |
| Типы дробления .....   | 45        |
| Дробление млекопитающих .....                                  | 46        |
| <b>Лекция 6. Гастрюляция .....</b>                             | <b>48</b> |
| Происхождение гастрюляции .....                                | 48        |
| Типы гастрюляции .....   | 48        |
| Способы закладки мезодермы .....                               | 50        |
| Карта презумптивных зачатков амфибий .....                     | 50        |
| <b>Лекция 7. Нейруляция .....</b>                              | <b>52</b> |
| Понятие нейруляции. Нейруляция курицы .....                    | 52        |
| Нейруляция лягушки .....                                       | 53        |
| Сегментация мезодермы .....                                    | 54        |
| Гены сегментации .....   | 55        |
| <b>Лекция 8. Эмбриональная индукция .....</b>                  | <b>57</b> |
| Исследование эмбриональной индукции. Образование глаза .....   | 57        |
| Опыты Шпемана по изучению эмбриональной индукции .....         | 57        |
| Первичный организатор, организатор Ньюкупа .....               | 59        |
| Механизм эмбриональной индукции .....                          | 60        |
| Поворот оплодотворения. Образование серого серпа .....         | 60        |
| Роль материнских белков в индукционных процессах .....         | 61        |
| <b>Лекция 9. Органогенез .....</b>                             | <b>64</b> |
| Ранний органогенез .....                                       | 64        |
| Оси эмбриональной конечности .....                             | 65        |
| Индукция при образовании конечности .....                      | 66        |
| Этапы развития конечности .....                                | 67        |

---

|   |           |
|---|-----------|
| Формирование пальцев .....                                | 68        |
| Участие генов сегментации в формировании конечности ..... | 69        |
| <b>Лекция 10. Регенерация.....</b>                        | <b>71</b> |
| Классификация регенеративных процессов.....               | 71        |
| Эпиморфоз и морфаллаксис .....                            | 73        |
| Этапы эпиморфогенетической регенерации .....              | 74        |

# Лекция 1. Введение

## История изучения биологии развития

Первые данные об изучении развития появляются около VI в. до н.э. вместе с появлением теоретико-философских основ естественных наук. Так, древнегреческий философ **Аристотель** наблюдал за развитием внутри куриного яйца. Каждый день после вылупления он вскрывал яйцо и описывал происходящие в нем изменения. Он первым увидел возникновение сердца и его биение. Аристотель отметил, что получившийся организм (цыпленок) совсем не похож на то, что было изначально (желток куриного яйца). Такое явление он назвал *эпигенезом*, что означает «после рождения», то есть развитие – возникновение принципиально новых структур, постепенное усложнение.

Знаменитый древнегреческий ученый и философ **Гиппократ** разделял принципиально другую точку зрения, предполагая, что развитие предопределено и будущее строение заложено внутри зародыша. Такой подход к изучению биологии развития получил название «*преформизм*».

Оба эти вида на биологию развития существовали до середины прошлого века. Последователей противоположных учений примирил между собой наш соотечественник **Карл Эрнст фон Бэр**. Он первым показал, что развитие всех организмов начинается с яйцеклетки. Бэр утверждал, что в развитии присутствуют как элементы преформизма, так и эпигенеза. Именно с его именем связывают основание эмбриологии как науки.

Начатое еще в античной Греции, изучение развития заинтересовало аристократов XVIII века. Они очень увлеклись экспериментами по восстановлению утраченных органов на гидрах и амфибиях. Если разделить гидру пополам, она восстановит обе половины с полным возвращением всех функций. Экспериментаторы могли разделить головной конец на несколько частей и из каждого возникала полноценная «голова». Так это животное получило свое название в честь Лернейской гидры.

Восстановление органов очень напоминало нормальное развитие, только повторенное заново. Эти исследования легли в основу науки *регенерации* («образование заново»). Позже в XVIII веке возникло понимание того, что развитием в оболочках и после вылупления (или рождения) управляется одними и теми же механизмами. Ученые описывали развитие разных групп животных, подмечая сходства и различия.

Впоследствии из описательного и сравнительного подходов в начале XX века возник новый подход к изучению эмбриологии – экспериментальный. С развитием микроскопов появились микрохирургические инструменты, в это время в эмбриологии успешнее всего были немецкие ученые – **Вильгельм Ру** и **Ханс Шпеман**. Вопросы, стоявшие перед ними, были: «Почему развитие идет таким образом? Какие причины ведут к определенному типу развития?». Данный подход был назван *казуально-*

*аналитическим*. С другой стороны, в сравнительной эмбриологии в то время отличались отечественные ученые – **Александр Онуфриевич Ковалевский** и **Илья Ильич Мечников**. Так, школа сравнительной эмбриологии была более развита в России, а экспериментальной – в Германии.

## Понятие онтогенеза

В середине и конце XX века к методическим базам биологии подключились новые знания о химии, физике, биофизике, молекулярной биологии, генетике и молекулярной генетике. Сочетание этих научных сфер позволили рассмотреть развитие на всех последовательных этапах. Так возникла наука *биология развития* в современном понимании, а ее основным предметом стал *онтогенез*, что означает период от рождения до смерти. Биология развития и эмбриология по сути – одно и то же, однако эмбриология – более медицинский термин, а биология развития – более обобщающий.

Если взглянуть на генеалогическое древо не горизонтально (эволюционная иерархия от первичноротых к вторичноротым, от менее прогрессивных групп животных к более прогрессивным), а вертикально, чтобы все вершины каждой группы оказались на одном уровне на концах ветвей (слон и муха), то это будет отражением онтогенеза. Эмбриологи выделяют общие признаки в онтогенезе разных животных.

Онтогенез захватывает все существование формы от начала до предельного конца (естественная гибель). Удобно рассматривать онтогенез какого-либо вида животных в форме цикла, однако для отдельной особи это не так. Сам по себе онтогенез – нециклический однонаправленный процесс. Понятие онтогенеза характерно многоклеточных организмов. Как правило, он начинается с одной клетки, при половом размножении это оплодотворенная яйцеклетка. Зигота обладает *тотипотентностью*, что означает, что впоследствии из нее может развиваться любая клетка организма.

### В создании нового организма участвуют следующие процессы:

- *Пролиферация* – процесс последовательного деления клеток.
  - *Миграция* – перемещение клеток зародыша относительно друг друга.
  - *Дифференцировка* – появление у клеток признаков специализированных тканей.
- До дифференцировки клетки имеют т.н. «эмбриональный вид» (неспецифические, более округлые), а период до начала дифференцировки иногда называют *цитотипическим*.

Когда появилась многоклеточность, у клеток возникла специализация, а в процессе раннего развития – разделение клеток на образующие эмбриональные оболочки и сам зародыш. При этом клетки, формирующие зародыш, постепенно теряют потенцию к образованию различных типов тканей (т.н. *потентность*).

### Клетки по потентности разделяются на:

- *Тотипотентные* – из одной клетки может возникнуть целый организм (зигота, стадии до 8 бластомеров)
- *Плюрипотентные* – из таких клеток могут формироваться все типы клеток зародыша, но не внезародышевые оболочки (например, внутренняя клеточная масса у млекопитающих)
- *Мультипотентность* – клетки способны дифференцироваться в специализированные клетки одного типа ткани (стволовые клетки взрослого организма)
- *Унипотентные* – такие клетки могут давать начало только одному клеточному типу (клетки органов и тканей взрослых организмов)

На Рис. 1 представлен жизненный цикл (онтогенез) лягушки. Как было сказано ранее, он начинается с одной клетки – зиготы. В образовании зиготы участвуют гаплоидные клетки мужского и женского ряда – *гаметы*. Процесс формирования гамет, *гаметогенез*, или предзародышевый период, как правило происходит в организмах разного пола, за исключением гермафродитов. Этот процесс связан с уменьшением количества хромосом вдвое – *мейозом*, в результате происходит образование гаплоидных клеток. Половые клетки могут быть неотличимыми, такое явление носит название *изогамия*, а могут различаться по форме и функциям, что называется *гетерогамия*. Ооцит в случае гетерогамии несет генетическую информацию не только в ядре, но и в некоторых органеллах (например, митохондриях), а также выполняет функцию запасания питательных веществ (желтка) и питания зародыша на ранних эмбриологических этапах.

Далее следует процесс слияния гамет или *оплодотворение* с образованием диплоидной зиготы. После этого запускается процесс пролиферации, начинающийся с *дробления* зиготы. При дроблении размер эмбриона не меняется, происходит только уменьшение размера делящихся клеток. После дробления на этапе *гастрюляции* при образовании трех зародышевых листков участвует процесс клеточной миграции. Далее следует *нейруляция*, в которой у организма формируются оси, первичные комплексы будущих органов, формируется нервная трубка.

Следующим этапом является *органогенез*, в котором из крупных закладок начинают формироваться конкретные органы. После выхода особи из оболочек (вылупление, рождение) может происходить *метаморфоз*, который необязательно приводит к усложнению строения (личинки хордовых животных асцидий обладают более сложным строением, нежели взрослые особи). Зрелая особь продуцирует гаметы, что и возвращает к началу жизненного цикла.



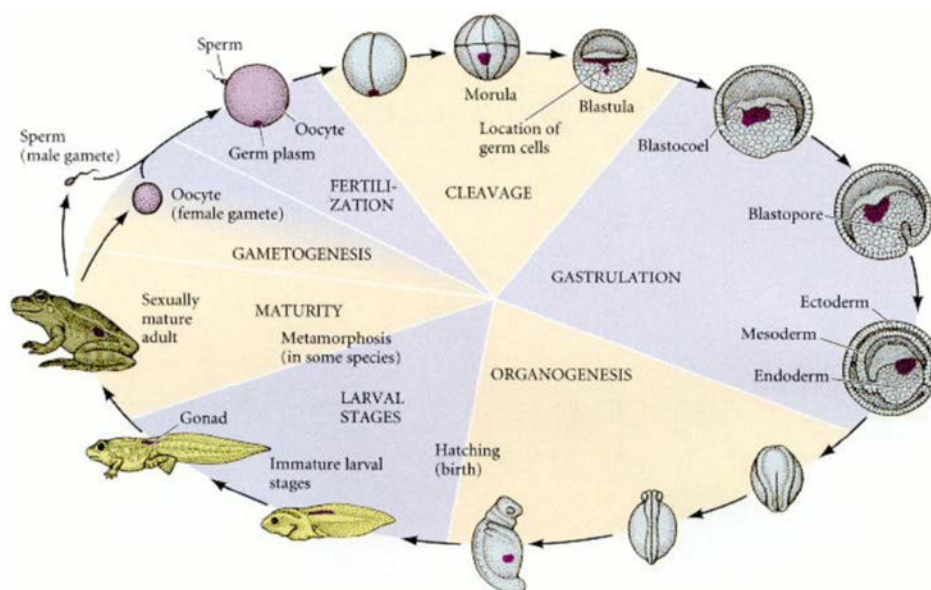


Рисунок 1. Онтогенез лягушки.

## Возникновение онтогенеза

При сравнении животных (слона и мухи) видны огромные различия в их онтогенезе. Их вес, время от оплодотворения до рождения, от вылупления (рождения) до смерти – эти числовые данные не подлежат сравнению. Таким образом, необходима такая величина, которая поможет получить достоверную характеристику онтогенеза разных животных. Ею стало *биологическое время*, предложенное российским эмбриологом **Татьяной Антоновной Детлаф**.

*Биологическое время* ( $\tau_0$ , «тао нулевое») – безразмерная характеристика онтогенеза, позволяющая сделать онтогенезы сильно различающихся организмов сравнимыми. Выражает время, за которое проходит деление дробления (как правило, синхронное). Величина  $\tau_0$  выражается в секундах.

Онтогенез характерен для многоклеточных организмов, поэтому вольвокс можно считать одним из первых организмов, у которого он возник (Рис.2). У вольвокса в самом начале онтогенеза присутствует этап деления, который впоследствии в эволюции станет процессом дробления. Так происходит, если при делении дочерние клетки не расходятся, образуя собственные оболочки. Если исходная клетка накопила избыток энергии, она может поделиться несколько раз подряд внутри материнской оболочки. При этом возникает многоклеточная особь. Такой процесс называется *палентомическая задержка*. В эволюционном ряде Вольвоксовых шло увеличение времени палентомической задержки вплоть до образования особи с несколькими тысячами клеток.

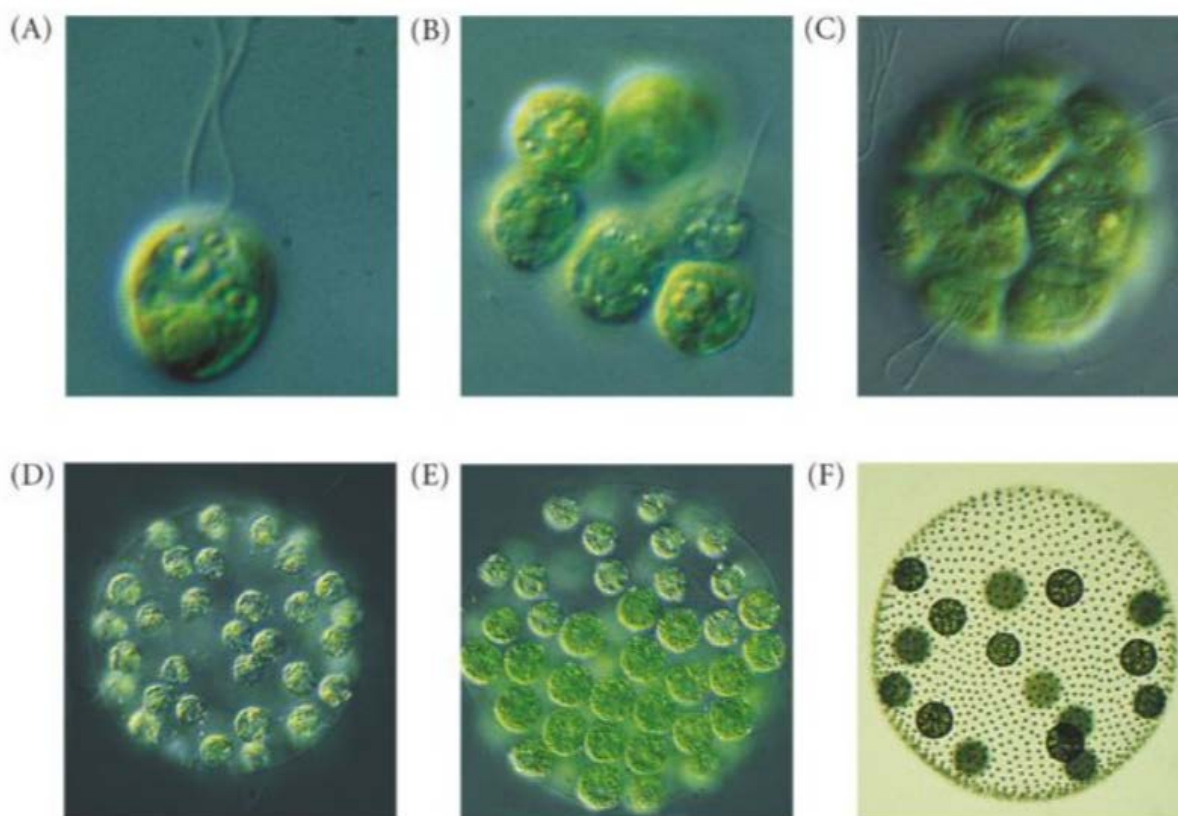


Рисунок 2. Представители порядка Volvocales. А - одноклеточный протист *Chlamydomonas reinhardtii*, В - *Gonium pectorale*, С - *Pandorina morum*, D - *Eudorina elegans*, E - *Pleodorina californica*, F - *Volvox carteri*.

В эволюции усложнение строения вольвокса происходит путем увеличения числа клеток внутри единой оболочки. Однако существует предел количества симметричных делений, после которого падает потенция материнской клетки. Такой предел составляет пять делений (организм, состоящий из 32 клеток), после чего возникает необходимость в необратимой дифференцировке и специализации потомков. Эта потребность в усложнении возникает и в более сложном организме – чем больше клеток образуют закладку органа, тем специфичнее дальнейшая дифференцировка. Например, один и тот же волосяной фолликул, дающий пуховой волос и иглу дикобраза, различаются в размерах.

#### Существует две стратегии развития:

1) *Регуляционное развитие* – характерно для вторичноротых (слон). Механизм сходен с описанной выше эволюцией вольвокса (увеличение количества клеток внутри одной оболочки приводит к необходимости в дифференцировке).

Эволюционно направлено на «максимализацию» и увеличение времени онтогенеза. Большой пострепродуктивный период, появляется старость.

2) *Целлюляризация* – характерно для первичноротых (муха). Механизм заключается в делении одинаковых ядер внутри зиготы без полноценных клеточных делений (Рис.3). В дальнейшем цитоплазму материнской яйцеклетки (*ооплазму*) делят между собой образующиеся клетки, при этом информация о дальнейшем направлении дифференцировки хранится уже в ооплазме. Эволюционно направлена на «миниатюризацию» и уменьшение времени онтогенеза. Пострепродуктивный период мал или может вообще отсутствовать.

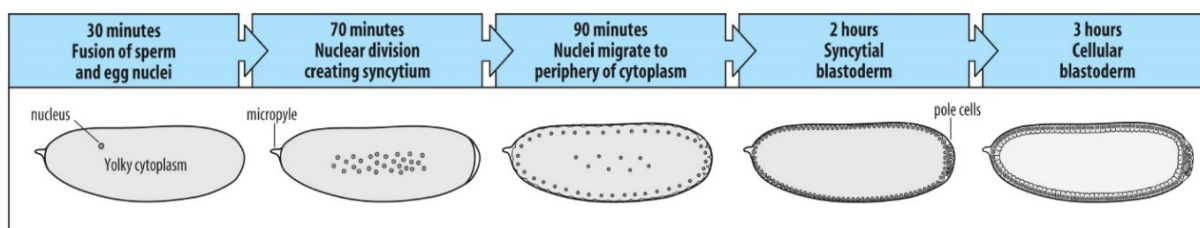


Рисунок 3. Процесс целлюляризации на примере развития яйца мухи.

### Опыты Шпемана на дробящихся эмбрионах тритонов

Немецкий ученый **Ханс Шпеман**, производил опыты по перевязке оплодотворенной яйцеклетки тритона лигатурой из волоса (Рис.4). Шпеман накладывал лигатуру на эмбрион на стадии восьми клеток так, чтобы один ооцит был отделен, но при этом сохранялась связь с остальным эмбрионом через цитоплазматический мостик (Рис.4А). Позже в область этого бластомера мигрировало одно из ядер, и ученый прекращал сообщение между частями эмбриона. Несмотря на то, что на тот момент эмбрион состоял уже из 16-32 клеток, отделенный бластомер давал полноценную особь. Так внутри общей оболочки образовывались две полноценные личинки (первые однойцевые близнецы *in vitro*). Из этого следует, что ядра бластомеров во время дробления имеют равную потентность и равнозначны ядру зиготы.

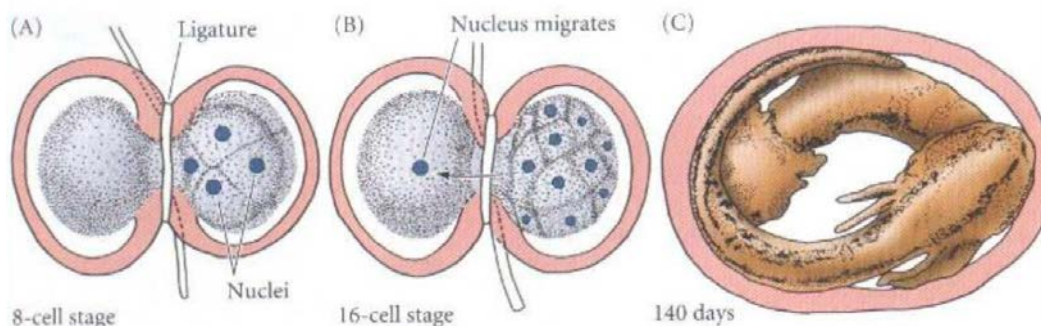


Рисунок 4. Опыты Шпемана, показывающие равнопотенциальность бластомеров на ранних этапах развития.

## Клонирование

Первые опыты по клонированию произвел английский исследователь **Джон Гёрдон**. Для своих экспериментов ученый брал клетки шпорцевых лягушек (*Xenopus laevis*) различной окраски, так он вносил ядро соматической клетки от лягушки-альбиноса в *энуклеированную* (у оплодотворенной яйцеклетки предварительно удалялось ядро) зиготу лягушки стандартной окраски (Рис.5). В результате из икры развивались только не имеющие пигмента белые особи, которые представляли собой *клонов* лягушки-донора ядра.

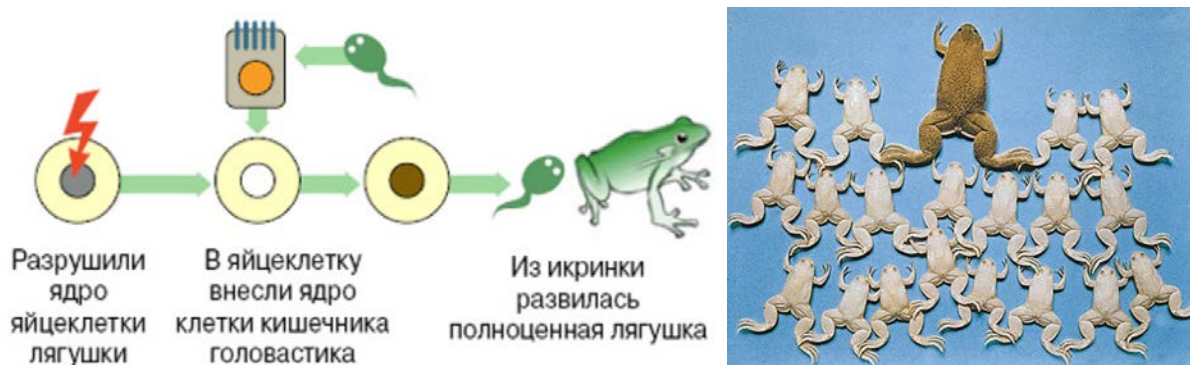


Рисунок 5. Опыты Гёрдона по клонированию лягушки.

*Репродуктивное клонирование* – цель такого клонирования – получение целой особи. В теории может использоваться для сохранения вымирающих видов и возрождения вымерших, также для размножения бесплодных животных (например, мул). Сюда относятся опыты с клонированием овцы Долли, другие эксперименты по клонированию сельскохозяйственных домашних животных, кошек и собак, мышей (мышь Кумулина), а также приматов.

*Терапевтическое клонирование* – развитие клонированного эмбриона останавливают на определенном этапе с целью получения стволовых клеток, чтобы в дальнейшем вызвать дифференцировку нужной культуры клеток или тканей. Применяется для 3D - биопринтинга органов (созданы многие органы, в т.ч. сердце), лечения некоторых заболеваний, в т.ч. неизлечимых.

## Пересадка ядер

Опытами по пересадке ядер на вьюнах (*Misgurnus fossilis*) занималась доцент **Людмила Алексеевна Слепцова** на кафедре эмбриологии МГУ. Брали *дискобластулу* вьюна (бластула, возникающая в результате дискоидального типа дробления, характерна, в частности, для рыб) отделяли *бластодиск* (эмбриональная часть дискобластулы) от желтка и разделяли на отдельные клетки, получали из них ядра и

пересаживали в энуклеированную яйцеклетку (Рис.6). Таким образом, получали клонов донорской особи вьюна.

Путем пересадки ядер в лаборатории также получали межвидовых гибридов: «вьюшка» (ядро клетки травяной лягушки (*Rana temporaria*) пересаживали в яйцеклетку вьюна), «вьюнио» (по аналогии – ядро рыбы другого вида (*Danio rerio*)), «вьюнопус» (ядро шпорцевой лягушки). Такие гибриды могли развиваться до определенных стадий, по всей видимости, это работа ранних генов развития, материнских генов. Эта теория подтверждается подобными опытами на млекопитающих. Гибридный эмбрион вьюна и человека, «вьюмен», достигал только двухклеточной стадии. На данный момент известно, что именно на этом этапе у млекопитающих происходит переход с материнской на зародышевую генетическую программу, т.н. *maternal to zygotic transition*, MZT.

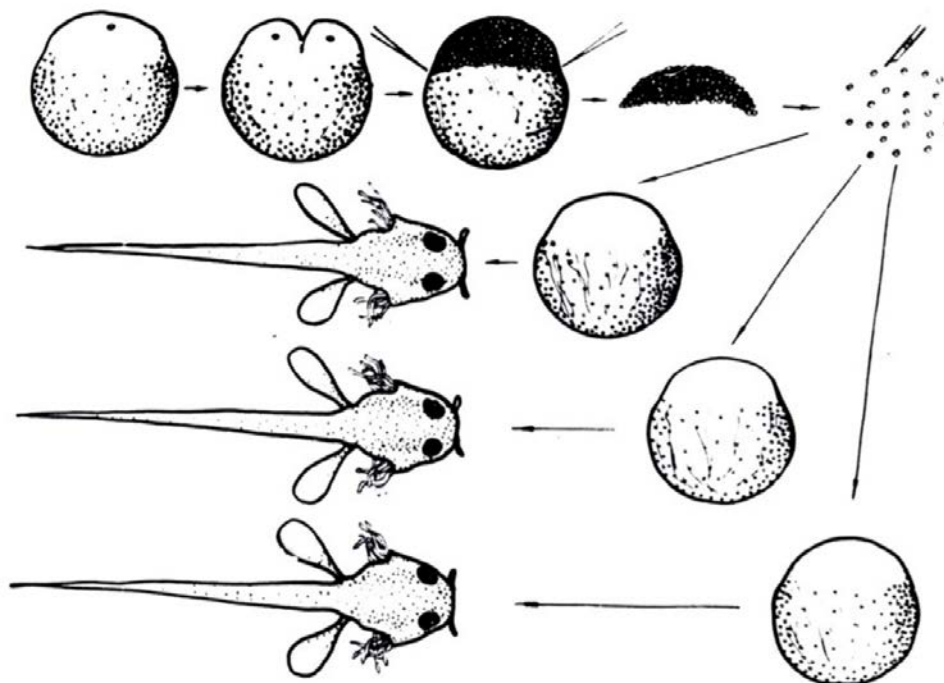


Рисунок 6. Опыты по пересадке ядер Л.А. Слепцовой.

### Создание химерных животных

При создании химерных животных сливают два и более эмбрионов животных одного или разных видов на ранних стадиях. Образуются мозаичные зародыши, а затем и взрослые организмы. Так были получены известные пятнистые мыши при слиянии эмбрионов черных и белых мышей, а также химерная овца-коза. Также метод используется для того, чтобы легко отследить судьбу отдельной клетки. Создание химерных животных, например, человек-обезьяна, могут помочь при трансплантологии.

## Экстракорпоральное оплодотворение

При проблемах с бесплодием прибегают к клинической эмбриологии. После прохождения курса гормональной терапии, у женщины получают незрелые ооциты путем пунктирования яичника. Далее клинический эмбриолог производит оплодотворение очищенной спермой *in vitro*. Полученная зигота доращивается в лабораторных условиях до начальных имплантационных стадий (бластоциста) и переносится в организм женщины. Далее развитие происходит в организме женщины, как в случае нормальной беременности. В клинической эмбриологии также используется метод инъекции сперматозоида в яйцеклетку (ИКСИ, от англ. ICSI — IntraCytoplasmic Sperm Injection) и переноса в организм женщины очищенной спермы во время овуляции (внутриматочная инсеминация, ВМИ).

## Лекция 2. Оогенез

### Яйцеклетка в онтогенезе. Характеристика яйцеклетки

Древние ученые, в т.ч. ученые античности, наблюдавшие развитие, пришли к выводу, что все живое, даже окружающий их мир, возникло из яйца. Отсюда появилось большое количество мифов и легенд о яйцах, из которых рождался мир (так называемое «мировое яйцо»), а также был заложен философский смысл изучения биологии развития: «Ex ovo omnia/Omne vivum ex ovo» - «Все из яйца/Все живое из яйца», автор –

**Уильям Гарвей**, английский ученый, один из основоположников эмбриологии и физиологии.

После открытия клеточного строения живых организмов ученые обнаружили, что яйцо на самом деле также представляет собой клетку, а все многоклеточное развивается из такой одной клетки. Тогда этот философский смысл принял иное, более современное значение: весь онтогенез из яйца; весь онтогенез, всё развитие будущего организма заложено в яйце.

Половой процесс – обмен участками гомологичных хромосом. Присутствует с начала клеточной формы жизни на Земле, есть даже у прокариот. Половой процесс увеличивает разнообразие за счет «перетасовки» имеющихся признаков в популяции, а происходящие случайно мутации вносят новые признаки. Половой процесс у многоклеточных организмов привязан к понятию мужских и женских половых клеток.

*Яйцеклетка* – женская половая клетка (*гамета*) многоклеточных организмов, высоко специализированная клетка, участвующая в развитии с половым процессом.

Для активации потенциала яйцеклетки и запуска процессов развития необходим некий триггер. В типовом случае этим инициатором развития является процесс оплодотворения с участием *сперматозоида*. Однако не всегда для активации яйцеклетки необходим сперматозоид, например в случае *партеногенеза* (развитие из неоплодотворенной яйцеклетки).

#### Характерные особенности зрелой яйцеклетки:

- 1) Тотипотентность, может развиваться в любую клетку взрослого организма.
- 2) Гаплоидность.
- 3) Запас материнской РНК и рибосомальный аппарат синтеза белка, «подсказки», необходимые в раннем развитии до включения зародышевого генома.
- 4) В яйцеклетке накапливаются питательные вещества для дальнейшего развития (в виде желтка), пока зародыш не способен питаться самостоятельно. Большая часть питательных веществ желтка представлена белками, специфичными для каждого вида животных. Яйцеклетки некоторых животных не имеют желтка, т.н. *алецитальные*

яйцеклетки, однако в таком случае питание происходит за счет организма матери (плацентарные млекопитающие) или хозяина (некоторые паразитические организмы).

5) Имеет защитные яйцевые оболочки. Их отсутствие характерно для животных с внутриутробным развитием, где защита осуществляется с помощью организма матери.

## Происхождение яйцеклетки

*Первичные половые клетки, ППК* – предшественники линии половых клеток.

В какой-то момент истории среди ученых возник спор при попытке ответа на вопрос: «В какой момент онтогенеза появляется яйцеклетка и откуда она берется?»

По логике биогенетического закона («онтогенез есть краткое повторение филогенеза») то, что возникло раньше всего в онтогенезе, то и в эволюции должно было возникнуть раньше. Яйцеклетка, с которой начинается онтогенез, сопоставима с клеткой, из которой возник первый многоклеточный организм. Первые многоклеточные организмы были колониальными, и самая древней дифференцировкой было возникновение линии специализированных бессмертных воспроизводящих клеток и смертных клеток *сомы*. Неизвестным оставалось то, как возможна клеточная специализация, если зигота дробится митотически, в результате чего все дочерние клетки имеют одинаковый геном. Немецкий ученый **Август Вейсман**, стал автором гипотезы о дифференцировке развивающегося организма путем неравнонаследственного деления (Рис.7). Он ввел понятие «*зародышевый путь*». Ученый считал, что по ходу дробления некоторые клетки теряют часть генетического материала, происходят неравнонаследственные деления. Те клетки, которые сохраняют полный генетический материал, образуют линию бессмертных клеток, содержащих половую плазму (впоследствии линия половых клеток). Если клетка соматическая, она сохранит только информацию о пути дифференцировки в конкретную ткань. Это подтвердилось только для ряда животных, самое известное из них – круглый червь, лошадиная аскарида. Коллега Вейсмана, **Теодор Бовери**, наблюдал за развитием аскариды и обнаружил, что в ее клетках хромосомы разделялись неравномерно. Целиком хромосомы сохранялись только в линии половых клеток, а в соматических клетках происходила т.н. *диминуция хроматина*.

Таким образом, ответ на вышеставленный вопрос оказался очень простым. Яйцеклетка (дочерняя) появляется из яйцеклетки (материнской), как и все другие клетки организма.



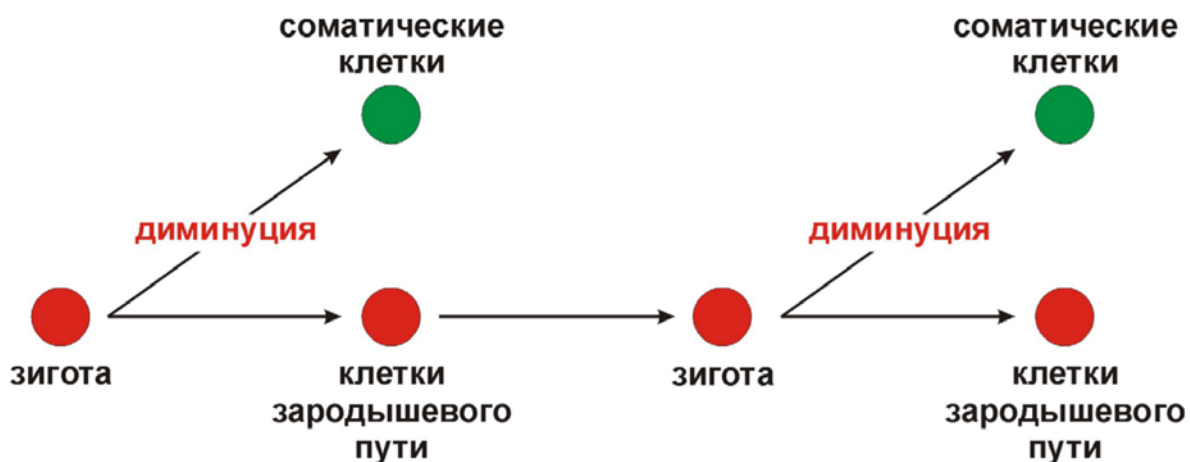


Рисунок 7. "Зародышевый путь" Вейсмана.

## Происхождение первичных половых клеток

### *Первичноротые:*

У некоторых животных, рачков *Copepoda*, предшественник половых клеток выделяется на втором-третьем цикле деления. В бластомере, который впоследствии даст начало линии половых клеток, присутствуют маркеры и включения (особые органеллы *эктосомы*), присущие только половым клеткам. К животным с ранним обособлением линии половых клеток относятся и нематоды, вместе с их классическим представителем, модельным объектом *C. elegans*. Для нематод характерно фиксированное количество клеток, формирующих взрослый организм, поэтому на них очень удобно отслеживать пути дифференцировок отдельных клеток. У *C. elegans* клетки, дающие начало половым, отличаются наличием *P-гранул* («пи-гранулы») и секрецией белка *Pie*.

### *Вторичноротые:*

У бесхвостых амфибий на стадии поздней бластулы выделяются клетки, содержащие включения зародышевой плазмы, при инактивации которых (например, УФ или хирургическим воздействием) животные развиваются стерильными. Внешний фактор, температура, также может влиять на работу таких включений (вараны, крокодилы, индейки). Первичные половые клетки также могут формироваться позиционно, при определенном взаимодействии зародышевых листков (млекопитающие). У первичноротых животных гидр существуют стволовые *i-клетки*, способные при необходимости формировать гаметы. При некоторых обстоятельствах любая клетка организма гидры может стать половой. У гидры нет половых желез, как у более высших животных, однако у них обособляется участок тела, в котором могут развиваться половые клетки.

Развитие различных групп животных обладает рядом сходств. Из одного зародышего листка (эктодерма, энтодерма или мезодерма) у разных животных возникают примерно одни и те же группы органов. Однако половые клетки не входят в состав какого-либо одного из листков, могут возникать из разных листков у разных таксонов. Но все же чаще всего ППК закладываются независимо, до образования листков.

Часто количество закладывающихся половых клеток видоспецифично. В случае нематоды *C. elegans* количество ППК строго фиксировано, причем их число можно регулировать, влияя на Р-гранулы путем экспериментального вмешательства.

### Характерные особенности миграции ППК:

- 1) Активная миграция. ППК очень подвижны. Они закладываются независимо от гонады и впоследствии активно мигрируют в нее.
- 2) Митотические деления. В процессе миграции из места закладки ППК происходят митотические деления. Количество делений видоспецифично.
- 3) Амебоидная форма. Активную миграцию обеспечивает способность ППК принимать амебоидную форму. Происходит благодаря согласованной работе тубулинов и белков движения кинезинов.
- 4) Адгезивность, способность «прилипнуть» к субстрату. Субстратом в случае ППК является фибронектин, выступающий путь к гонадному валику.

Закладка ППК может происходить рано, как в случае бесхвостых амфибий (Рис. 8В) в виде гранул в определенных клетках. У птиц в *бластодиске* ППК возникают на *стадии первичной полоски* в области серпа, лишённого мезодермы (Рис. 8Б).

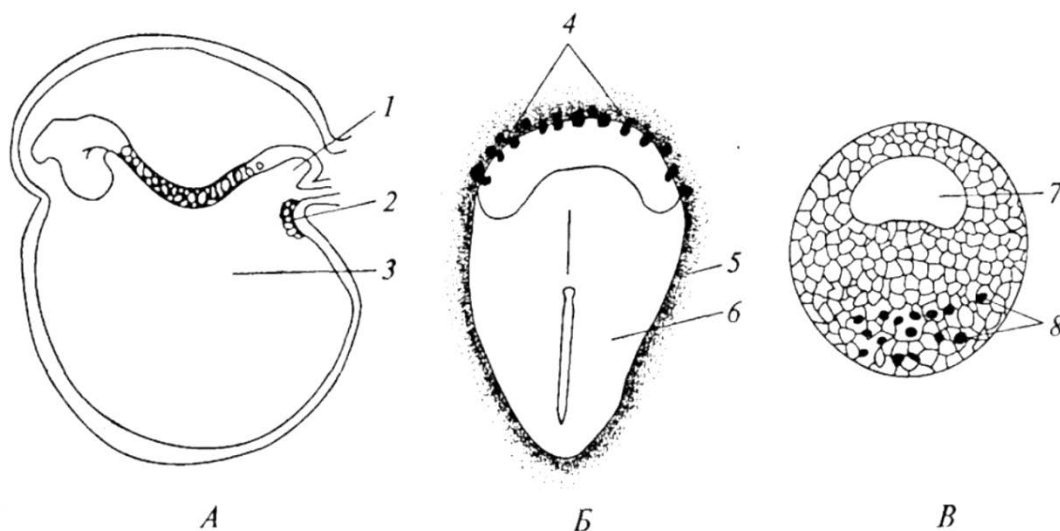


Рисунок 8. Образование линии половых клеток у различных позвоночных животных. А - млекопитающие, Б - птицы, В - амфибии.

Затем ППК у птиц попадают в сосуды, покрывающие поверхность желтка, путем *диapedеза*, особого процесса, при котором становится возможным протиснуться через эндотелиальные клетки сосуда. При приближении к гонадам, ППК чувствуют сигнал молекул-аттрактантов, так как обладают хемотаксисом. Выход из сосудов в зоне, приближенной к гонаде также осуществляется путем *диapedеза*. В случае млекопитающих (Рис. 8А), зарождение ППК происходит в энтодерме желточного мешка, а затем через заднюю кишку в область половых валиков.

### Бипотенциальная гонада

Для позвоночных животных характерно наличие *бипотенциальной гонады* (бисексуальной, способной развиться как в семенник, так и в яичник). Бипотенциальная гонада позвоночных закладывается из *ножек сомитов*, *промежуточной мезодермы* и частично – *мезодермы боковой пластинки* (Рис.9).

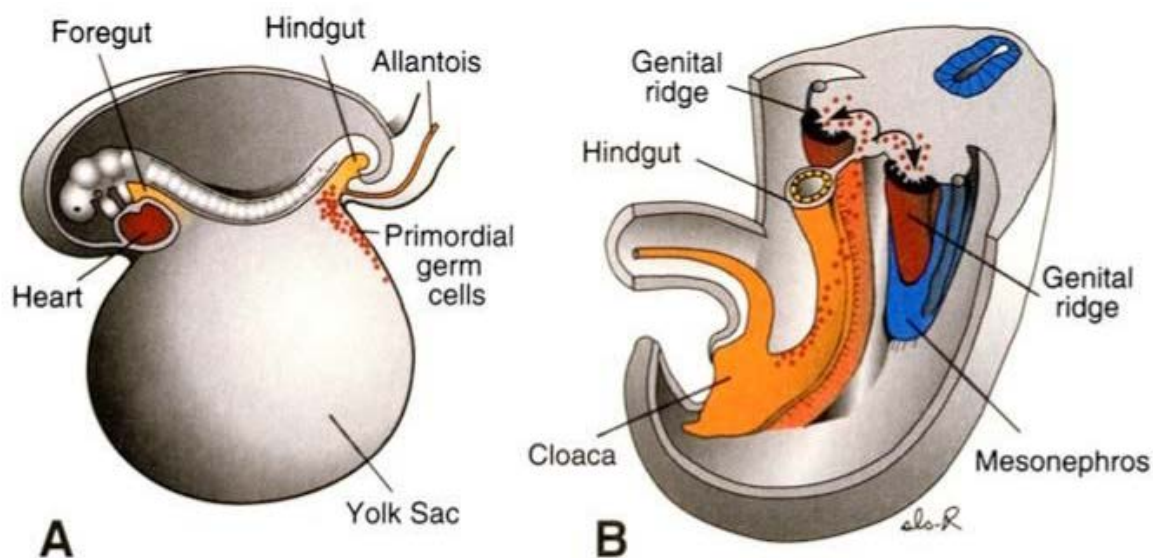


Рисунок 9. Развитие линии половых клеток у млекопитающих. А – трехнедельный эмбрион мыши, ППК располагаются в стенке желточного мешка в плотном контакте с аллантаисом, В – путь миграции ППК через стенку кишки и дорзальный мезентерий к половым валикам.

Бипотенциальная гонада имеет *кортикальный* (корковый, ближе к поверхности) и *медуллярный* (внутренний) слой. Если зародыш женского пола, его ППК заселят корковый слой. Если формируется организм мужского пола – ППК проникнут вглубь гонады, в медуллярный слой. Определение пола гонады также зависит от экспрессируемых в ней генов. Гены *DAX1* и *WNT4* определяют развитие по женскому типу, а *SOX9* и *SRY* – по мужскому.

В организмах обоих полов изначально закладываются оба протока (Рис.10) – *Вольфов канал* (впоследствии образует часть мужской половой системы) и *Мюллеров канал* (впоследствии образует часть женской половой системы).

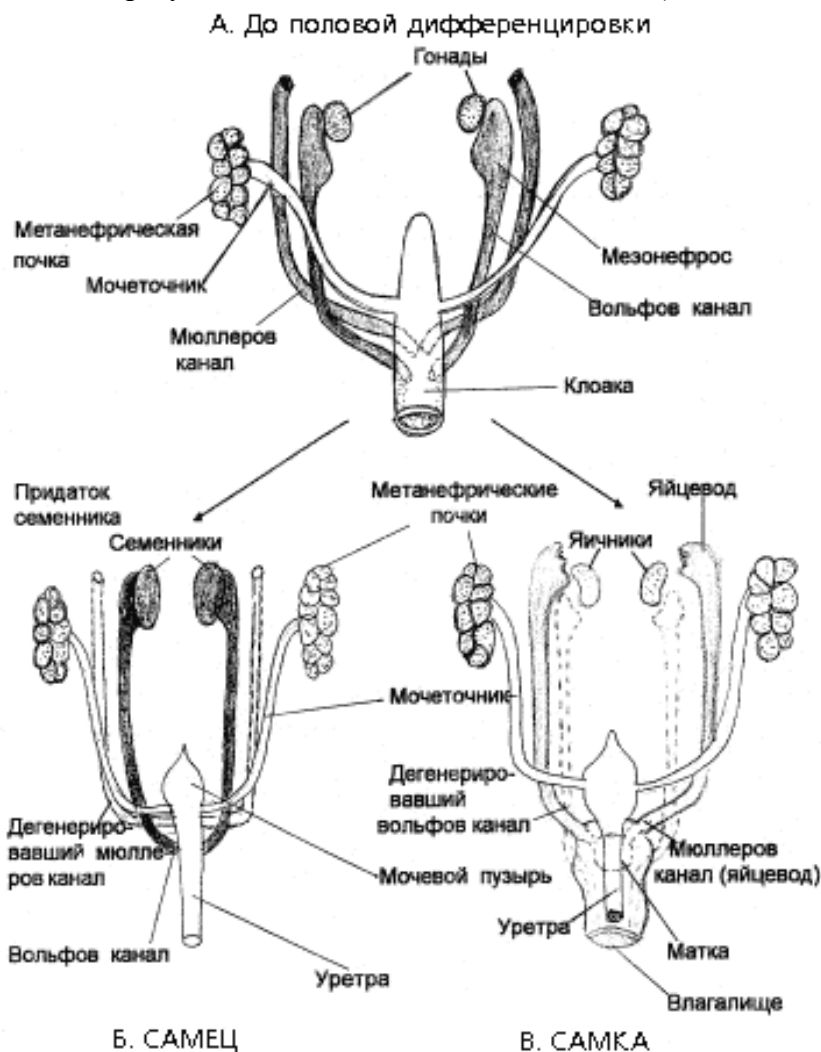


Рисунок 10. Развитие мужской и женской мочеполовой системы.

В случае развития по женскому типу, Вольфов канал деградирует, участвуя только в образовании мочеточника, а Мюллеров остается и образует *яйцеводы* (маточные трубы), матку и влагалище. Если развивается самец, дегенерации подвергается Мюллеров канал, оставаясь в виде простатической маточки и привеска яичка, а Вольфов канал становится семяпроводом.

## Этапы оогенеза

Схема оогенеза представлена на Рис.11. Период, в котором ППК мигрировали в гонаду с множественными делениями называется *периодом размножения*.

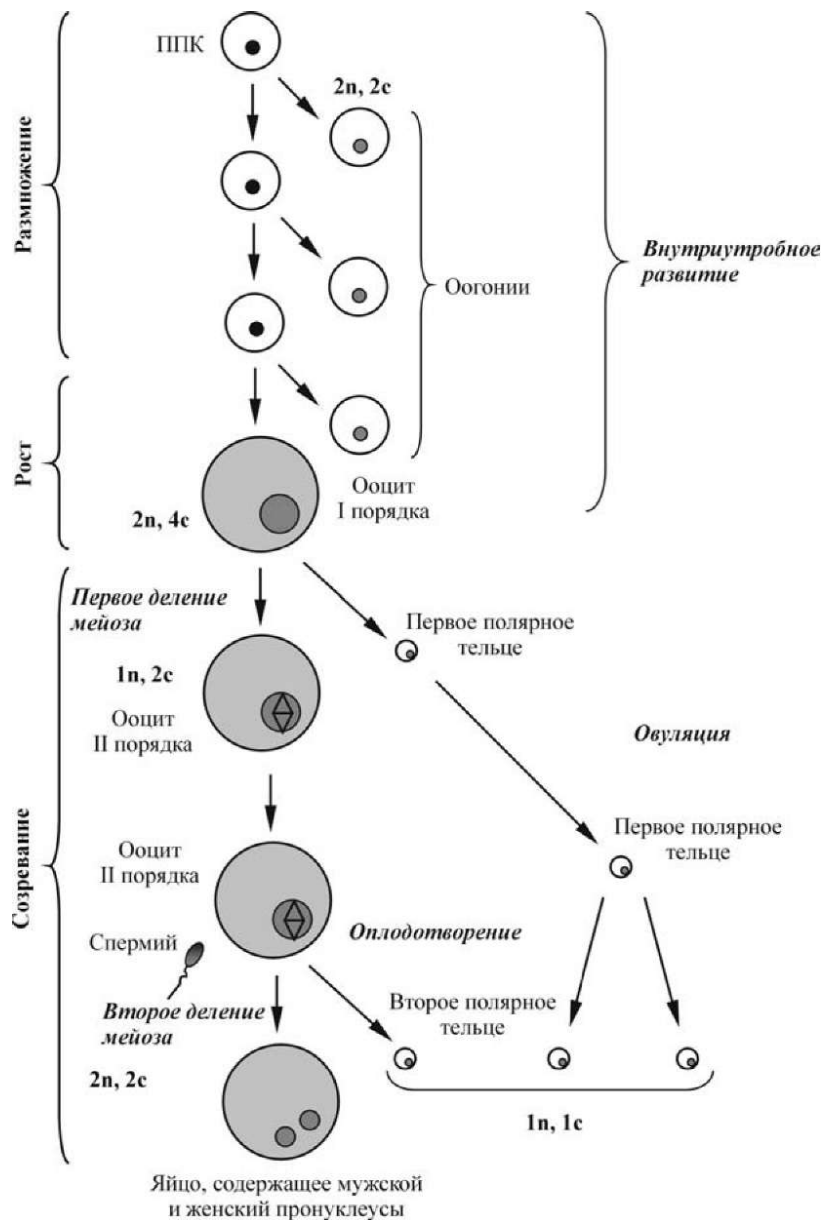


Рисунок 11. Схема оогенеза млекопитающих.

После периода размножения наступает *период созревания*. При заселении гонады клетки половой линии называются *гонии*. В женской гонаде находятся *оогонии*, а в мужской *сперматогонии*. Это стволовые клетки, способные к дифференцировке в зрелые гаметы. У некоторых рыб каждый сезон размножения запас яйцеклеток пополняется

благодаря делению гоний. У млекопитающих же деление гоний происходит только во внутриутробном периоде (примерно до 20 недели). На этом этапе в яичниках млекопитающих формируется максимальное количество половых клеток. При заселении гонад клетки теряют способность к митотическим делениям и вступают в мейоз становятся *первичными ооцитами* (*ооцитами первого порядка*). Ядерная формула ооцитов  $2n4c$ , эти клетки прошли этап синтеза, но он будет один на два последующих деления. Вследствие двух делений созревания ооцит уменьшает свою ploidy в два раза.

На стадии ооцита первого порядка (профаза первого мейоза) происходят два этапа роста, на этом этапе ооцит также называют *ауксоцитом*. *Малый рост* характерен развитием ядра и цитоплазмы с сохранением пропорций (ядерно-плазменного соотношения). На этапе *большого роста* или *вителлогенеза* происходит накопление большого количества желтка и вследствие этого увеличивается размер яйцеклетки.

## Классификации яйцеклеток

### Типы яйцеклеток по количеству желтка:

- 1) *Полилецитальные* — содержат большое количество желтка, сложно проходит деление, зачастую борозда не проходит всю яйцеклетку (членистоногие, рептилии, птицы, рыбы, кроме осетровых).
- 2) *Мезолецитальные* — содержат среднее количество желтка, борозда деления способна пройти до конца клетки (осетровые рыбы, амфибии).
- 3) *Олиголецитальные* — содержат мало желтка (моллюски, иглокожие, млекопитающие).
- 4) *Алецитальные* — не содержат желтка. Различают первичные (паразитические организмы) и вторичные алецитальные (плацентарные млекопитающие) яйцеклетки.

Желток в яйцеклетке может быть эндогенного происхождения (синтезируется самой клеткой) или экзогенного. В таком случае он синтезируется экстрагонадно и в виде предшественника, белка *вителлогенина*, попадает в яйцеклетку. Вителлогенин консервативен для многих видов животных, однако вырабатывается под действием разных гормонов (Рис.12). В случае фолликулярного типа питания вителлогенин из печени по кровеносным сосудам попадает в фолликул.

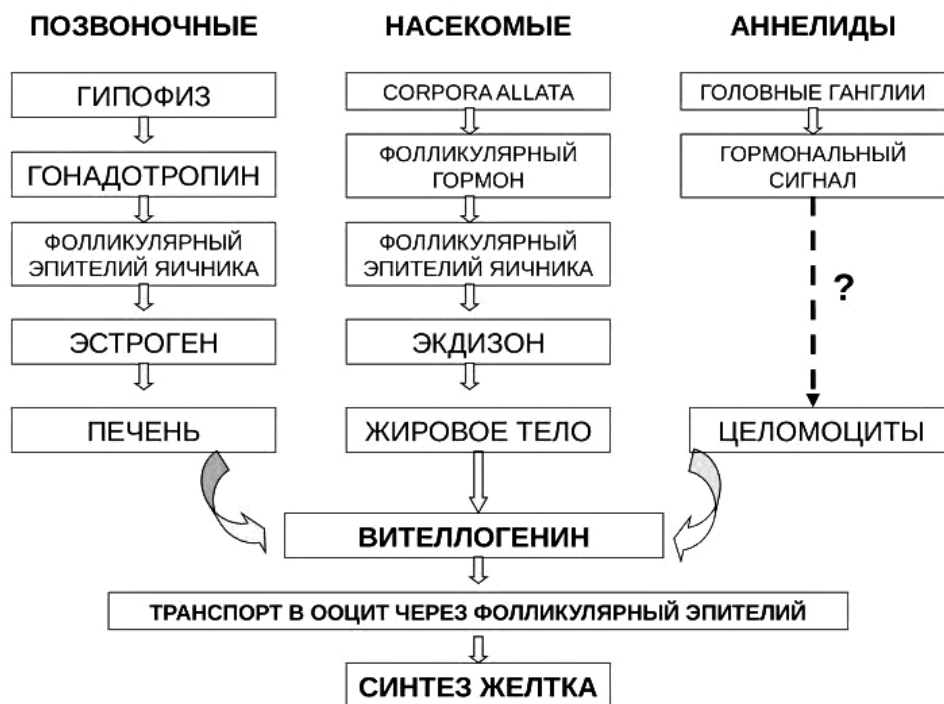


Рисунок 12. Трансэволюционные параллельные ряды регуляции вителлогенеза.

### Типы яйцеклеток по распределению желтка:

1) *Телолецитальные* — желток смещён к *вегетативному* полюсу яйцеклетки. Противоположный полюс называется *анимальным*. Сюда относятся некоторые полилецитальные (рыбы, кроме осетровых, рептилии, птицы) и все мезолецитальные яйца (осетровые рыбы, амфибии).

2) *Гомо (изо)-лецитальные* — желток распределён равномерно. Сюда относятся олиголецитальные яйца (моллюски, иглокожие, млекопитающие).

3) *Центролецитальные* — желток расположен в центре яйцеклетки. Сюда относятся некоторые полилецитальные яйца (членистоногие). Это совершенно особый тип яиц. Анимально-вегетативная полярность этих яиц не выражена. Вместо анимального и вегетативного полюсов у этих яиц говорят о переднем и заднем полюсах. В центре яйца расположено ядро, а по периферии — ободок свободной от желтка цитоплазмы. Оба этих района — центр и периферия яйца — связаны тонкими цитоплазматическими мостиками, а всё промежуточное пространство заполнено желтком. Дробление в этом случае происходит в центре, а ядра дочерних клеток по мостикам попадают на периферию.

### Типы питания яйцеклеток:

1) *Фагоцитарный тип* – клетка питается окружающими соматическими или похожими на нее первичными клетками (губки).

2) *Солитарный тип* – клетка сама синтезирует все необходимые компоненты, очень медленный (кишечнополостные).

3) *Алиментарный тип* – клетка использует вспомогательные клетки. Делится на:

1. *Нутриментарный тип* – вспомогательные клетки формируются при неполном делении оогония, связаны цитоплазматическими мостиками, *фузомами* (насекомые). Клетки, имеющие меньшее число связей с сестринскими, становятся *клетками-кормилками* (фагоциты), а наибольшее – половой. Если количество связей равное, половой будет выбрана та клетка, в чью сторону направлен цитологический ток веществ. Сестринские клетки-кормилки становятся полиплоидными и снабжают ооцит в основном иРНК. Такой тип питания также называется *полигеномным*, так как геномы сестринских клеток обслуживают один геном ооцита (в среднем 600 геномов на один). Для того, чтобы клетка имела шанс стать половой, необходимо, чтобы в ее состав при делении попали эктосомы. Эктосомы содержат иРНК генов *Oscar*, *Nanos*, *Vasa*, белки которых необходимы для формирования линии половых клеток.

2. *Фолликулярный тип* – клетка обеспечивается питанием благодаря соматическим фолликулярным клеткам. У птиц и рептилий фолликулярные клетки способны синтезировать некоторые виды РНК. Фолликулярные клетки в составе фолликула могут выполнять эндокринную функцию.

### Строение фолликула яичника млекопитающих

Ооцит и фолликулярные клетки образуют *фолликул* (Рис.12). *Первичный фолликул* – ооцит окружен одним слоем фолликулярных клеток, т.н. *клеток гранулезы*. Затем количество фолликулярных клеток растет, в фолликуле образуются полости (*вторичный фолликул*), лакуны, которые впоследствии сливаются в одну большую лакуну (*третичный фолликул* или *Граафов пузырьки*). Фолликулярные клетки Граафова пузырька, находящиеся в непосредственном контакте с ооцитом, называются *лучистый венец* или *corona radiata*, а те, что соединяют его с оставшейся гранулезой – клетки *яйценосного стебелька*.



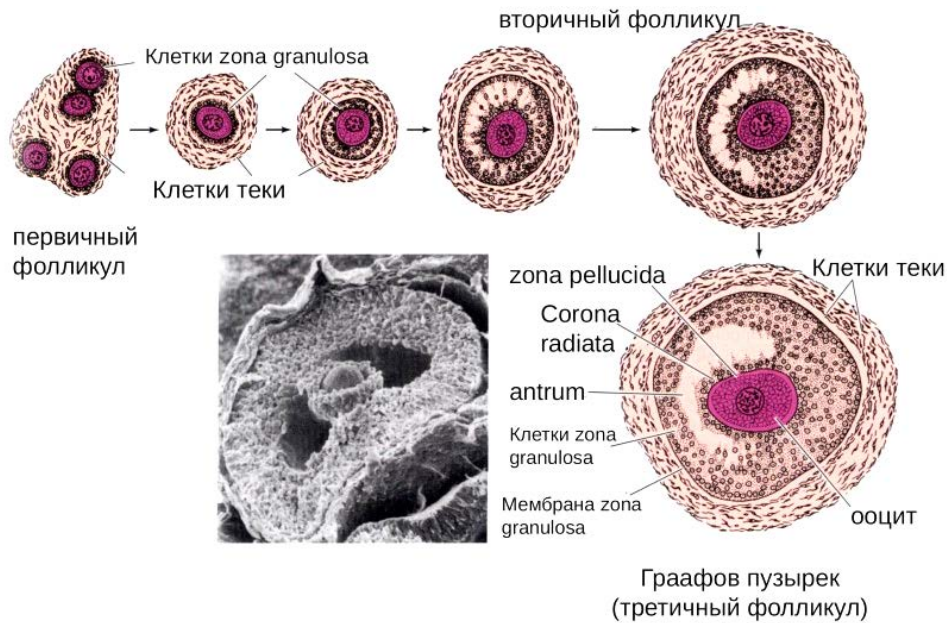


Рисунок 13. Фолликулогенез в яичнике млекопитающих.

### Блок мейоза у разных животных

У многих животных со сперматозоидом встречается незрелая яйцеклетка, на одном из этапов развития (Рис.14).

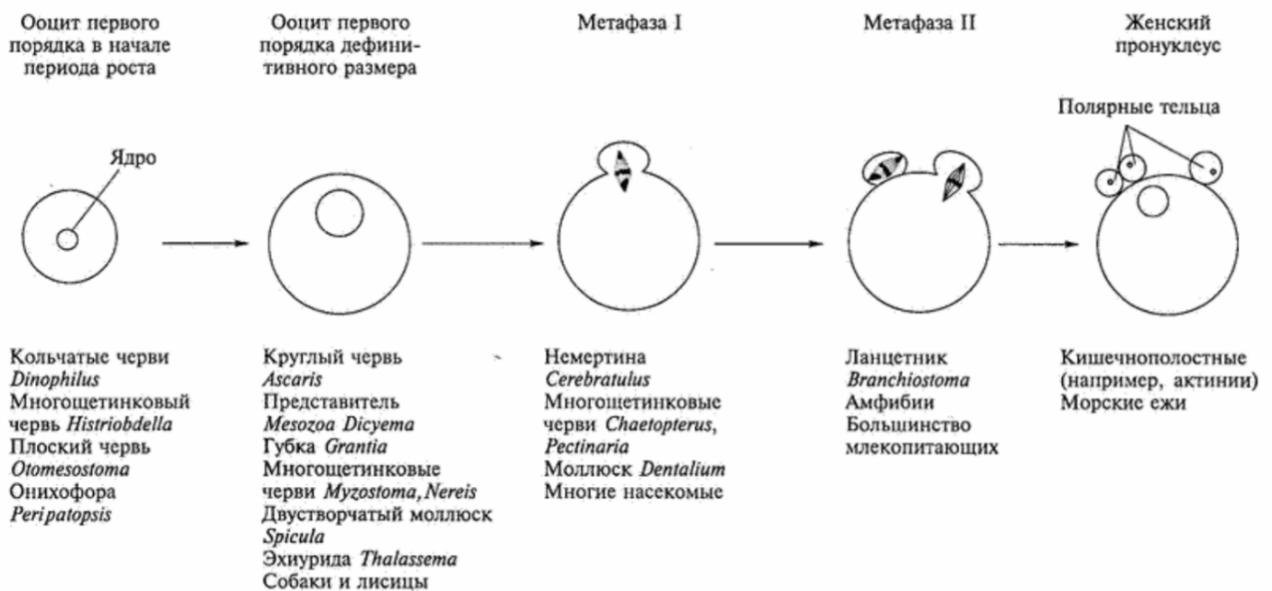


Рисунок 14. Блок мейоза у разных типов животных. На рисунке представлены стадии развития яйцеклетки, на которых происходит оплодотворение у разных животных.

У таких животных наблюдается *блок мейоза* – остановка мейотического деления на определенной стадии. Для млекопитающих характерен блок мейоза на метафазе II, снимающийся оплодотворением. Для блокирования мейотического деления выделяется цитостатик, гормон PP39MOS. Данный белок не дает деградировать циклину и таким образом не дает произойти клеточному делению.

## Лекция 3. Сперматогенез

### Преформизм и эпигенез

Создатель микроскопа **Антони Левенгук** впервые увидел сперматозоид под микроскопом. Изначально сперматозоиды приняли за паразитов или мелких зверьков («анималькули»). Среди преформистов существовало деление на тех, кто считал, что все развитие предопределено (*преформировано*) в яйцеклетке, *овисты*, и в сперматозоиде, *анималькулисты*. Приверженец теории преформизма, голландский ученый **Николас Хартсекер**, увидел в микроскоп структуру сперматозоида, напомнившую ему скрученного человечка (Рис.15), что подтвердило гипотезы анималькулистов того времени. Однако именно **Карл Бэр**, ученый, который впервые увидел яйцеклетку, понял, что увиденное в микроскоп Левенгуком – мужские половые клетки. Именно Бэр дал название этим клеткам – сперматозоиды. У него получилось очень ловко примирить преформистов и сторонников теории эпигенеза. Бэр сказал, что «развитие есть преформированный эпигенез». Ученый впоследствии увидел и описал процесс оплодотворения, но не знал о понятии мейоза. Мейоз был описан чуть позднее бельгийским ученым **Эдуардом ван Бенеденом**. Морфологически, клетки и процессы, с ними связанные, были хорошо описаны к XIX веку. Однако только в XX веке, с развитием микроскопии, с участием молекулярной биологии и генетики были получены более новые, современные данные, объясняющие механизмы и суть этих процессов.

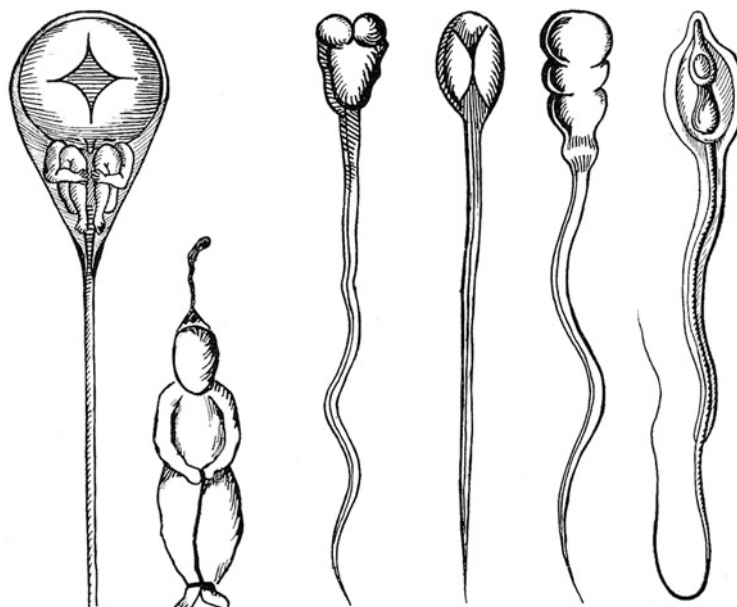


Рисунок 15. Иллюстрация представлений преформистов.

## Характеристика сперматозоида

Как правило, самые большие клетки организма – яйцеклетки. В большей степени это объясняется накоплением питательных веществ и РНК. Помимо накопления питательных веществ, яйцеклетка имеет защитные оболочки.

Сперматозоиду нет необходимости накапливать вещества или защищать эмбрион, поэтому они имеют маленький размер, а их количество во много раз превышает количество яйцеклеток. Общей чертой сперматозоида и яйцеклетки является гаплоидность. Также из-за того, что сперматозоид, как и яйцеклетка, – предельно дифференцированные клетки, их жизнь без оплодотворения коротка.

### Характерные особенности сперматозоида:

- 1) *Небольшой размер* – считается самой маленькой ядерной клеткой организма. Достигается благодаря плотной упаковке хромосом в инактивированном состоянии.
- 2) *Большое количество*
- 3) *Гаплоидность*
- 4) *Подвижность* - чаще всего сперматозоиды имеют жгутик, имеющий строение клеточной реснички. Жгутик сперматозоида дрозофилы превышает размер взрослой особи. Существуют сперматозоиды без жгутиков – амебообразные сперматозоиды (некоторые карповые рыбы).

### Формирование мужских гонад. Строение семенного канальца

Для определения пола очень важен ген *SRY*, *sex-determining region of Y* – регуляторный участок на Y хромосоме. Без него развитие идет по базовому женскому типу. Так же происходит, если ген неактивен или произошла делеция. В то же время существует ген, определяющий развитие по женскому типу, располагающийся на X хромосоме, ген *DAX1*. Избыток гена *DAX1* приводит к дисгенезу гонад.

При заселении индифферентной гонады, мужские ППК заселяют медуллярную зону. В состав мужского полового валика входят *половые тяжи*, которые и заселяются ППК. Тяжи впоследствии превращаются в *извитые семенные канальцы*, трубочки, в которых происходит весь дальнейший сперматогенез. Гены *SRY* и *SOX* определяют развитие семенника, причем *SOX* отвечает за правильное развитие соматических клеток тестиса. Снаружи канальца находятся плоские *клетки Лейдига*, синтезирующие андроген *тестостерон*. Сам каналец образуют высокие *клетки Сертоли*, синтезирующие *антимюллеровский гормон*, АМГ в небольшом количестве эстроген *эстрадиол*. Клетки Сертоли не имеют фиксированной формы, они очень пластичны, они образуют между собой плотные контакты, в результате чего возникают «камеры»,

содержащие клетки сперматогенеза. Клетка Сертоли поляризована, ее базальный конец прилегает к базальной мембране канальца, а апикальный конец направлен в просвет канальца. При продвижении от базального к апикальному полюсу соматической клетки Сертоли, сперматозоиды также проходят последовательные стадии сперматогенеза (Рис.16). В экспериментах такой «лифт» от базального конца к просвету канальца проходят искусственные частицы и маркеры, например, частицы туши, что говорит о его автономности и независимости от клеток сперматогенеза. Его работа обеспечена динеиново-тубулиновым комплексом.

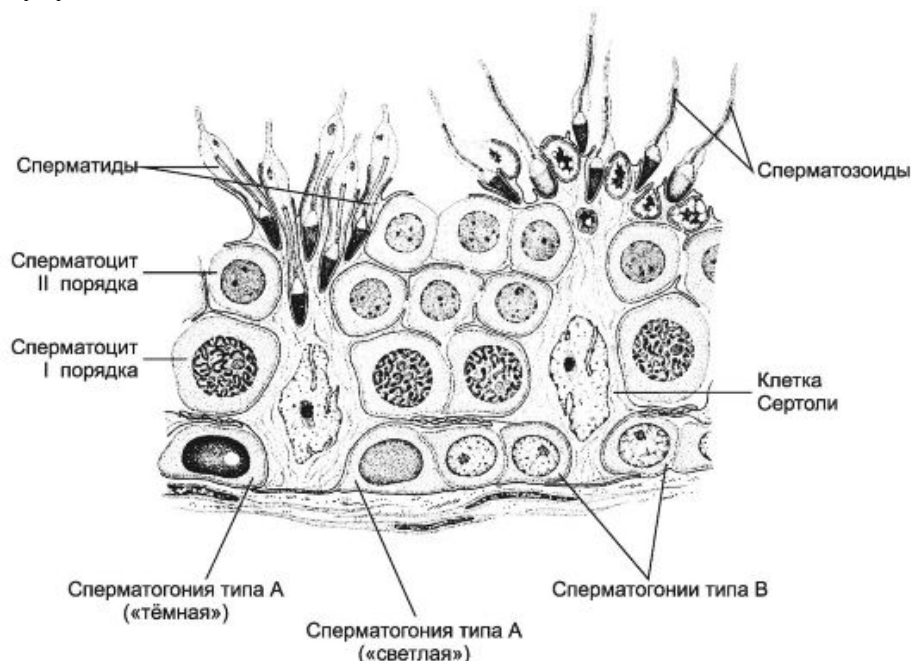


Рисунок 16. Сперматогенез в извитом канальце млекопитающего.

Семенные каналцы отделены от тока крови *гемато-тестикулярным барьером*. Барьер сформирован несколькими компонентами: плотными контактами клеток Сертоли друг с другом, базальной мембраной семенного канальца, миоидными клетками, окружающими каналец, адлюминальным и базальным компартментом, базальной мембраной капилляра и клетками эндотелия. Это позволяет избежать иммунологический конфликт, который может возникнуть из-за изменяющегося белкового состава клеток сперматогенеза.

#### Функции клеток Сертоли:

- 1) *Трофическая* – осуществляет питание клеток сперматогенеза.
- 2) *Опорная* – создают структуру семенника, выполняют функцию компартментализации и синхронизации сперматогенеза. Старое название таких клеток, *суспендоциты*, отражает именно опорную функцию.

3) *Регуляторная* – участвуют в гормональной регуляции. Отвечают на сигнал ФСГ гипофиза выработкой АМГ и эстрадиола.

4) *Фагоцитоз* – элиминация клеток сперматогенеза плохого качества. Фрагменты цитоплазмы в виде отброшенных резидуальных капель в просвете семенного канальца могут захватываться клетками Сертоли для повторной обработки.

### Этапы сперматогенеза

Сперматогенез в основном схож с оогенезом, однако существуют некоторые различия (Рис.17). В оогенезе гонии размножаются только в эмбриональном периоде, а в сперматогенезе – всю жизнь, благодаря стволовым клеткам. В оогенезе один ооцит первого порядка дает только одну яйцеклетку (и три полярных тельца), а в сперматогенезе один сперматоцит первого порядка дает четыре сперматозоида. В оогенезе существует блок

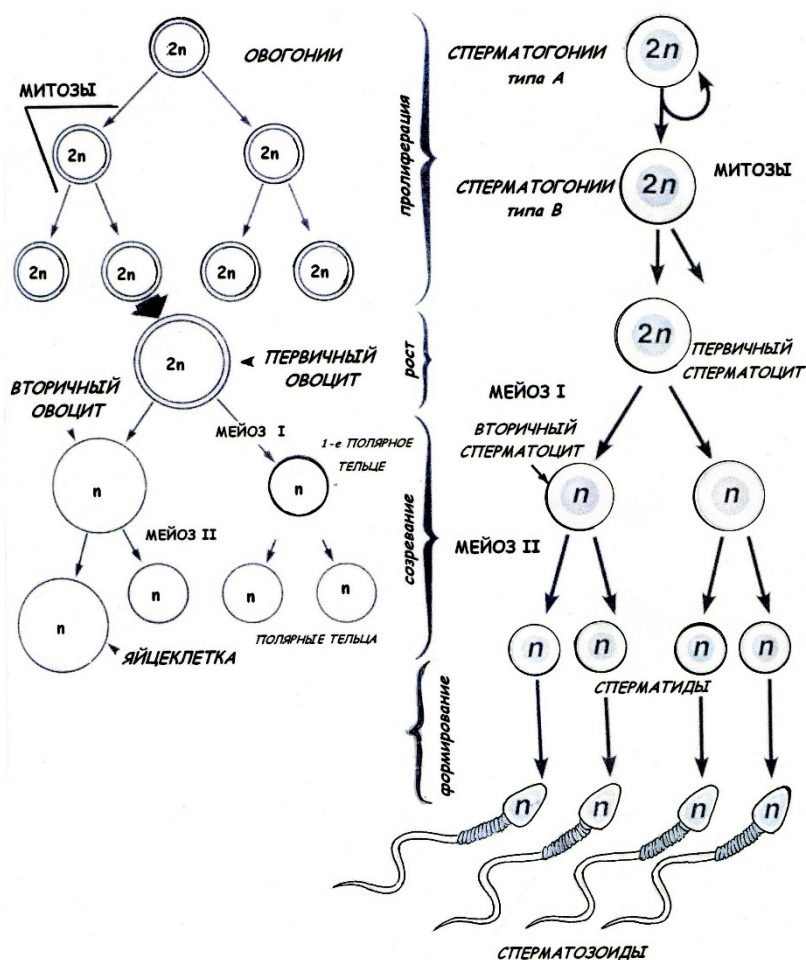


Рисунок 17. Схема сперматогенеза.

мейоза, сперматогенез непрерывен. Превращение «цита» в яйцеклетку по морфологии в оогенезе происходит до мейоза, а в сперматогенезе превращение круглого сперматоцита в сперматозоид – после, в процессе формирования. В процессе сперматогенеза дочерние клетки до последних стадий соединены синтициальными мостиками в кластеры, что позволяет равномерно делить питательные вещества и синхронизировать их деления.

### Этапы сперматогенеза:

1) *Размножение* – этап митотических делений гониев. Число делений видоспецифично (примерно от 1 до 14, у мыши 5). Гонии - располагаются в базальном полюсе клеток Сертоли. Более крупный сперматогоний типа А1 – стволовая клетка, способная к двум типам делений: самовоспроизводительные деления и дифференцировка в сперматогоний типа А2. Происходят до четырех дифференцировочных делений, в результате появляются сперматогонии от типа А1 до типа А4. Сперматогоний А4 – последняя клетка, способная к митотическим делениям. При пятом делении сперматогонии типа А4 дают последний тип гониев, сперматогонии типа В.

2) *Созревание* – этап, при котором клетки теряют способность к митотическим делениям. *Сперматоцит первого порядка* или *первичный сперматоцит*, проходит синтетическую фазу клеточного цикла, немного растет, вступает в первое мейотическое деление и становится сперматоцитом второго порядка. Блоков мейоза, как в случае оогенеза, не происходит. Второе деление происходит также достаточно быстро, в результате чего появляется *округлая сперматида*, зрелая гаплоидная клетка.

3) *Формирование* или *спермиогенез* – отличительный этап сперматогенеза. Сперматозоид принимает окончательную форму, возникает головка, шейка и хвост. В момент формирования сперматиды поляризуется: с одного конца находятся аппарат Гольджи и ядро, а на другом – центриоль и растущий от нее жгутик. Ядро сперматозоида отличается очень плотной упаковкой генетического материала (гистоны замещаются протаминами). Аппарат Гольджи преобразовывается в важный органоид сперматозоида, *акросому* (необходима для лизирования оболочки яйцеклетки). Митохондрии сперматиды собираются у полюса рядом с жгутиком и образуют спираль. Цитоплазма клетки начинает «стекать» в сторону жгутика, оставляя тонкую мембрану на акросоме и всей головке. Далее остатки лишней цитоплазмы в виде капли, *резидуальная капля*, уменьшается и скользит вдоль жгутика. В результате капля сбрасывается в просвет канальца. Резидуальные капли можно увидеть в просвете при окрашивании по Фельгену. В них содержится большое количество аминокислот и прочие органеллы, однако для дальнейшей жизни сперматозоида они не нужны.

Если спермиогенез отсутствует, возникают проблемы с фертильностью и бесплодие. Несмотря на зрелость сперматид, они неспособны к правильному движению и доставке генетического материала к ооциту. В таком случае прибегают к услугам

клиник ЭКО, где при помощи инжектора производят инъекцию сперматиды в яйцеклетку. Так как ядро сперматиды гаплоидное, такая процедура дает возможность побороть бесплодие у таких пациентов.

Сперматогенез начинается с наступлением половозрелости. Деление сперматогониев регулируется фактором BMP8b (члены этого семейства являются универсальными молекулами, начинающими некоторые цепочки взаимодействий, в случае сперматогенеза синтезируются самими гониями). Переход к мейотическим делениям регулируется фактором qDNF (фактор роста глии), причем потеря способности делиться митозом возникает при падении концентрации данного фактора. Начало спермиогенеза регулируется геном *CREM*, функция митохондрий в данном процессе регулируется геном *DonJuan*. Мембранные взаимодействия в процессе оплодотворения регулируются геном *ADAM*.

### Типы семенников

1) Фолликулярный – самый простой тип семенника (круглоротые). Гомологи клеток Сертоли образуют стенки сфер-фолликулов. Клетки сперматогенеза изначально находятся вне фолликулов и только при начале прохождения генеза заселяют такие сферы.

2) Фолликулярно-цистный – схожий с предыдущим (хрящевые рыбы, хвостатые амфибии). Половые клетки также извне заселяют необходимое пространство. Фолликулярные клетки образуют камеру, внутри которой идет гаметогенез. Интересно, что преобразование фолликулярного семенника в фолликулярно-цистный не совпадает с эволюционной шкалой, так как встречается у хвостатых амфибий.

3) Канальцево-цистный – группа фолликулов выстроилась в цепочку, а их стенки пропали. Так образовался примитивный каналец. ППК заселяют сразу каналцы. Сперматогенез идет в каналце, но внутри цист, расположенных в его стенках (костные рыбы, бесхвостые амфибии).

4) Канальцевый – у всех амниот. Его строение было рассмотрено выше. Имеются каналцы, в которых проходит сперматогенез в камерах клеток Сертоли.





Рисунок 18. Типы строения семенников позвоночных животных.

# Лекция 4. Оплодотворение

## Функции оплодотворения

Процесс оплодотворения завершает предзародышевый период и начинает зародышевый период развития. В оплодотворении участвуют две гаплоидные гаметы, мужская и женская, которые при слиянии дают зародышу диплоидность. Интересно, что оплодотворение, слияние двух предельно дифференцированных клеток, дает в результате тотипотентную клетку, зиготу.

### Оплодотворение выполняет две основные функции:

- 1) Триггер для дальнейшего развития яйцеклетки (исключение – партеногенез и андрогенез)
- 2) Создание организма с новой генетикой

Процессы, предшествующие оплодотворению, изучаются наукой «Биологией размножения». Существует целый комплекс событий, касающийся особей, участвующих в оплодотворении, который приводит к оплодотворению. В них задействовано поведение (ритуалы ухаживания, турнирные бои), морфология особей, половой диморфизм.

Половые продукты выделяются либо в воду при *наружном оплодотворении*, либо в половые пути самки при *внутреннем*.

## Этапы оплодотворения

1) *Дистантные взаимодействия или сближение гамет* – происходят до клеточного контакта. Для гамет характерен *хемотаксис*, чувствительность гамет к определенным *молекулам-аттрактантам*. Яйцеклетка может выделять аттрактанты, а сперматозоиды – их чувствовать и двигаться по направлению градиента повышения их концентрации. Впервые аттрактанты обнаружены у гидроидных, однако присутствуют они даже у млекопитающих. У иглокожих это 10- и 14-аминокислотные пептиды. Также для сперматозоидов характерен *реотаксис* – движение против встречного тока жидкости в половых путях (маточные трубы млекопитающих). Также у животных с внутренним оплодотворением сокращение гладкой мускулатуры половых путей ускоряет продвижение сперматозоидов к *ампулярному отделу яйцевода*, где происходит оплодотворение.

Несмотря на то, что сперматозоид, покидающий половые пути самца, уже генетически зрелый и фертильный (и был таким еще будучи на стадии округлой сперматиды), ему необходим ряд подготовительных процессов, носящих общее название «*реакция капацитации*». Капацитация происходит в ответ на контакт сперматозоидов с

жидкостью половых путей самки. Реакция заключается в том, что из оболочки сперматозоида уходят лишние холестеролы (холестерины), а также становится активным фермент *галтаза* (способствует слиянию мембран и движению клеток по субстрату). До капацитации галтаза неактивна в результате блока галактазамингликана-N-ацетилглюкозамина. При капацитации блок снимается. В процессе капацитации увеличивается подвижность сперматозоидов, готовность к акросомной реакции. Капацитация происходит не одновременно со всеми сперматозоидами из эякулята, а периодически с небольшим количеством сперматозоидов. Оставшиеся могут некоторое время храниться в половых путях самки. Только капацитированные сперматозоиды могут пройти *лучистый венец* (окружающие яйцеклетку фолликулярные клетки гранулезы). При погружении сперматозоидов в лучистый венец (она же *фолликулярная оболочка яйцеклетки*), происходит процесс, сходный с диапедезом в миграции ППК птиц. Сперматозоиды раздвигают фолликулярные клетки, чтобы приблизиться к ооциту.

2) *Контактные взаимодействия* – характеризуются активацией сперматозоида и яйцеклетки. Происходят частично на следующем этапе. Для активации сперматозоида характерна *акросомная реакция* (Рис.19), по своему принципу сходная с экзоцитозом. В выемке под акросомой располагается глобулярный актин. Акросома, образованная аппаратом Гольджи, представляет собой вакуоль с собственной мембраной. Таким образом, на переднем конце сперматозоида находятся две мембраны: собственная мембрана сперматозоида и мембрана вакуоли акросомы. При контакте внешняя мембрана апикального конца распадается на множество мембранных пузырьков. Внутренняя мембрана (мембрана акросомы) смыкается с оставшейся внешней становится ее продолжением. Таким образом, содержимое акросомы изливается на поверхность яйцеклетки, при этом сама мембрана сперматозоида остается целой. В акросоме содержится фермент *гиалуронидаза*, способный растворить оболочку яйцеклетки, а также способствующие слиянию мембран.

3) *Слияние гамет* – см. ниже раздел «Слияние гамет»

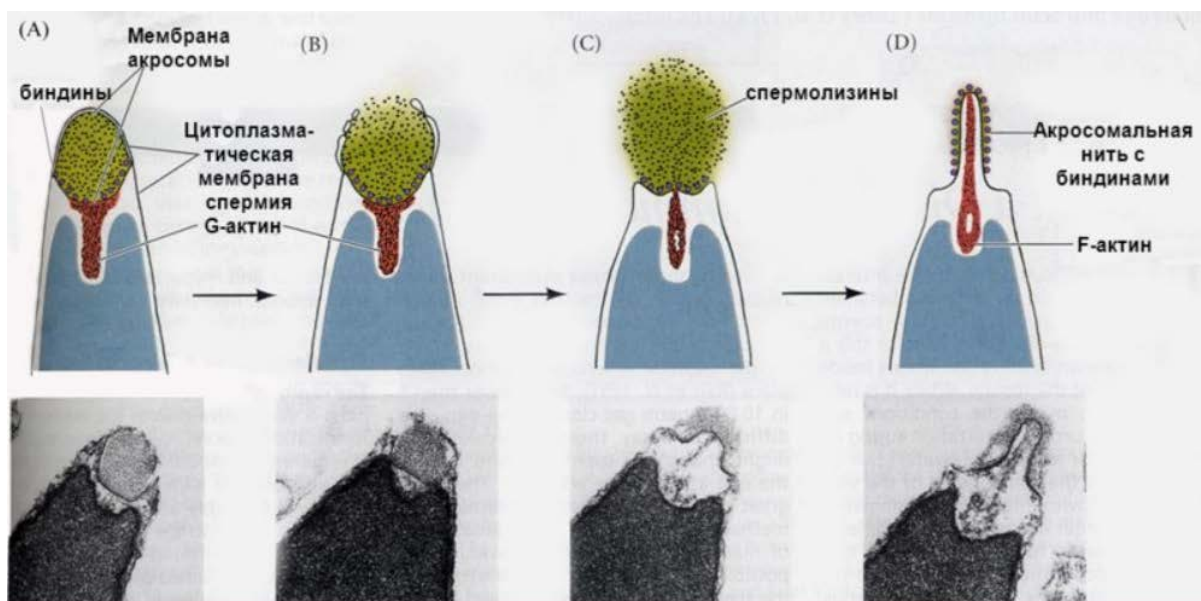


Рисунок 19. Акросомная реакция сперматозоида при оплодотворении.

### Активация яйцеклетки

После слияния клеток, мембрана сперматозоида встраивается в мембрану образующейся зиготы и постепенно передает ей свои свойства. Так, например, в этом месте на мембране присутствует слабopоложительный заряд (-10 мВ) в то время, как на яйцеклетке сохраняется примерно (-70 мВ), как показано на рисунке. Такой процесс называется «*быстрый блок полиспермии*» и предохраняет яйцеклетку от проникновения лишнего сперматозоида (есть виды животных, для которых характерно проникновение нескольких сперматозоидов). Начиная от места слияния, по яйцеклетке идет волна быстрой смены мембранного потенциала, вызывая ее активацию.

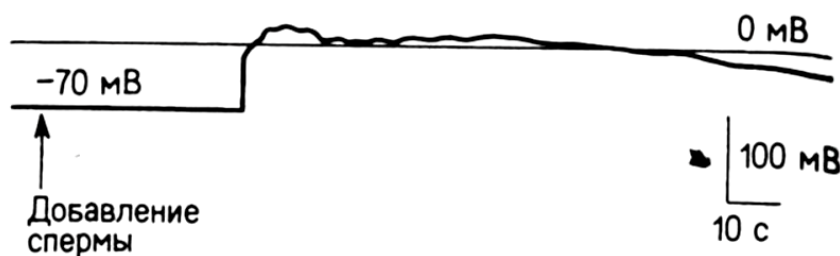


Рисунок 20. Мембранный потенциал в яйце морского ежа до и после оплодотворения. До добавления сперма разность потенциалов по обе стороны плазматической мембраны составляла около - 70 мВ (содержимое клетки имеет больший отрицательный заряд, чем ее окружение). Когда спермий соединяется с яйцом, за 0,1 с потенциал сдвигается в направлении положительных величин.

Активация яйцеклетки также включает в себя механизмы рецепции сперматозоида (Рис.21). На мембране яйцеклетки присутствует G-белок (древний рецептор), при действии которого активируется фосфолипаза С. Фосфолипаза в свою очередь активирует встроенную в мембрану т.н. *инозитольную систему*. В данной системе происходит распад фосфоинозитолдифосфата (PIP<sub>2</sub>) на два компонента: *фосфоинозитол-3 (IP<sub>3</sub>)* и *диацилглицерол (DAG)*. Инозитол-3-фосфат выделяется в цитоплазму, где оказывается главным внутриклеточным мессенджером. Диацилглицерол остается в мембране, где под действием фосфолипазы С активирует действие ионных каналов (натрий-водородных обменников).

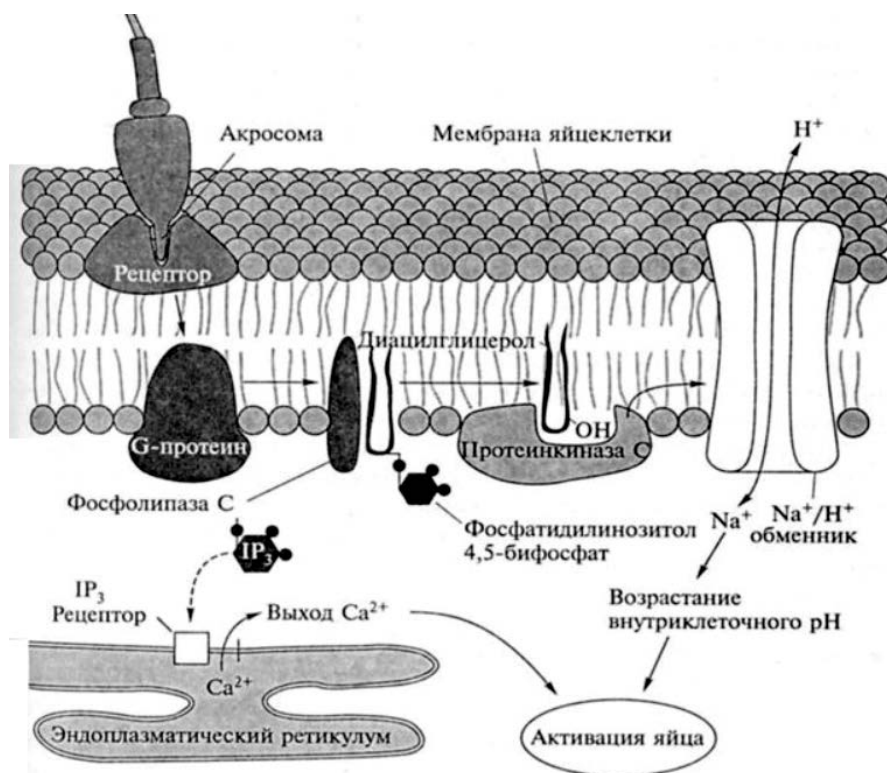


Рисунок 21. Реакция активации яйцеклетки.

Под действием инозитол-3-фосфата в клетке высвобождаются ионы кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ), которые могут быть как эндогенного происхождения (кальций содержится во внутренних клеточных депо эргастоплазмы и высвобождается после сигналов внутриклеточных мессенджеров), так и внешнего (благодаря ионофорам, переносящим кальций в клетку через мембрану). В яйцеклетке он хранится в ЭПР. Кальций высвобождается волнами по яйцеклетке (одна или несколько волн, видоспецифический признак, визуализируется красителем экваринном, благодаря которому кальций светится).

После изменения мембранного потенциала и высвобождения кортикальных гранул запускается *кортикальная реакция*, с высвобождением содержимого *кортикальных гранул* путем экзоцитоза. Кортикальные гранулы располагаются под мембраной яйцеклетки. При этом под желточную оболочку начинает закачиваться вода из цитоплазмы благодаря осмоактивному компоненту, образуя *перивителлиновое пространство*. При этом происходит разрушение белковых ножек, на которых держалась желточная оболочка. Вместе с этим разрушаются кортикальные гранулы. При выкачивании воды в перивителлиновое пространство, сама яйцеклетка сжимается. Кортикальная реакция осуществляет «медленный блок полиспермии».

#### **В состав кортикальных гранул входит:**

1. *Вителлиновая деламиназа* – отделяет желточную оболочку от мембраны яйцеклетки.
2. *Сперморецепторная гидролаза* – освобождает поверхность яйцеклетки от осевших на желточную оболочку сперматозоидов, путем лизиса их сайтов соединения.
3. *Гликопротеид* – осмоактивный компонент.
4. *Пероксидаза* – вызывает затвердевание оболочки оплодотворения.
5. *Гиалин* – структурный белок (иглокожие), позволяющий увеличить твердость мембран образующихся впоследствии бластомеров.

## **Слияние гамет**

Сначала сливаются мембраны, *фузогенез*. Затем сливаются плазмы клеток, *плазмиогамия*. После слияния плазмы, в яйцеклетку попадает мужское ядро. При попадании ядра сперматозоида происходит замещение протаминов, служащих для очень плотной упаковки генетического материала, на стандартные белки гистоны. Ядро увеличивается и достигает размера ядра яйцеклетки. Помимо ядра в клетку также попадает центриоль, из которой растет жгутик, причем при слиянии именно она первой попадает в клетку. Для яйцеклетки же необходимо завершение мейотического деления («дозревание») после блока мейоза. Завершает слияние мембран гамет взаимодействие белка мембраны яйцеклетки CD9 с белком мембраны головки сперматозоида Izumo (названа японцами в честь богини бракосочетания). Если произвести нокаут данного гена у мужской особи, оплодотворения не произойдет.

Общая схема контактных взаимодействий представлена на Рис.22. После контакта мембран и поступления ионов кальция в клетку, происходит выход из клетки протонов и обратная закачка ионов натрия. При их отсутствии в среде оплодотворение не происходит. При выходе протонов происходит «защелачивание» цитоплазмы, повышается рН. После этого активируется динеиновая АТФаза, активирующая сперматозоид. При повышении рН происходит полимеризация глобулярного актина, находящегося под акросомной везикулой и его «выстреливание» в виде стержня (у

некоторых животных несколько, видоспецифический признак). На этом выросте белки узнавания подаются к мембране яйцеклетки. Такие белки, биндины, помогают узнавать свой вид на клеточном уровне. На мембране яйцеклетки присутствуют рецепторы к биндинам. В ответ на вырост полимеризованного актина на поверхности яйцеклетки возникает «бугорок оплодотворения», также образованный актином, но более крупными кластерами.



Рисунок 22. Схема контактных взаимодействий при оплодотворении.

## Оболочки яйцеклетки при оплодотворении

При наружном оплодотворении (морской еж) сперматозоид проходит студенистую оболочку яйцеклетки благодаря гиалуронидазе, содержащейся в акросоме (Рис.23). В этом случае акросомная реакция предшествует закреплению клетки на поверхности яйцеклетки. Внутри сперматозоида центриоль выходит на апикальный конец, чтобы проникнуть в яйцеклетку перед ядром. Лучи центриоли сперматозоида взаимодействуют с кортикальным отделом цитоплазмы яйцеклетки таким образом, что ядро сперматозоида стремится занять центр активной (свободной от желтка) цитоплазмы.

При внутреннем оплодотворении (мышь) сначала происходит закоривание сперматозоида в оболочку яйцеклетки (*zona pellucida*, блестящая оболочка), а после – акросомная реакция (Рис). Сперматозоид ложится «бокком» на *zona pellucida* и взаимодействует рецепторами с лигандами этой оболочки яйцеклетки. В акросомной реакции млекопитающих участвует *проакрозин*, при взаимодействии с компонентами яйцеклетки он превращается в акрозин и способствует растворению мембраны яйцеклетки.

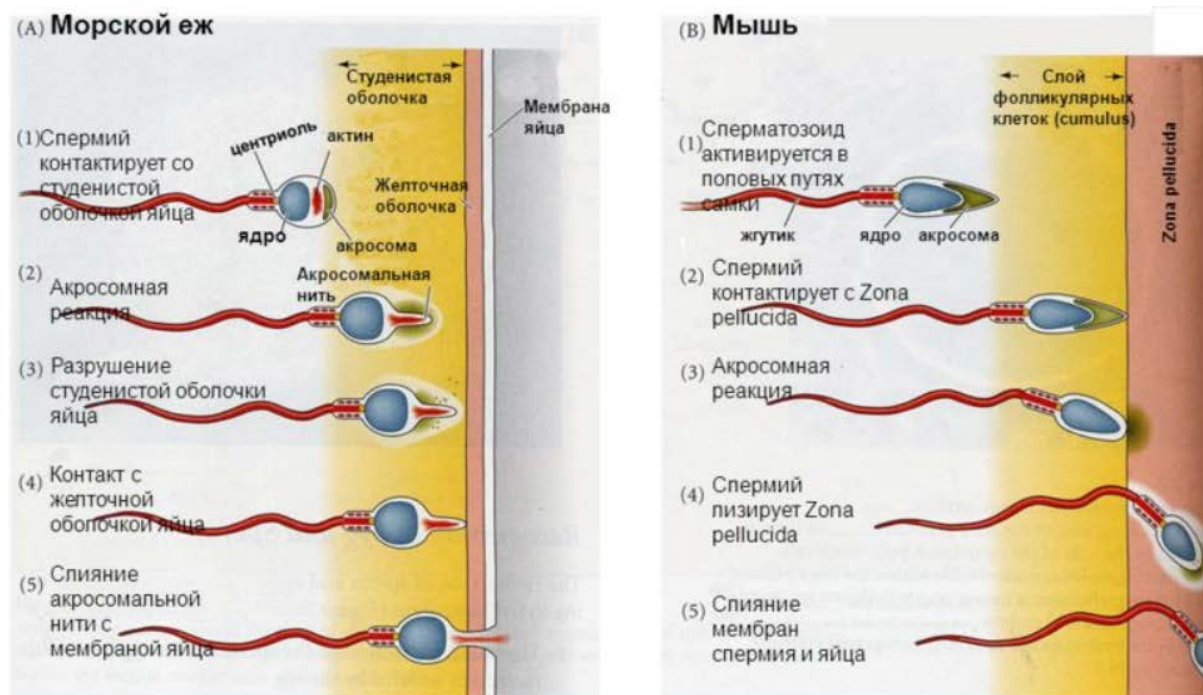


Рисунок 23. Контактные взаимодействия при оплодотворении яйцеклетки морского ежа и мыши.

Блестящая оболочка мыши имеет в составе три основных белка с одноименным названием: ZP1, ZP2, ZP3 (Рис.24). У других млекопитающих, включая человека, присутствует четвертый белок, ZP4. Два гликопротеина (ZP2 и ZP3), связываясь попеременно, образуют нити, которые соединены друг с другом «перемычками» из ZP1 и ZP4. Сахаридные части гликопротеинов ZP2 и ZP3 являются лигандами для связывания сперматозоидами, сахаридные части гликопротеинов видоспецифичны.



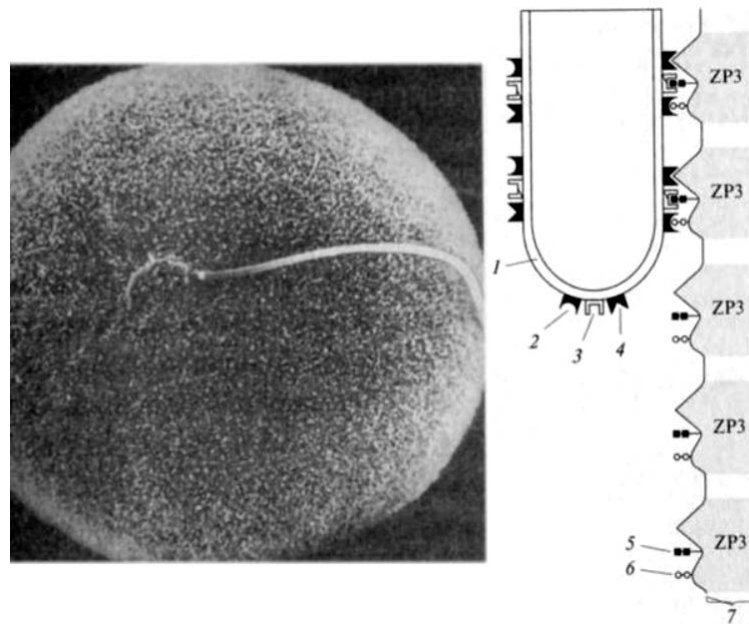


Рисунок 24. Контакт спермия с оболочкой яйцеклетки у млекопитающих. 1 – мембрана сперматозоида; 2 – рецептор галактозы; 3 – рецептор N-ацетилглюкозамина (галактозилтрансфераза); 4 – протеаза; 5 – N-ацетилглюкозамин; 6 – галактоза; 7 – zona pellucida (блестящая оболочка).

## Лекция 5. Дробление

### Дробление как последовательность митозов. Клеточный цикл

Дробление представляет собой создание многоклеточности путем следующих друг за другом митотических делений зиготы (или активированной яйцеклетки в случае партеногенеза).

Так как форма существования многоклеточных организмов является онтогенез, эукариотная клетка существует в постоянном цикле клеточных делений. При мутациях клетка не теряет способности к делению и становится подверженной процессам дарвиновской эволюции. Клеточный цикл «сочетает несочетаемое»: консервативность воспроизведения генетического материала, появление и закрепление новых признаков. Клеточные деления обеспечили существование всех клеточных форм жизни на Земле, даже возникновение линии половых клеток (мейоз – вариация митоза).

В основе клеточного цикла лежат два важных события: связанные с делением ядра (кариокинез) и цитоплазмы (цитокинез). Клеточный цикл был показан на оплодотворенной яйцеклетке млекопитающего. Известно, что овулировавшая яйцеклетка находится на стадии метафазы II. Второй блок мейоза удерживается фактором *MPF* (*maturation promotion factor*). Во время митоза уровень MPF очень высокий, а к синтетической фазе падает. Оказалось, что MPF регулирует не только созревание мейоза, но и митотическое деление (Рис.25). Когда этот MPF наиболее активен, некоторые факторы заставляют его удерживать ядро в «метафазном» виде (ядерная оболочка разрушена, хромосомы конденсированы, работают белки, осуществляющие движение в веретене). Выяснилось, что MPF состоит из двух субъединиц: малая субъединица – *протеинкиназа 2 (cdc2)*, и большая субъединица, *циклин В*. Активность киназы зависит от циклина, если циклин присутствует и активен, киназа работает и сохраняет «метафазное» состояние ядра. Киназа «разбирает» ламини оболочки ядра на пузырьки, действует на гистон I для конденсации хромосом и также действует на факторы, благодаря которым полимеризуются нуклеиновые кислоты. Циклин поддерживается активностью *цитостатического фактора* (или *CSF, P39*, считывается с гена *c-mos*). Во время оплодотворения происходит активация яйцеклетки, сопряженная с выходом в цитоплазму мессенджера IP3, осуществляющий подачу сигнала о выбросе ионов кальция. В свою очередь, под действием концентрации кальция разрушается цитостатический фактор, в следствие чего падает активность циклина, комплекс MPF разрушается. Таким образом, деление завершается, и клетка снова вступает в клеточный цикл.

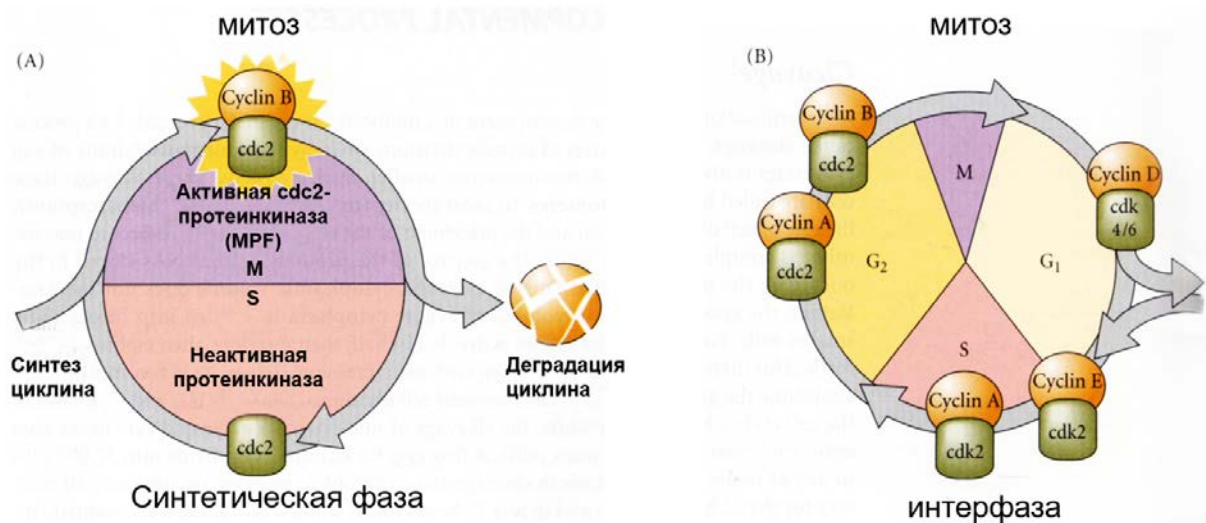


Рисунок 25. Синхронные (А) и асинхронные (В) стадии деления дробления.

Первыми многоклеточными можно считать вольвоциды (см. лекцию «Введение»). Простейшие вольвоциды (хламидомонады) размножаются путем митоза, *монотомического деления*, при этом перед делением клетка немного гипертрофируется. Далее в эволюционном ряду такая гипертрофия приводит к *палентомической* задержке и развитию двух и более клеток под общими оболочками. Начиная с 32-клеточной стадии начинается дифференцировка вследствие неравенства морфогенетических потенциалов клеток. Возникает прежде всего деление на смертные клетки сомы и бессмертные клетки зародышевого пути.

### Особенности делений дробления. Правила Гертвига-Сакса

Для делений дробления характерно отсутствие G1 и G2 фаз. Остается только синтетическая фаза и сам митоз. Субъединицы MPF, киназа и циклин, синтезируются в ооците в процессе оогенеза. Количество синтезированных компонентов определяет последующие первые деления зиготы. В дальнейшем цикл делений регулируется уже компонентами MPF, синтезированными с генома зародыша.

В результате дробления развивающийся эмбрион называется *бластула*, а клетки, возникающие в процессе дробления называются *бластомеры*. У большинства животных включение собственного генома зародыша происходит на этапе средней бластулы (*mid-blastula transition*). Именно с этого момента синтезируются и накапливаются белки организма, определяющие его дальнейший рост и дифференцировку. Так, например, если не включились гены, отвечающие за синтез белков и факторов, необходимых для гаструляции, зародыш погибнет при попытке бластулы «гаструлировать». Гаструляция – важный этап жизни зародыша, один из *критических моментов онтогенеза*. У млекопитающих собственный геном зародыша включается уже на двухклеточной стадии.

Этот момент также является критическим. Некоторая часть эмбрионов гибнет на этом этапе (зиготический геном не включился или работает с ошибкой).

Цитокенез (процесс деления цитоплазмы) происходит благодаря тубулину, создающему веретено деления, и микрофиламентарному *контрактильному сократительному кольцу*, осуществляющему стягивание мембраны в локализации деления (Рис.26). Во время цитокинеза выполняются некоторые правила. Во-первых, ядра делящихся клеток располагаются по центру активной цитоплазмы. Во-вторых, веретена деления стремятся расположиться на максимальном расстоянии друг от друга. В-третьих, контрактильное кольцо находится в перпендикулярной плоскости относительно линии, на которой располагаются веретена деления. Все яды, действующие на тубулин, например, цитохалазин В, колхицин или винбластин, не дают пройти митозу, разрушая микротрубочки (так можно получить искусственно многоядерную клетку).

### Правила Гертвига-Сакса:

- 1) Клеточное ядро стремится расположиться в центре активной, свободной от желтка цитоплазмы.
- 2) Веретено клеточного деления стремится расположиться по направлению наибольшего протяжения свободной от желтка цитоплазмы.

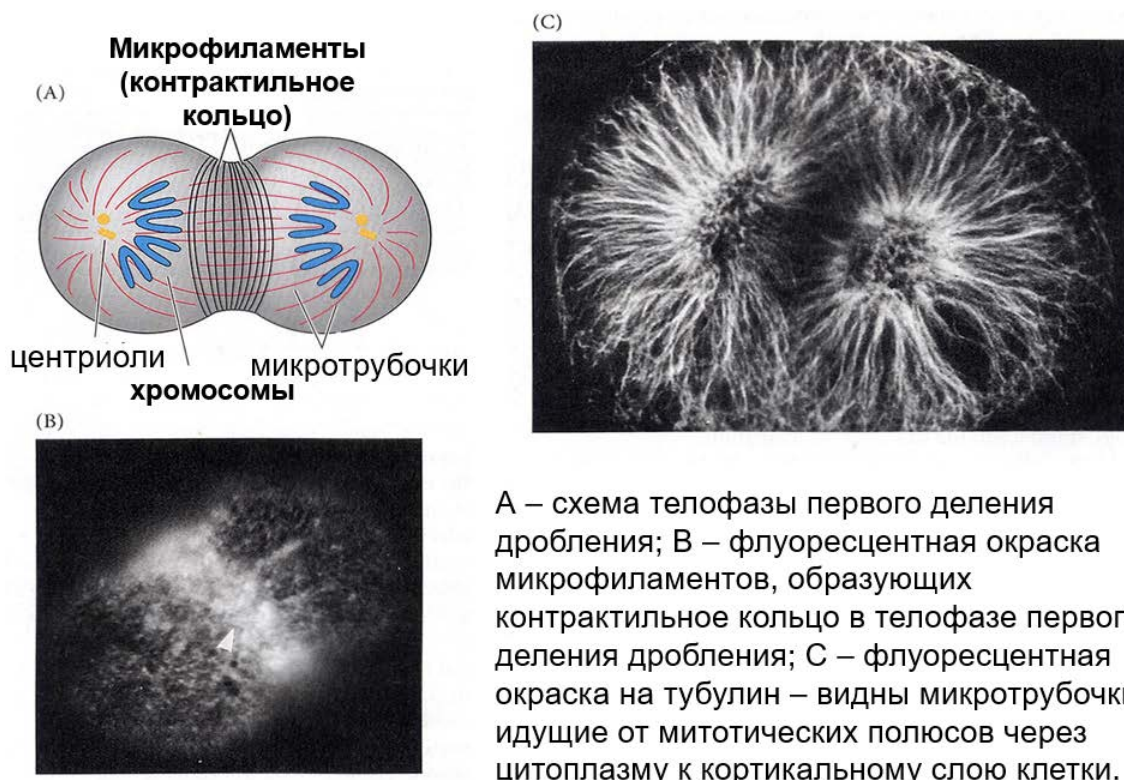


Рисунок 26. Клеточные деления дробления.

Из этих правил следует, что чем больше в яйцеклетке желтка, тем медленнее в нее врезается борозда дробления.

**По правилам Гертвига-Сакса возникла классификация типов яйцеклеток по количеству и типу распределения желтка:**

1. Полилецитальные (многожелтковые):
  - Телолецитальные (птицы, рептилии, костистые рыбы)
  - Центролецитальные (насекомые)
2. Мезолецитальные (со средним количеством желтка)
  - Телолецитальные - амфибии, осетровые рыбы
3. Олиголецитальные (маложелтковые)
  - Изолецитальные - черви, моллюски, иглокожие
  - Алецитальные (практически не содержат желтка) – плацентарные млекопитающие

## Типы дробления

1) Полное или голобластическое – борозды дробления разделяют зиготу полностью.

- Полное равномерное – получившиеся бластомеры одинаковые (изолецитальные яйцеклетки). Бластула, как правило, содержит полость (бластоцель, первичная полость тела), которая может образовываться уже со стадии двух бластомеров. Если дробление *радиальное* (каждая следующая борозда перпендикулярна предыдущей), возникает *целобластула*. Если дробление *спиральное* (каждое следующее деление направлено под углом  $45^\circ$  в противоположную сторону от предыдущего), возникает *стерробластула*, характерная для моллюсков.
- Полное неравномерное – бластомеры могут различаться по размерам (мезолецитальные яйцеклетки). Из-за различий в скорости врезания борозды, за время дробления на анимальном полюсе успевает сформироваться больше бластомеров, чем на вегетативном. Полость бластулы смещена к анимальному полюсу. В результате образуется *амфибластула*.

2) Неполное или меробластическое – обратный случай.

- Дискоидальное – дробление происходит на ограниченном участке анимального полюса, борозды дробления не проходят через желток (телолецитальный желток). Образуется *дискобластула*.
- Поверхностное – дробление, характерное для насекомых. Ядра делятся в центре клетки и расходятся к полюсам, образуя *синтициальную бластодерму*. Формируется *перибластула*.

## ДРОБЛЕНИЕ

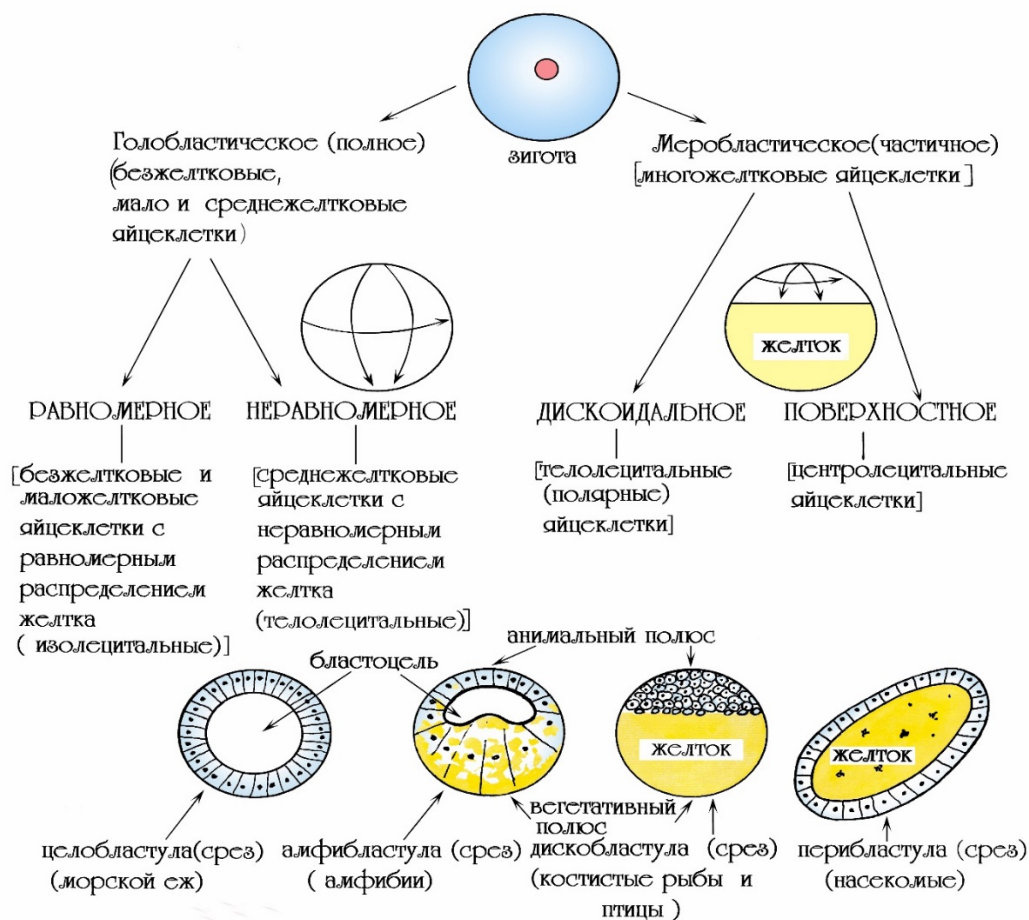


Рисунок 27. Схема различных типов дробления.

### Дробление млекопитающих

У млекопитающих наблюдается ситуация-исключение. Для них характерно полное дробление, при этом первая борозда всегда меридиональная, а затем начинается чередование (один из бластомеров делится по широтной оси, а другой - меридиональной). Несмотря на отсутствие желтка, развитие млекопитающих не сходно с развитием олиголецитальных яиц. В роли желтка в раннем развитии находится полость бластоцисты, в которую закачивается жидкость для тургора.

#### Раннее развитие человека (Рис.28):

Дробление у человека – полное, равномерное, асинхронное. Лучше развиваются эмбрионы с бластомерами одного размера, расположенными тетраэдрически.

На третьи сутки развития формируется многоклеточная *морула*, которая впоследствии претерпевает процесс *компактизации*, который, по сути, представляет собой эпителизацию.

- 1) *Некомпактная морула* (70-90ч) – много клеток, больше 8 (12, редко 16).
- 2) *Компактная морула* (90 – 110ч - компактизация) – появляются эпителиальные клетки. Признак эпителизации – полярность клеток. Эпителий в момент компактизации образует все возможные типы клеточных контактов, в том числе плотные.

Первая дифференцировка у млекопитающих происходит в момент дробления. При компактизации внешние клетки морулы образуют *трофэктодерму*, что также называют *трофобласт*. Из трофобласта впоследствии развиваются провизорные органы (хорион). Другой клеточный тип образует *внутреннюю клеточную массу*, *ВКМ* (не путать с внутриклеточной массой). Эмбрион на этой стадии называют *бластоцистой*. Бластоциста имитирует развитие на желтке, образуя сферу из жидкости внутри себя. Имеет два полюса – *эмбриональный* (на котором располагается ВКМ), *абэмбриональный*. Бластоциста не является бластулой. Бластула у человека возникает после имплантации на стадии зародышевого диска.

Образование полости внутри эмбриона млекопитающих – *кавитация*. Она происходит из-за повышения осмотического давления внутри компактной морулы. При высокой концентрации соли в полость начинает проникать вода, для осуществления этого процесса используются специальные мембранные поры, *аквапорины*.

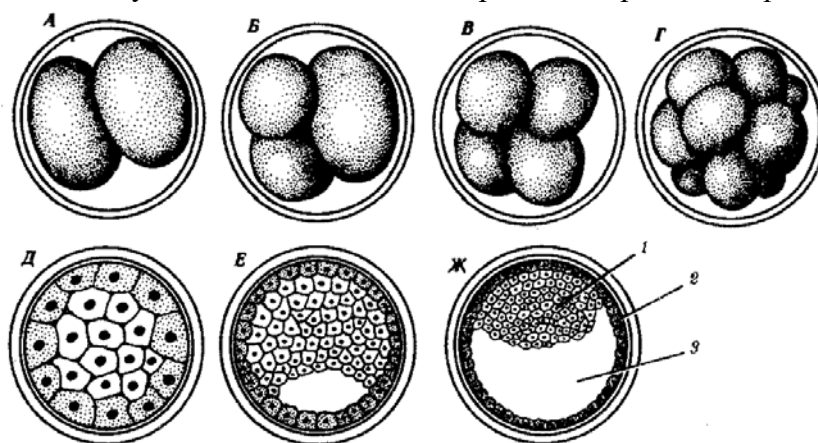


Рисунок 28. Дробление млекопитающих. А – два бластомера; Б – три бластомера; В – четыре бластомера; Г – морула; Д – разрез морулы; Е, Ж – разрез ранней и поздней бластоцисты: 1 – эмбриобласт, 2 – трофобласт, 3 – бластоцель.

# Лекция 6. Гастрuliaция

## Происхождение гастрuliaции

Гастрuliaция – «узловая точка развития» - важнейшая стадия раннего развития. На этапе гастрuliaции происходит первая дифференцировка у большинства организмов. До этого в периоде дробления происходили быстрые одинаковые деления без G-фазы. Для гастрuliaции характерно начало асинхронных делений у многих групп животных, так как именно в этот момент включается «зиготический» геном зародыша.

В филогенезе первые многослойные животные (гидры) имели два слоя ткани: поверхностный, эктодермальный и внутренний, энтодермальный. У более прогрессивных животных вследствие процесса гастрuliaции при взаимодействии экто- и энтодермы возникает третий слой (зародышевый листок), мезодерма. Пути дифференцировок зародышевых листков представлены на рис. Нужно отметить, что клетки половой линии зачастую не происходят из какого-либо листка, а обособляются на самых ранних этапах дифференцировки.

Стволовая клетка во время деления может воспроизводить саму себя без потерь. В определенный момент клетка специализируется, а выбор направления дальнейшей дифференцировки называется *комитация*. Комитированные клетки не обязательно впоследствии подвергнутся дифференцировке. Однако, если дифференцировка произошла, потенность не возвращается. Комитацию удобно рассматривать на т.н. «часах смерти». Если клетки, комитированные к апоптозу, пересадить в другую область, они могут продолжить жить. Если производить пересадку через разные промежутки, можно найти временную точку, когда пересадка не отменит клеточную гибель и апоптоз неминуемо произойдет. Комитация объясняется экспрессией определенных маркеров, которая еще не обозначает синтез белков и изменение морфологии и функции.

## Типы гастрuliaции

Типы гастрuliaции представлены на Рис.29. Во время гастрuliaции многих прогрессивных животных сочетаются несколько типов гастрuliaции и гастрuliaционных движений.

1) *Иммиграция* – у кишечнополостных. Описана Мечниковым, эволюционно более древний тип гастрuliaции. Некоторые клетки целобластулы теряют адгезивные контакты с соседними клетками и выселяются в бластоцель эмбриона. Может быть мультиполярной (из всех участков), биполярной или униполярной. При униполярной миграции клетки, выселение будущей энтодермы происходит в зоне бластопора (первичного рта).



2) *Деламинация* – появляется у более прогрессивных кишечнополостных, имеющих стадию морулы. Происходит расслоение – выравнивание слоев и образование базальной мембраны, отделяющей эктодерму от энтодермы, при этом клеточные перемещения почти отсутствуют.

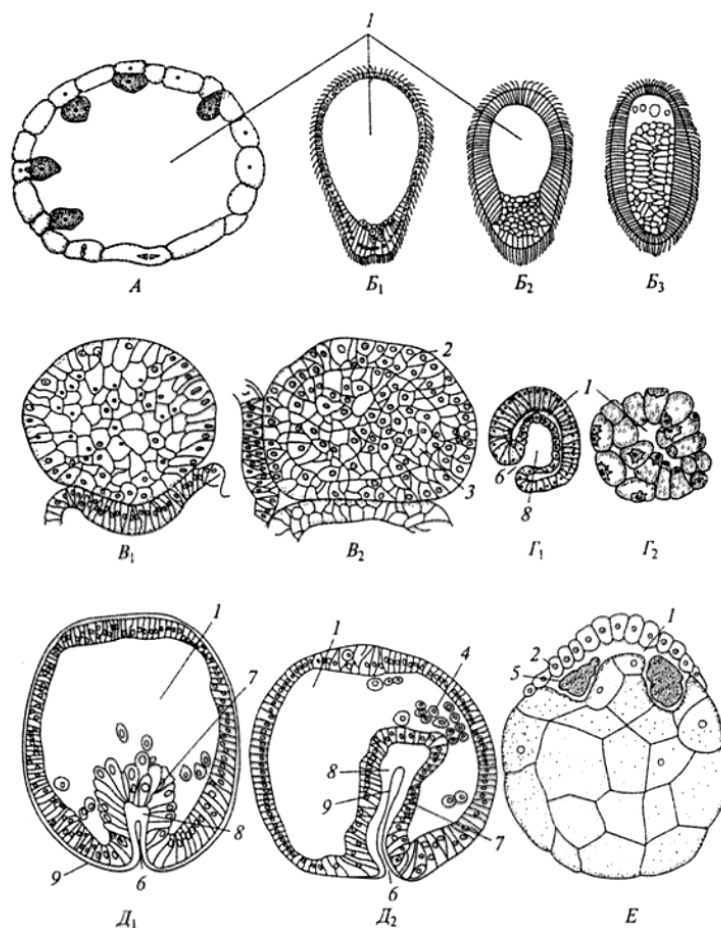


Рисунок 29. Типы гастрюляции и гастрюляционных клеточных движений. А – мультиполярная иммиграция; Б1-Б3 – последовательные стадии униполярной иммиграции; В1,В2 – деламинация у гидроидного полипа; Г1, Г2 – инвагинация у сцифомедузы; Д1,Д2 – последовательные стадии гастрюляции у морского ежа; Е – эпиболия у малощетинкового червя; 1 – бластоцел; 2 – эктодерма; 3 – энтодерма; 4 – эмбриональная мезенхима; 5 – целомическая мезодерма; 6 – бластопор; 7 – стенка архентерона; 8 – гастрюцель; 9 – гиалиновый слой.

3) *Инвагинация* — происходит путем впячивания вегетативной стенки бластулы в бластоцель целым клеточным пластом, не утратившим эпителиальной структуры; характерна для большинства групп животных. Полость вворачивания

называется гастроцелем, ведущее в нее отверстие – бластопор. Края бластопора называются губами.

4) *Эпиболия* – обрастание, вегетопетальные движения слоя на поверхности гастролы. Бывают случаи чисто эпиболической гастрюляции, когда впячивание невозможно. Например, у малощетинковых червей.

5) *Инволюция* — происходит вворачивание внутрь зародыша увеличивающегося в размерах наружного пласта клеток, который распространяется по внутренней поверхности остающихся снаружи клеток.

### Способы закладки мезодермы

1) *Телобластический* – у спирально-дробящихся животных, первичноротых. У таких животных можно проследить судьбу каждой клетки. В закладке каждого зародышевого листка участвует определенное количество клеток, и потеря любой из них скажется на развитии органа, в который должна была развиваться клетка. Два blastomera, производные blastomera 4d, которые называют *телобластами*, впоследствии образуют всю мезодерму зародыша.

2) *Энтероцельный* – энтодерма с включениями мезодермальных клеток вворачивается внутрь в составе первичной кишки. Впоследствии мезодерма отшнуровывается внутрь бластоцеля, а кишку формирует только энтодерма.

3) *Деламинационный* - расслоение впячивания первичной кишки на мезодерму и энтодерму.

4) *Пролиферационный* – наблюдается у иглокожих. Клетки иммигрируют внутрь бластоцеля и пролиферируют.

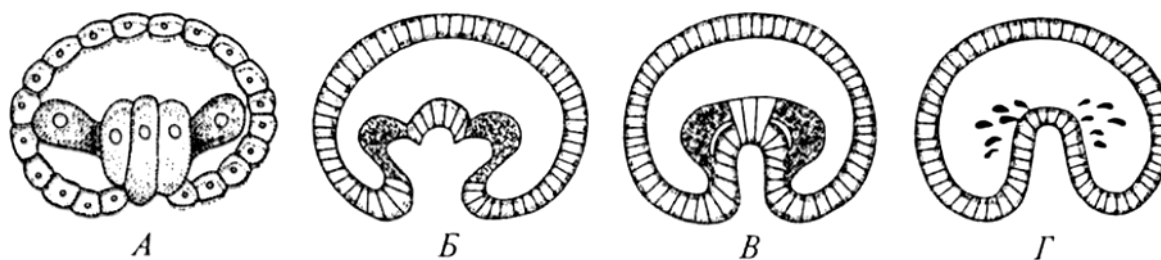


Рисунок 30. Способы закладки мезодермы (В.В. Малахов). А – телобластический, Б – энтероцельный, В – деламинационный, Г – пролиферационный. Густыми мелкими точками обозначены зачатки целомической мезодермы.

### Карта презумптивных зачатков амфибий

Карта презумптивных зачатков – формализованное описание пространственного расположения в раннем эмбрионе клеток или областей, которые в норме дают начало тем или иным частям организма. Гастрюляционные процессы удобнее всего рассматривать на примере земноводных, причем у хвостатых и бесхвостых амфибий присутствуют большие различия.

У хвостатых амфибий (тритон) все три зародышевых листка находятся на поверхности: крышу бластулы образует эктодерма, мезодерма опоясывает зародыш, а его дно образовано энтодермой. Инвагинацию инициируют так называемые *колбовидные клетки*, без которых невозможно начало гастрюляции.

В случае бесхвостых амфибий на поверхности находится только эктодерма, образующая верхнюю половину зародыша и энтодерма, образующая нижнюю половину. Образование мезодермы и другие гастрюляционные процессы происходят под покровом этих клеток (Рис). Спрятанная мезодерма носит название *внутренняя краевая зона*. Для гастрюляции бесхвостых амфибий характерна инвагинация (вворачивание) и эпиболия (обрастание). В районе внутренней краевой зоны отмечаются клетки, маркированные геном *Cerberus*, которые формируют глоточную энтодерму. Они первыми будут мигрировать при гастрюляционной инвагинации. За ними тянется участок клеток, экспрессирующий ген *Goosecoid*, так называемая *головная мезодерма*. Последним вворачиванию подвергается участок *хордомезодермы*, экспрессирующий ген *Xbra* (brachyury of хепорус), задействованный в эмбриональной индукции. У бесхвостых амфибий, как и у хвостатых, присутствуют колбовидные клетки, однако они не являются «локомотивом» гастрюляции. В случае бесхвостых амфибий роль играет *вегетативный поворот*. В результате этого поворота описанные выше участки зародыша подвергаются инвагинации через бластопор и перемещаются внутрь гастрюлы с образованием так называемой *щели Браше*. В результате инвагинации возникает вторичная кишка. Завершается гастрюляция формированием *желточной пробки*.

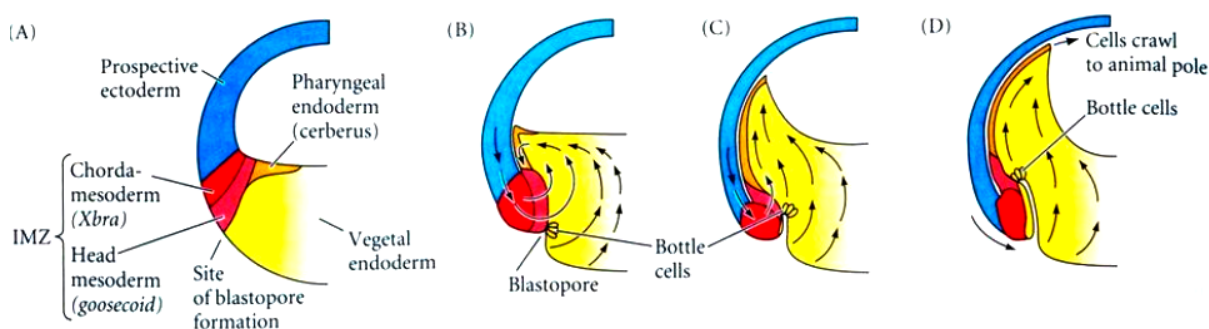


Рисунок 31. Гастрюляция у бесхвостых амфибий.

# Лекция 7. Нейруляция

## Понятие нейруляции. Нейруляция курицы

Нейруляция – стадия развития, в результате которой определяется комплекс осевых структур зародыша. В комплекс осевых структур входит нервная система, хорда, осевая мезодерма и кишка. Возникает у кольчатых червей и членистоногих, характерна также для всех хордовых и позвоночных.

Основа нейруляции – формирование нервной системы. Именно этот этап дал название всему процессу. ЦНС имеет эктодермальное происхождение. Образование нервной системы из эктодермы происходит под индукцией хордомезодермы.

Рассмотрим гаструляцию курицы (Рис.32). На поверхности зародыша обособляются клетки *первичной полосы*. Эти клетки выделяют ростовой фактор FGF8, который комитирует клетки эктодермы к образованию нейральной ткани. Ростовой фактор формирует способность клеток эктодермы воспринимать сигналы хордомезодермы, такие как *фоллистатин*, белки *noggin* и *chordin*. Также эти сигналы помогают блокировать индукционную активность вентральной эктодермы (обусловлена BMP4), которая должна в будущем образовать покровную эктодерму.

Клетки эктодермы из уплощенных становятся столбчатыми благодаря изменению структуры микротрубочек. В апикальной части столбчатой клетки присутствует сократительное микрофиламентарное кольцо, которое может осуществлять так называемый *кисетный эффект*. При этом апикальная часть клетки сужается. Цитохалазин может отменить кисетный эффект, так как при его воздействии разрушаются микротрубочки.

На поверхности эмбриона курицы формируется выступающая часть – *медуллярные валики* или *нервный гребень*, которые очерчивают границу пластинки от покровной эктодермы. По центру пластинки располагается *медуллярная точка перегиба*, вокруг нее клетки укрепляются в подлежащем слое, а сама она углубляется, образуя желоб. Медуллярные валики закладываются как эктодермальные образования, однако попав под покровы организма, они приобретают мезенхимальную структуру. Впоследствии мезенхима медуллярных валиков участвует во многих процессах: формирует головную мезенхиму, компоненты некоторых эндокринных желез, всю пигментную систему организма (рисунок покровов животных), нервные ганглии.

Располагающиеся по сторонам от желобка клетки формируют *дорзальные точки перегиба* сходным образом, что и медуллярную. Медуллярные валики отделяются от пластинки и освобожденная ткань пластинки смыкается, образуя трубку. Всего при смыкании участвуют три точки перегиба. Медуллярные валики при этом остаются

сверху. Нервная трубка в переднем отделе образует отделы головного мозга, а в заднем – спинномозговой канал.

Медуллярные валики могут отделиться от ткани нервной пластинки благодаря потере адгезивной способности. Так, ранее в этом процессе участвовали кадгеринны, удерживающие клетки вместе, а в момент отделения валиков эта связь теряется. В то же время в нервной трубке наоборот появляются кадгериновые контакты, благодаря которым два конца смыкающейся трубки могут срастись. Финальным процессом нейруляции является нарастание поверхностной эктодермы на закрывающуюся трубку.

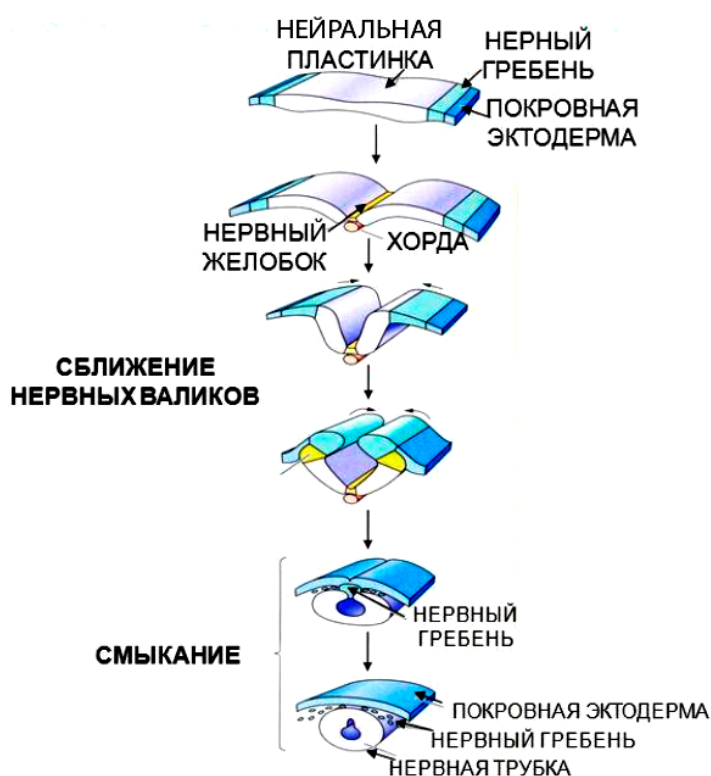


Рисунок 32. Нейруляционные процессы у птиц.

Нейруляция (как и гастрюляция) представляет собой критическую точку развития. Не закрытая или не до конца закрытая нервная трубка – достаточно часто встречающаяся аномалия. Беременным помогает фолиевая кислота. Если трубка не закрывается совсем – это летальная патология развития.

## Нейруляция лягушки

Для многих процессов в развитии позвоночных, в том числе и нейруляции характерно развитие по *кранио-каудальному градиенту*. Это означает, что развитие головных структур опережает развитие органов нижнего отдела тела.

Нейруляция лягушки представлена Рис.33. Для нейруляции лягушки характерна особенность: смыкание нервной трубки начинается не с головного отдела, а на границе туловищного и переднеголовного отдела мозга. Далее смыкание идет в обе стороны от точки первоначального смыкания. Обычно смыкание не завершается до конца, оставляя открытым *передний и задний нейропоры*. В зоне бластопора возникает хвостовая почка из мезенхимы вокруг нейрокишечного канала.

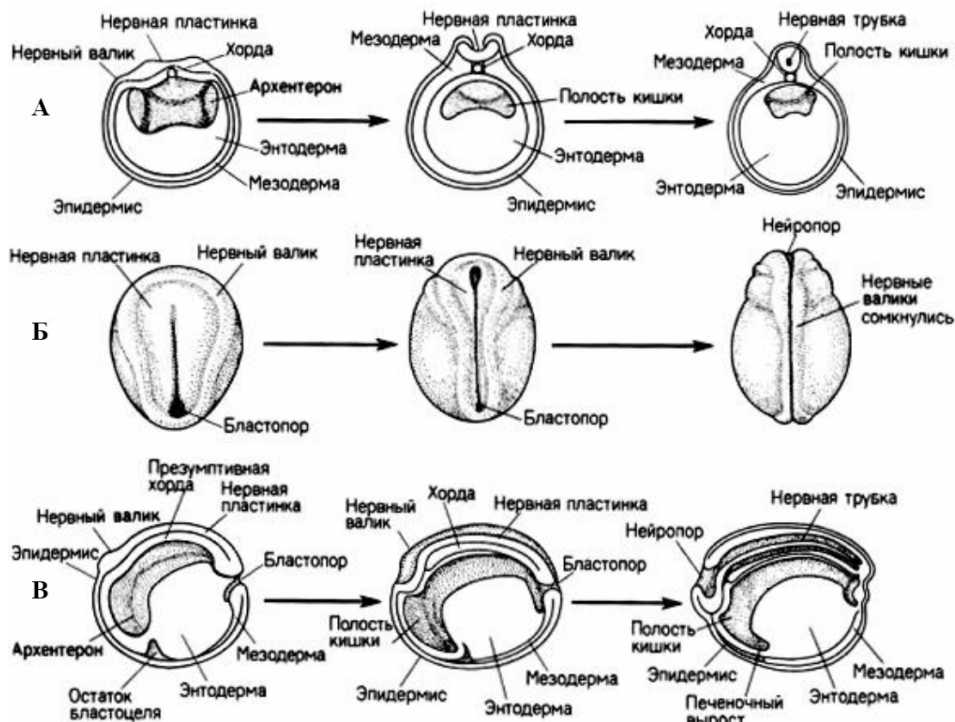


Рисунок 33. Нейруляция амфибий.

*Первичная нейруляция* – от стадии нервной пластинки, далее через образование желобка, к смыканию нервной трубки. Протекает в головном отделе. Есть у всех животных. *Вторичная нейруляция* – протекает в хвостовом отделе. Не формируется пластинка, а плотный тяж клеток. В таком случае не формируется канал нервной трубки путем смыкания. Просвет канала формируется путем апоптотической гибели клеток в центре тяжа.

## Сегментация мезодермы

Процесс сегментации мезодермы протекает по-разному у разных животных. Для первичноротых характерна закладка всех трех пар мезодермальных сомитов одновременно (*личиночная* или *лярвальная мезодерма*). При этом *туловищная мезодерма* нарастает последовательно от головного к хвостовому концу.

У вторичноротых (до миног) механизм схожий, но существуют отличия. Вместо одновременно закладывающихся сомитов лярвальной мезодермы происходит одновременная закладка трех пар сомитов *головной мезодермы*. Туловищная мезодерма закладывается вышеописанным образом.

Явление различающиеся закладки мезодермы у одного животного называется *гетерономной метамерией*.

## Гены сегментации

В яйцеклетке насекомых присутствуют материнские гены, влияющие на разметку сегментов тела взрослого организма (Рис.34). В яйцеклетке по микротрубочкам от минус конца к плюс концу движется моторный белок кинезин, несущий продукт гена *caudal*, в то время как от плюс конца к минус концу движется динеин, несущий продукт гена *bicoid*. Эти белки взаимно ингибируют друг друга. Белок *bicoid* откладывается на головном конце, а *caudal* на заднем. Накопленный *bicoid* принимает участие в сегментации мезодермы. Так *bicoid* вызывает экспрессию зиготических *генов GAP*. Главный ген *GAP*-группы – *hunchback*, его экспрессия активирует ген *cruppel*, который ингибирует *hunchback*. В свою очередь, *cruppel* активирует экспрессию *knirps*. Активированный *knirps* ингибирует *cruppel*. Ген *knirps* в свою очередь активирует экспрессию гена *giant*. Аналогично, его экспрессия тормозит синтез РНК с предыдущего гена. Такая цепочка последовательной активации и ингибирования экспрессии позволяет создать генную разметку яйцеклетки.

Гены *GAP* в свою очередь активируют *гены двойного правила*. Самый важный ген этой группы – *fushi tarazu*. Экспрессия данного гена локализуется в семи широких полосках, разделяющих яйцеклетку. Впоследствии активируются *гены сегментной полярности*. Эти гены экспрессируются по краю семи полосок, образованных экспрессией генов *GAP*. Слева от полоски экспрессируется *wingless*, а справа – *engrailed*.

Все сомиты зародыша кольчатых червей одинаковы, в то время как сомиты членистоногих различны в разных отделах тела. Отличие сомитов друг от друга обусловлено *группой гомеозисных генов* или *гомеобокс-содержащих генов, HOX-гены*. Эти гены расположены кластером (занимают определенную часть хромосомы). Их экспрессия происходит на очень ранних этапах развития. Также эти гены помечены конструкцией, содержащей 180 п.о., так называемый *гомеобокс*, белок – *гомеодомен* (60 аминокислот). Гомеобокс-содержащие гены очень консервативны. Эти гены встречаются не только у метамерно устроенных животных, но и даже у одноклеточных (дрожжи).

Генная разметка предвосхищает клеточную дифференцировку, так как отдельных клеток нет, существует только синцитий. Если происходят нарушения развития, то чем на более ранней стадии они произойдут, тем опаснее патология.



Рисунок 34. Работа генов сегментации.



## Лекция 8. Эмбриональная индукция

### Исследование эмбриональной индукции. Образование глаза

Теорию эмбриональной индукции разработал в своей лаборатории немецкий ученый **Ганс Шпеман** и его коллеги супруги **Хильда и Оскар Мангольд**. Он придерживался теории, что не весь онтогенез predetermined заранее, а скорее он представляет собой цепь последовательных событий, где есть *определяющий* и *определяемый морфогенезы*. В то время популярным методом являлась микрохирургия, такой подход называется казуально-аналитическим.

Сначала ученые работали на глазах хвостатых амфибий (тритон). Глаз представляет собой боковой вырост промежуточного мозга, так называемый *глазной пузырь* (Рис.35). Когда такой вырост достигает покровного эпителия, пузырь начинает прогибаться внутрь, образуя форму чаши, так называемый *глазной бокал*. Вокруг зачатка глаза находятся мезенхимные клетки. Глазной бокал в свою очередь влияет на поверхностный эпителий, который утолщается, образуя *хрусталиковую плакodu*. Впоследствии хрусталик углубляется, а поверхностный эпителий позже образует роговицу. Внутренняя часть глазного бокала становится сетчаткой, а внешний – пигментными клетками. Таким образом, в образовании глаза участвует нейральный и эктодермальный зачатки. Сходным образом формируются зачатки слуховых органов.

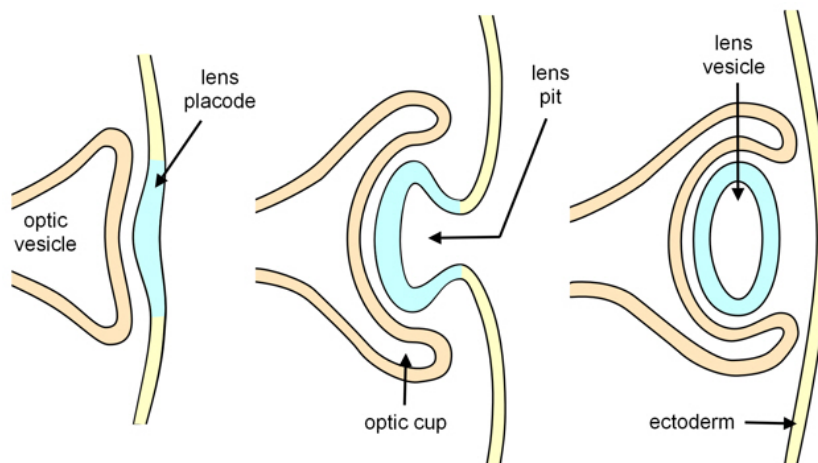


Рисунок 35. Индукция при формировании глаза.

### Опыты Шпемана по изучению эмбриональной индукции

Ганс Шпеман удалял хрусталиковый пузырек из глазного бокала, и оказывалось, что хрусталик повторно развивается под индукцией нейральной ткани. Если в опыте

удалялся глазной бокал, но хрусталик не развивался. Один из важнейших опытов Шпемана – пересадка глаза под эпителий эмбриона тритона на стадии хвостовой почки в туловищную область. Там пересаженный глазной бокал также вызывал образование хрусталика из поверхностной эктодермы. Таким образом была показана *эмбриональная индукция*.

После получения интереснейших результатов индукции формирования компонентов глаза, ученый обратил внимание на более ранние стадии развития. Следующие опыты Шпемана связаны с пересадкой. Брали эктодерму в любом месте зародыша и пересаживали в другую область реципиента. Эктодерма формировала не те структуры, которые должна была по сценарию в донорском организме, а те, которые в этой области реципиентного организма должны были бы образоваться из эктодермы. Так, фрагмент нейроэктодермы с переднего конца ранней гаструлы дает головные структуры, с среднего участка – туловищные, а с заднего – хвостовые. Таким образом, зародыш регионализован. Его участки соответствуют структурам взрослого организма.

В классическом опыте Шпемана (Рис.36) брали участок дорзальной губы бластопора (зона гаструляции) и пересаживали на противоположный этой области участок другого эмбриона. Впоследствии развитие мезодермы и осевых структур происходило на обоих полюсах зародыша. За свои опыты Шпеман был удостоен нобелевской премии.

Таким образом, Шпеман пришел к выводу, что в зародыше существует разделение ролей структур на «ведущие» и «ведомые». При этом онтогенез есть цепь событий, где происходит взаимодействие ведущих и ведомых структур и нарастание порядка дифференцировок. Так, губа бластопора является индуктором образования мезодермы и дальнейших процессов развития, а в свою очередь вырост мозга индуцирует хрусталик из эктодермы, который впоследствии индуцирует развитие роговицы. Данная концепция легла в основу *«теории эмбриональной индукции»*. Дорзальная губа бластопора, возникающая на этапе формирования основных эмбриональных листков, является *первичным организатором*, что означает, что он задает вектор развития всему остальному онтогенезу, по ходу которого определяются организаторы второго, третьего и далее порядка.

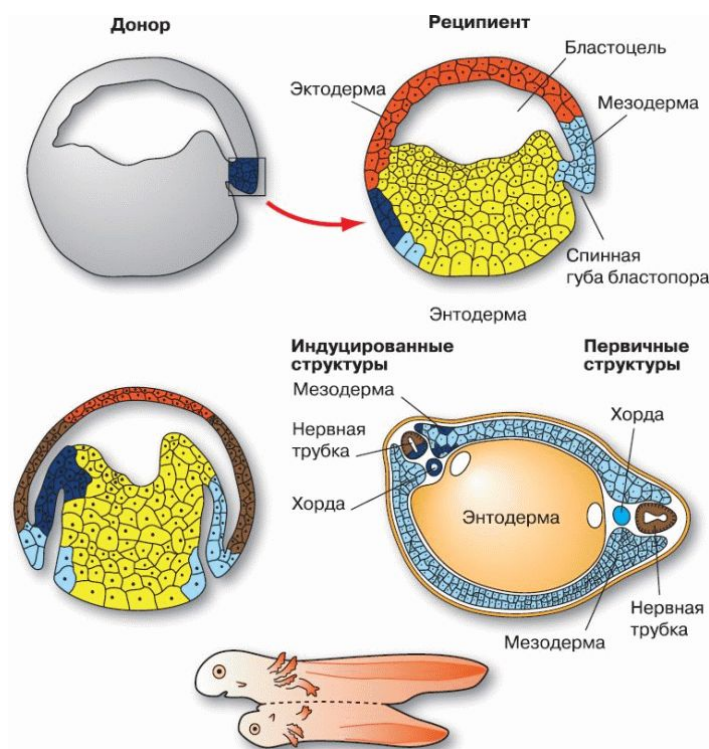


Рисунок 36. Опыты Шпемана по пересадке дорзальной губы бластопора.

## Первичный организатор, организатор Ньюкупа

Нидерландский ученый, **Питер Ньюкуп**, поставил следующий эксперимент. Он удалил весь хордо-мезодермальный пояс зародыша амфибии и получил анимальное (презюмтивная эктодерма) и вегетативное (презюмтивная энтодерма) полушария.

Анимальное полушарие при раздельном культивировании давало покровный эпителий, а вегетативное – в производное энтодермы, без дальнейшего развития. Однако при сращивании анимального и вегетативного полюса происходило восстановление первичного организатора и хордо-мезодермального зачатка. Это происходило из-за того, что презюмтивная эктодерма формировала утраченные структуры под индуцирующим действием энтодермы. Таким образом, Ньюкуп показал, что еще до дорзальной губы, названной первичным организатором, существует что-то, предопределяющее развитие. Такой организатор, как было показано Ньюкупом, спрятан в самой дорзальной области вегетативного полюса зародыша, в бластомерах хвостовой части. Такой организатор назвали организатором Ньюкупа, а дорзальную губу бластопора оставили организатором Шпемана. Ньюкуповский организатор представляет собой более обширную область, внутри которой в особом участке уже формируется Шпемановский организатор. Действие шпемановского организатора: дорзализация мезодермы, разделение ее

материала на хорду и комплекс осевых структур, что впоследствии вызывает нейтрализацию эктодермы.

## Механизм эмбриональной индукции

Можно достаточно рано проследить белки-маркеры формирующейся ткани. Однако их экспрессия является необходимым, но не достаточным фактором дифференцировки. Например, если взять клетки ранней бластулы, которые по карте презумптивных зачатков должны образовать покровную эктодерму и экспрессируют необходимые белки, и подложить под нее дорзальный индуктор, то в конечном итоге будут развиваться нейральные структуры. Такое развитие займет немного больше времени, чем из той ткани, которая изначально должна была стать нервной, из-за того, что ткани необходимо время для остановки экспрессии белков, отвечающих за развитие покровной эктодермы и включения экспрессии белков нейроэктодермы.

Чем обусловлено действие индуктора? Ученые предположили, что необходим прямой контакт клеток. Так, в случае формирования глаза, необходим контакт клеток глазного бокала и эктодермы для формирования хрусталика. Однако, когда поставили микропоровый фильтр, не дающий формироваться клеточным контактам, индукция все равно происходила. Если использовать пластинку без пор, индукция не происходит. Это показало, что из индуктора через поры фильтра проходят некоторые вещества, вызывающие изменения. Долгое время ученые занимались поиском таких веществ, однако для своего времени методы, которые они использовали, были слишком грубы. Эти вещества находятся в зародыше в микроконцентрациях.

Индукция может быть двух видов: инструктирующая (у отвечающей структуры есть возможность выбора) и перmissive (работает как триггер, сигнал к дифференцировке, а путь не важен). Индуктором может быть одна клетка, а индуцируемая область может быть во много раз больше.

## Поворот оплодотворения. Образование серого серпа

Несмотря на то, что Ньюкуп и Шпеман открывали индукционные процессы на этапах бластулы и гастролы, уже на стадии зиготы можно увидеть зону будущего формирования организатора (Рис.37). В процессе оплодотворения сперматозоид проникает в яйцеклетку примерно на семидесятой северной параллели, в ту часть клетки, где расположена кортикальная цитоплазма. В клетку также попадает центриоль сперматозоида, которая способствует его продвижению вглубь клетки в противоположную клетку. Вследствие этого процесса происходит смещение кортикальной цитоплазмы на величину угла, которую образует точка вхождения сперматозоида к горизонтальной оси. На противоположной стороне яйцеклетки

образуется так называемая *область серого серпа*. В ней происходит накопление материнского бета-катенина, который участвует в формировании ньюкуповского центра. Бета-катенин инактивируется при помощи GSK-3 во всех областях яйцеклетки, кроме области серого серпа, так как в этот момент там активен белок *dishevelled*, ингибирующий GSK-3.

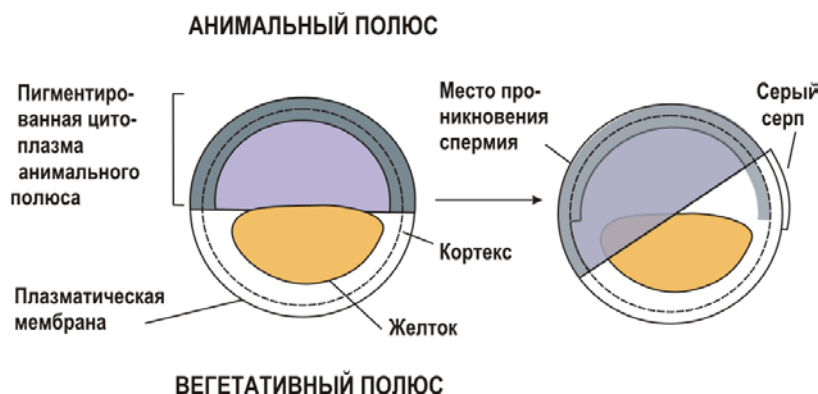


Рисунок 37. Поворот оплодотворения. Образование серого серпа.

Область серого серпа очень важна для дальнейшего развития. Другой нобелевский лауреат, Гердон, удалял серый серп и развитие протекало только до бластулы, а затем останавливалось. Показано, что клетки ньюкуповского организатора содержат материал серого серпа.

### Роль материнских белков в индукционных процессах

В вегетативной части бластулы концентрируются белки VegT и Vg1 (Рис.38), а бета-катенин в области серого серпа. При этом выстраивается градиент Nodal-белков (Xnr). Зона пересечения экспрессии бета-катенина с VegT и Vg1 при высокой концентрации градиента Nodal-белков образует ньюкуповский организатор. Там, где остается только экспрессия VegT и Vg1 и снижается концентрация градиента Nodal-белков, происходит формирование мезодермы. В области ньюкуповского организатора есть область экспрессии белка *gooseoid* и подобных. Активация белка *gooseoid* происходит под действием белка  *siamois* , который в свою очередь активируется двумя белками – бета-катенином и TCF3. При этом TCF3 сам по себе ингибирует *gooseoid*, однако в компании с бета-катенином он имеет активирующее действие.

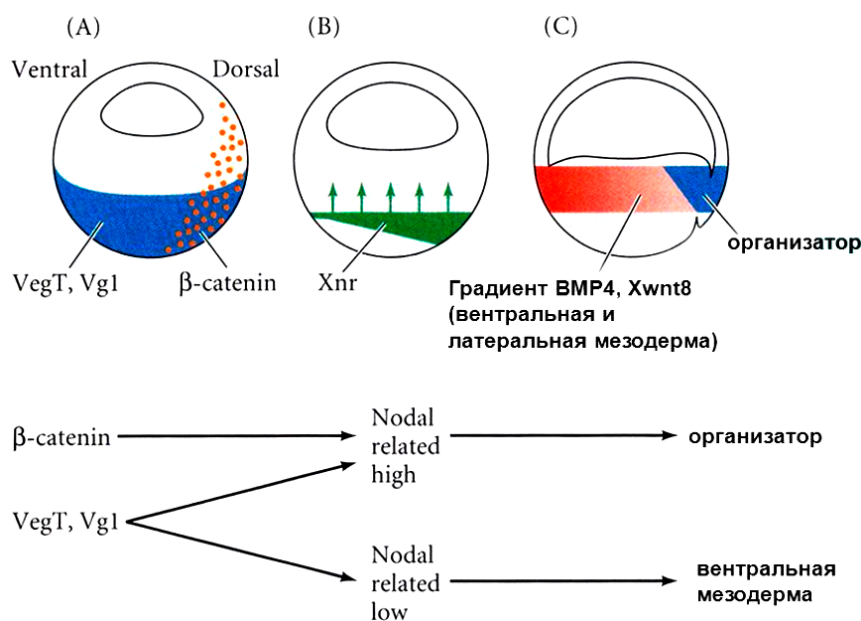


Рисунок 38. Градиенты экспрессии генов эмбриональной индукции в зародыше лягушки.

На Рис.39 представлена поздняя гастрולה. Красная область – локализация продуктов дорзальной губы бластопора. Крайняя левая область соответствует головным структурам и экспрессирует dickkop, cerberus и FRZB. Правее экспрессируются белки туловищных структур, hordin, follistatin и noggin. Справа налево (в каудально-краниальном направлении) распространяется градиент молекул ретиноевой кислоты и факторов роста фибробластов. Их экспрессия будет специфицировать локальный ответ эктодермы на действие индуктора и образование необходимого отдела нервной трубки. Все перечисленные белки не дают зоне формирования нервной трубки вегетализоваться под действием BMP-белков (основным является BMP4). Эти белки способны индуцировать образование покровного эпителия из нервной системы. Вышеперечисленные белки ингибируют белки группы BMP. Такое взаимодействие (достижение эффекта путем ингибирования экспрессии определенных генов) называется *индукция по умолчанию* или *дефолтная индукция*. Шпемановская индукция также относится к типу дефолтной.

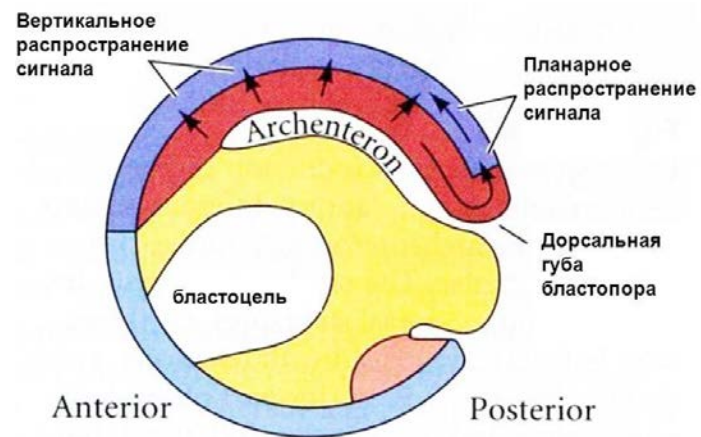


Рисунок 39. Поздняя гастрюла лягушки. Взаимодействие эктодермы и мезодермы.

## Лекция 9. Органогенез

### Ранний органогенез

В органогенезе выделяют нейруляцию, гистогенез и развитие органов. В процессе нейруляции возникает комплекс осевых структур, задающих координаты развития организма, а после происходит усложнение и дифференцировки в конечные ткани и органы.

Далее следует описание зародыша на стадии, представленной на Рис.40. Главная ось организма – хорда. Над ней располагается нервная трубка, которая в переднем отделе образует изгиб. В переднем конце трубки начинает формироваться мозг и возникают его отделы: *telencephalon* (передний мозг), *diencephalon* (промежуточный мозг) и образующийся в изгибе *mesencephalon* (средний мозг). Изгиб индуцируется концом хорды, поэтому если удалить ее участок, изгиб сформируется в новой области переднего конца хорды. Под хордой располагается кишка, которая в головной области образует печеночный вырост. В заднем отделе тела кишка сливается нервной трубкой, образуя нейро-кишечный канал. Нейро-кишечный канал впоследствии участвует в образовании почки. Под кишкой в переднем отделе тела формируется сердце, между кишкой и хордой – аорта. По бокам от хорды располагаются сомиты, которые ножками соединены с вторичной полостью тела.

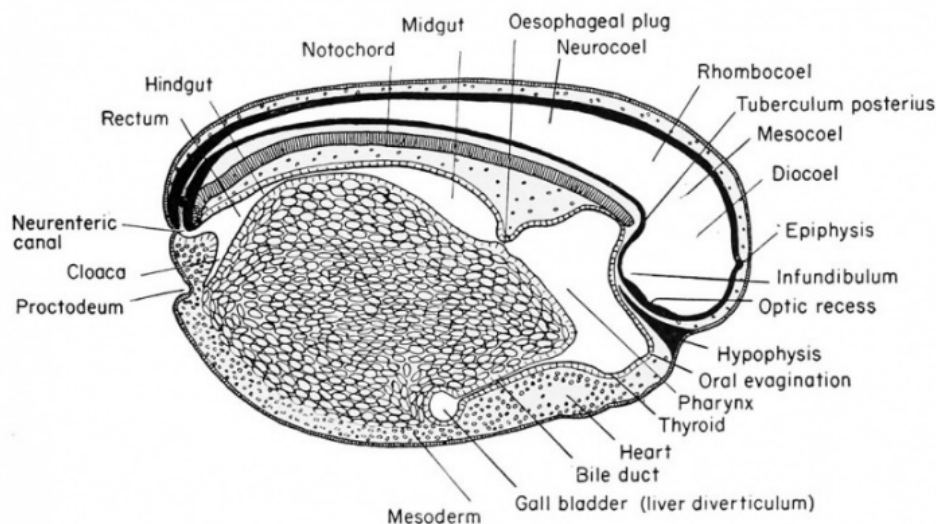


Рисунок 40. Эмбрион лягушки на начальных стадиях органогенеза.

Далее мозг начинает усложняться, *telencephalon* формирует полушария мозга, отростки *diencephalon* дают глазные и слуховые выросты, эпифизарный комплекс, а также воронку, которая с карманом Ратке образует адено и нейрогипофиз. В



*mesencephalon* на всю жизнь сохраняется мерцание в виде Сильвова водопровода. Кишечная трубка дает все производные энтодермы, в том числе легкие. Каждый сомит впоследствии образует особые структуры. Прилежащие к нервной системе части сомита дадут *склеротом*, прилежащие к хорде – *миотом*, а к эктодерме – *дерматом*. Ножки сомитов дают *нефрогонатом*.

### Оси эмбриональной конечности

В качестве примера для изучения органогенеза удобно рассмотреть развитие конечности. У позвоночных животных две пары различающихся конечностей, при этом у этих конечностей свои оси и симметрии. У конечностей присутствует *проксимодистальная ось* (от плеча к пальцам), *антерио-постериорная ось* (от большого пальца к мизинцу) и *дорзо-вентральная ось* (от ногтей к подушечкам пальцев). Также конечность анатомически расчленена. Базальная часть конечности, *стилопод*, прилежит к туловищу и образует собой плечо в случае передней конечности и бедро в случае задней (Рис.41). Дистальнее располагается *зейгопод*, образующий локтевую и лучевую кость в случае передней конечности, и большую и малую берцовую в случае задней. Затем идет кисть, запястье и пальцы, так называемый *аутопод*. Конечности всех наземных позвоночных имеют такое строение, все модификации (крылья птиц, роющие конечности крота, лапы подводных млекопитающих) не вносят существенных изменений в строение конечности, гомологию легко проследить.

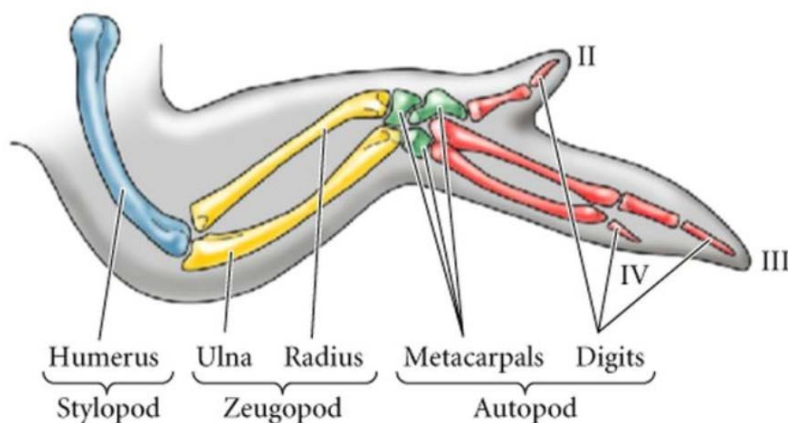


Рисунок 41. Составные части конечности наземных позвоночных животных.

При внешнем рассмотрении зародыша амфибии можно увидеть место, где будет закладываться конечность (за жабрами). На уровне от третьего-шестого сомита до восемнадцатого область компетентна к образованию конечности при индукционном воздействию. На Рис.42 представлена схема передней конечности. Зеленая область

станет антериорной частью конечности, розовая – постериорной, сверху будет дорзальная, а снизу – вентральная, в сторону смотрящего будет расти дистальная часть. При формировании структур существует последовательность событий: спецификация, детерминация, дифференцировка. Если до стадии детерминации перемешать клетки в зачатке (а также удалить часть или разрезать пополам), все равно образуется нормальная конечность, так как произойдет эмбриональная регуляция. Таким образом, существует область, компетентная к образованию всей конечности.

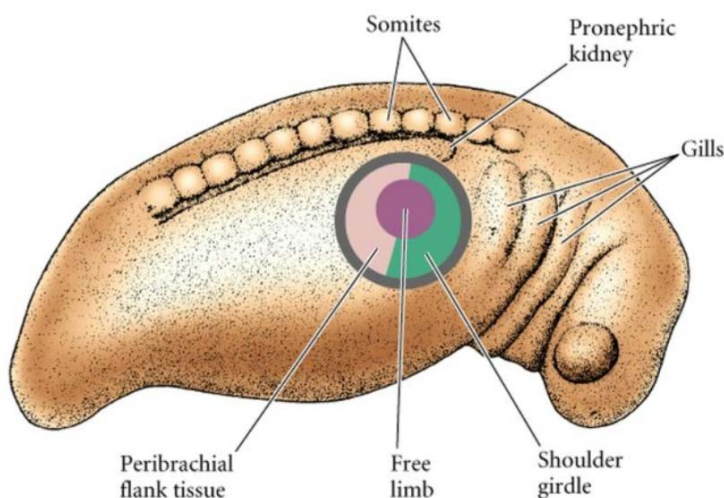


Рисунок 42. Полярность почки конечности зародыша амфибии.

### Индукция при образовании конечности

Американский ученый, **Росс Гаррисон**, исследовал область, в которой могут образовываться конечности в эмбрионе. Он проводил множество исследований индукции, так он индуцировал образование конечности путем пересадки зачатка глаза, или путем отведения нерва в компетентную область. Гаррисон выявил, что существуют два центра формирования конечности, передний (передняя конечность) и задний (задняя конечность). Так как между ними находилась область, компетентная к образованию конечности, Гаррисон пробовал индуцировать ее образование на всей протяженности этого промежутка. В результате этих опытов обнаружили область, при индуцировании которой происходит образование конечности, которая наполовину передняя и наполовину задняя. В случае птицы можно получить конечность, в которой на дорзальной стороне будут формироваться перья, а на вентральной – чешуя.

В США был случай обнаружения большого количества лягушек с несколькими парами задних конечностей. Фермеры решили, что проблема связана с экологией, так как до этого использовались высокие концентрации пестицидов. Оказалось, что виной

всему паразит-трематода, который поражает головастика и в том месте, где должны формироваться задние конечности, они выпускают дозу ретиноевой кислоты, которая является сильным морфогеном. Ретиноевая кислота вызывает индукцию формирования нескольких пар конечностей. Трематодам это необходимо для смены хозяина. Конечный хозяин паразита – водоплавающая птица, для которой лягушки с дефектом становятся более легкой добычей.

## Этапы развития конечности

Сначала образуется почка конечности. Это бугорок, покрытый эктодермой, формирующийся под пронефросом. Он образован мезенхимой, которая движется со стороны париетального листка боковой мезодермы. Если вернуться на более ранний этап, гастролу, и проследить градиент концентрации морфогена ретиноевой кислоты, можно увидеть, что концентрация более низкая в головной области и более высокая в хвостовой. Локализация будущей конечности маркируется ретиноевой кислотой, границы обозначаются экспрессией генов групп WNT (wnt3a или бета-катенин) и FGF (fgf10), которые активируют экспрессию гена TBX5. В конечном итоге именно tbx5 экспрессируется в районе 3-6 сомита при формировании передней конечности (а tbx4 - задней). Выступ почки конечности носит название *апикальный эктодермальный гребень*. В ответ на сигнал fgf10 от мезенхимы происходит экспрессия fgf6 апикальным гребнем. Зона активности этих генов представляет собой участок под апикальным гребнем толщиной 200 микрон, так называемая *зона прогресса*. В этой зоне происходит увеличение количества клеток, активная пролиферация. Из-за небольшого размера зоны, новые делящиеся клетки выталкивают те, что поделились ранее. При удалении апикального гребня пролиферация конечности не происходит. Если заменить мезенхиму передней конечности (крыла) мезенхимой задней конечности (лапы) и оставить апикальный гребень, формируется задняя конечность. Таким образом, выбор конечности происходит исходя из материала мезенхимы.

Время нахождения клетки в зоне прогресса влияет на ее дальнейшую судьбу, так в случае короткого времени прибывания в этой зоне формируется базальная часть конечности, стилопод, далее по убыванию. Именно индуцирующий сигнал fgf10 вызывает индукцию конечности. В вышеописанном опыте по формированию химерной конечности можно пересадить апикальный гребень или же локально повысить концентрацию fgf10, вследствие чего будет получен нужный эффект (Рис.43).

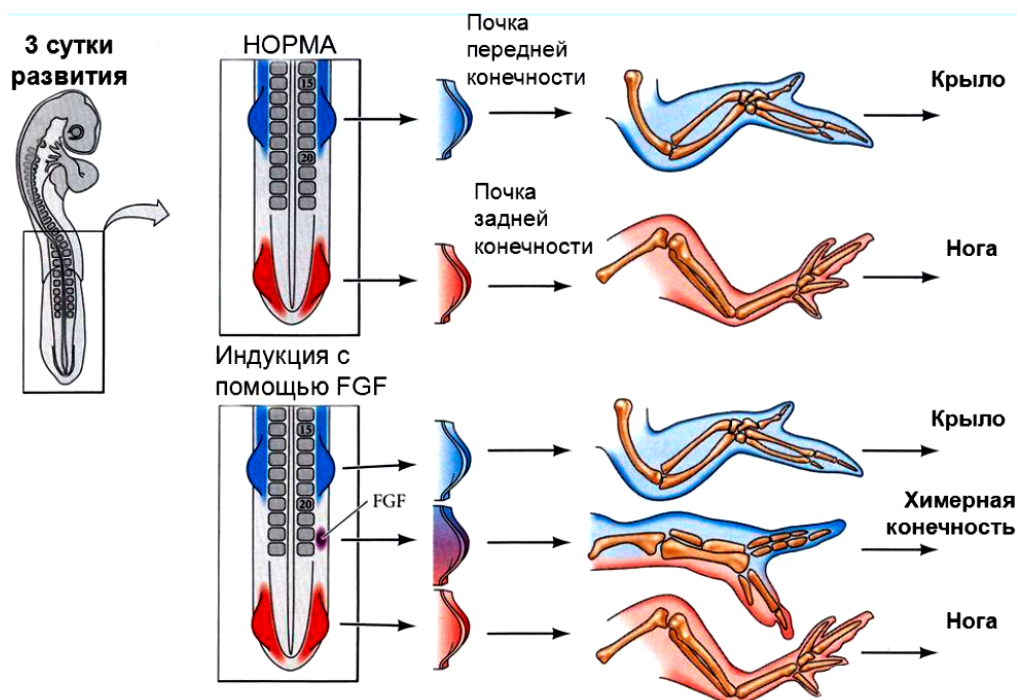


Рисунок 63. Эксперименты с индукцией формирования конечности при помощи FGF у птиц.

Передняя и задняя часть конечности определяется *зоной поляризующей активности (ЗПА)*. Эта зона располагается в нижней части почки конечности. Если пересдвинуть эту зону в верхнюю часть почки конечности другого организма, произойдет зеркальное раздвоение конечности (конца крыла или кисти лапы). Оказалось, что в ЗПА активен ген *sonic hedgehog* или *shh*. На экспрессию этого гена влияют гомеозисные гены, так, *dHand* и *Nox8* задают такие условия, что клетки ЗПА начинают экспрессировать *shh*. В свою очередь, *shh* через градиент BMP-генов (имеющих вегетализирующее действие) влияет на ориентацию конечности.

### Формирование пальцев

На начальном этапе формирования кисти, аутопод представляет собой «лопатку» (Рис.44). Внутри нее есть зоны сгущения и разрежения мезенхимы. В зонах сгущения образуются кости скелета пальцев под действием BMP-генов, а в промежутках – остается только эктодерма. У большинства наземных животных промежуточная перепонка дегенерирует путем некроза, а у водоплавающих – сохраняется. Эти перепонки, как оказалось, являются индукторами, специфицирующими кости конечности. Каждая предыдущая перепонка специфицирует впереди лежащие пальцы. Если удалить перепонку, то будут формироваться пальцы по типу крайних (более короткие, чем средние). В процессе некроза этих фрагментов участвуют BMP-белки, если присутствует

Noggin, то на лапе остаются перепонки. На рисунке представлено развитие утиной (с перепонкой) и куриной (без перепонки) лап.

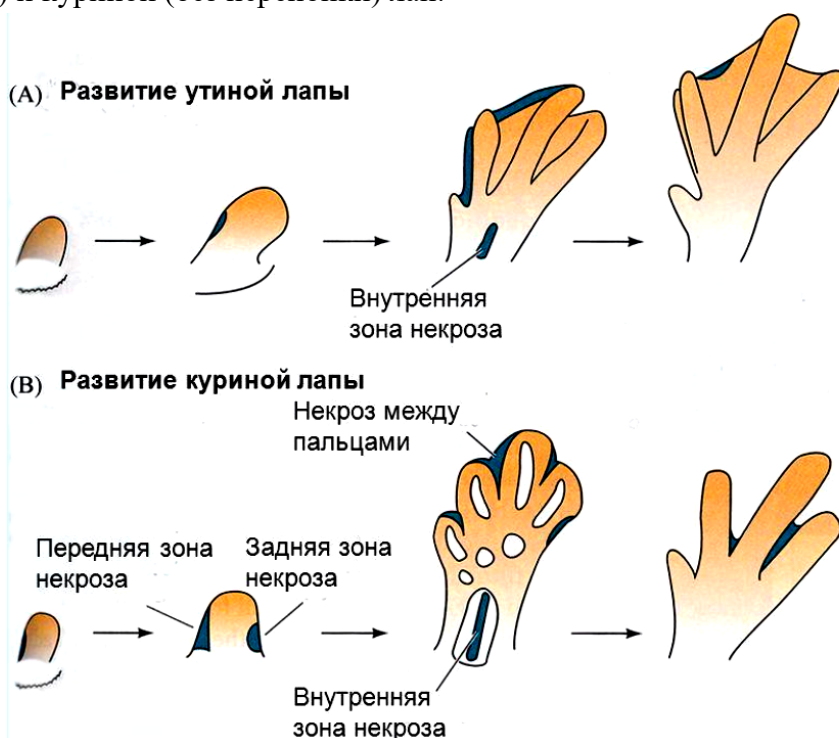


Рисунок 74. Формирование пальцев. Апоптотическая гибель ткани в межпальцевом пространстве на примере курицы (В) и формирование перепонки на примере утки (А).

### Участие генов сегментации в формировании конечности

В формировании осей конечностей также участвуют паралоги гомеозисных генов (Рис.45). На этапе формирования стилопода экспрессируются гены *Hoxd-9* и *Hoxd10*. На этапе зейгопода их экспрессия сохраняется (лучевая кость), а также добавляется экспрессия последующих генов до *Hoxd-13* (локтевая кость). На этапе формирования аутопода участвуют гены *Hoxa13*, *Hoxa 12* и *Hoxd10-13*. Таким образом, *shh* вместе с гомеозисными генами работают при формировании передне-задней оси конечности.

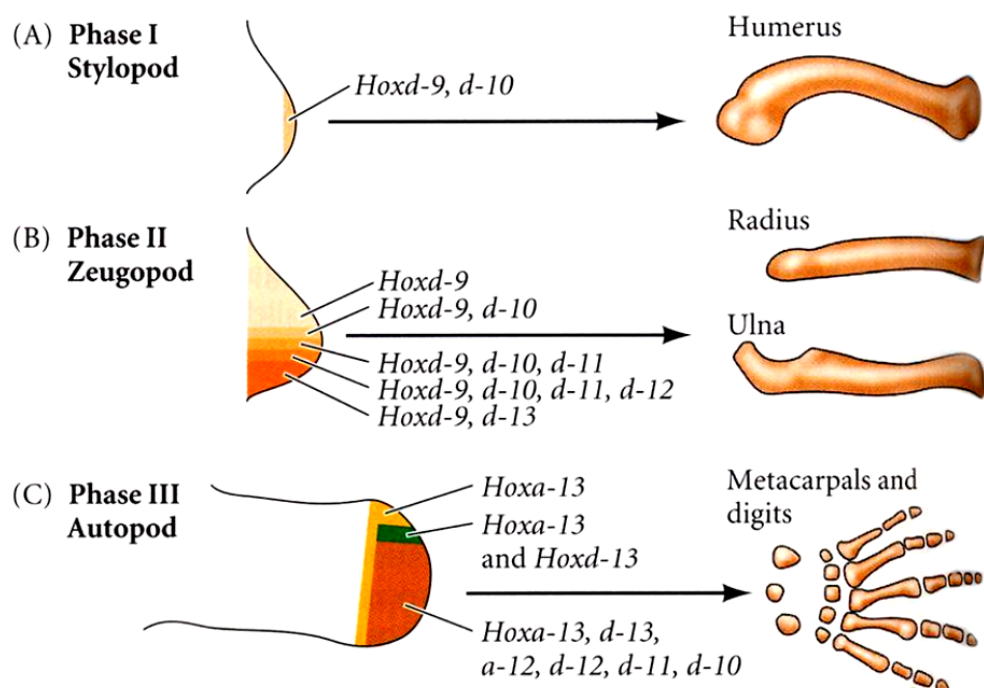


Рисунок 45. Участие НОХ-генов при формировании конечностей.

Дорзо-вентральная сторона определяется путем действия гена *Wnt7a*, вызывающего дорзализацию конечности. Вентральная сторона регулируется через белок *Lhx1*, отвечающий за формирование подушечек пальцев. Если подавить экспрессию *Wnt7a*, с обеих сторон руки сформируются подушечки пальцев. Если активировать *Wnt7a* на вентральной стороне, сформируются ногти на обеих сторонах руки.

# Лекция 10. Регенерация

## Классификация регенеративных процессов

Как было описано в вводной лекции, интерес к регенерации существовал еще в античное время и продолжался с изобретением микроскопа. В Европе аристократия экспериментировала с гидрами, а позже – с тритонами. Появилось определение регенерации – явление повторного возникновения структур.

Используемая в курсе классификация способов регенерации (по М.А. Воронцовой) представлена на Рис.46. Регенерация в общем смысле разделяется на *репаративную* (происходит при утрате органов и структур, наиболее интересна исследователям) и *физиологическую* (постоянная составляющая онтогенеза, новые делящиеся клетки заменяют стареющие и погибающие). Регенерация может возникать не только во взрослом организме, но и на эмбриональных стадиях. Так, при разделении эмбриона на ранних стадиях дробления можно получить восполнение развития целой особи из части (развитие однояйцевых близнецов). Репаративная регенерация может происходить при ампутации вследствие внешних факторов или путем аутомии (организм сам лишается органа, например, для самозащиты). По результату регенерации судят по тому, как она прошла: в норме наблюдают типичную регенерацию, а при аномалии – атипичную. Классический пример типичной регенерации – голотурия (пищеварительные органы) или кузнечик (ноги). В случае примера ящерицы, отбрасывающей хвост, наблюдается атипичная регенерация, так как образованная после структура является не хвостом, а хвостовым придатком.

Советский зоолог, **Дмитрий Николаевич Насонов**, пережимал конечности личинок аксолотлей при помощи лигатуры из конского волоса. Если происходило нарушение покровов, то в месте разрушения развивалась дополнительная конечность. Нельзя сказать, что это типичная регенерация, так как особь не лишалась органа, однако «образование заново» все равно происходило. Такая регенерация называется *аддитивной*. Аддиции задних конечностей, можно также получить, например, при отведении седалищного нерва, также аддитивную регенерацию вызывает изменение положения ампуганта относительно культи при сращивании.

Если при удалении органа или конечности на ее месте появляется новый орган с большим количеством признаков какого-либо типа (например, пальцев), данный тип регенерации называется *гипертрофическим* или *гиперморфозом*. При *регенерационной гипертрофии* происходит восстановление функции нарушенного органа, за счет оставшихся клеток и ткани (характерно для печени). В таком случае восстановленные клетки отличаются морфологически, но способны полностью выполнять необходимую функцию. *Компенсаторная гипертрофия* возникает при нарушении работы или

ампутации парного органа, в таком случае оставшийся орган берет на себя нагрузку и восполняет функцию до необходимого уровня. Она также может быть анатомической, например, у птиц в онтогенезе сохраняется один работающий яичник. Если вследствие регенерации развивается неполноценный орган, такое развитие называется *гипотрофическим*. *Гетероморфоз* возникает в случае, если на месте удаленного органа возникает что-то другое. Один из видов гетероморфоза – *гомейозис*. В таком случае в образовании органа участвуют не те гомеобоксные гены, которые участвуют в формировании этого сегмента в эмбриогенезе, а гены соседних участков тела. *Извращение полярности* наиболее показательны в случае, когда разделяют животное с четкой гетерономной метамерией (головные сегменты закладываются отлично от туловищных, например,) на головной и туловищный конец. Так как образование головных и туловищных сегментов регулируют разные гены, при разделении головной конец будет отрачивать новые головные сегменты на месте ампутации. То же самое будет происходить с хвостовым концом. При такой регенерации нарушается полярность.



Рисунок 46. Типы регенерации по Воронцовой.



Зачастую то, какой орган образуется при регенерации, регулируют *ретиноиды*. Если отрезать регенерирующей амфибии кисть, вырастет кисть, если ампутировать конечность по локоть – вырастет локтевая часть и кисть, если ампутировать плечо, будет развиваться вся лапа от плеча. Это называется полярностью, способность отращивать именно тот орган, который располагается более апикально от места ампутации. Так, аксолотлю ампутировали кисти передних лап и срастили культя, а через некоторое время на гистологических срезах изучили регенерацию. Оказалось, что каждая культя запрограммировала в плечевом отделе противоположной развитие кисти. На образование кисти влиял градиент концентрации *ретиноевой кислоты*.

При *атавистической регенерации* на месте ампутированной конечности развивается ее предковый вариант. Так, изначально у всех наземных позвоночных развивается пятипалая конечность, однако вследствие специализации у некоторых форм образуется четырехпалая конечность. У таких животных при атавистической регенерации вместо четырехпалой кисти развивается пятипалая, как у предковых форм.

## Эпиморфоз и морфаллаксис

Американский генетик, **Томас Морган**, выделил два механизма регенерации:

1) *Эпиморфоз* – при таком типе восстановления происходит формирование *регенерационной бластемы* (гомолог почки конечности при нормальном развитии). Бластема формируется на месте ампутации из скопления мезенхимы под *раневой эктодермой*. Бластеме можно пересадить зародышу на место почки конечности, при этом она будет способна воспринимать сигналы и отвечать на них формированием нормальной конечности. То же самое в обратной ситуации, почка сформирует новую конечность на месте бластемы. В случае эпиморфоза происходят активные митотические деления (пролиферация мезенхимы и составляющих бластему клеток).

2) *Морфаллаксис* – тип регенерации, не предполагающий митотического деления и формирования регенерационной бластемы. Регенерация происходит за счёт изменения клеток самого организма. Советский ученый, **Борис Петрович Токин**, проводил исследования регенерации млекопитающих. Так, в его лаборатории разрезали мышечную оболочку, вытаскивали мышцу, перемалывали ее и возвращали в мышечную сумку. При дополнительном растяжении конечности формировалась практически нормальная мышца за исключением увеличенного количества соединительной ткани. В случае подобных опытов на трубчатых костях, для нормального развития необходимо было постоянное давление. В опытах, где производили повторную регенерацию полученных мышц и костей, количество соединительной ткани росло. Соединительная ткань блокирует регенерацию, что усложняет проведение последующих опытов. В

процессе нормального онтогенеза наблюдается эта ситуация – при старении ткань многих органов замещается соединительной.

### Этапы эпиморфогенетической регенерации

1) Образование раны на месте культы. На этом этапе первая реакция организма – закрыть рану фибриновым сгустком. Первые часы после ампутации сворачивается кровь из ближайших поврежденных сосудов и образуется сгусток, останавливающий кровопотерю и защищающий от проникновения инфекции.

2) Уничтожение макрофагами погибающих клеток в ране. На раневой поверхности нарушен межклеточный матрикс, соединявший клетки в ткань. На это место приходят макрофаги, фагоцитирующие поврежденные клетки и матрикс. Сосуды кольцеобразно перетягиваются.

3) Формирование раневого эпителия. Клетки покровного эпителия, которые находились в состоянии *контактного торможения* (каждая клетка эпителия оставалась в состоянии покоя, так как была соединена контактами с соседними клетками), теряют связь с матриксом и соседними клетками, и начинают двигаться по свободной от эпителия раневой поверхности. В центре поля клетки сталкиваются друг с другом, образуют новые контакты и останавливаются. Так образуется однослойный раневой эпителий. Если при ампутации сростить культю с фрагментом старой кожи, регенерация не будет происходить.

4) Образование апикального эктодермального гребня на поверхности раневого эпителия. Культи экспрессирует *fgf10*, а апикальная шапочка навстречу – *fgf8*. Происходит формирование градиента ростовых факторов и повторяется ситуация, возникающая при образовании конечности в нормальном развитии. В этой среде клетки культы теряют спецификацию и начинают синтезировать белки пролиферации. Пролиферируя, эти клетки формируют мезенхиму, причем потерявшие спецификацию клетки имеют компетенцию к образованию клеток того типа, к которому принадлежали до дедифференцировки.

5) Формирующаяся бластема проходит те же стадии, что при нормальном развитии конечности.

6) Отличие от нормального развития – иначе происходит образование пальцев. У большинства позвоночных пальцы формируются из так называемой «лопатки», в которой апоптотически погибают клетки межпальцевого пространства. При регенерации лапы тритона каждый палец формирует свою «почку».

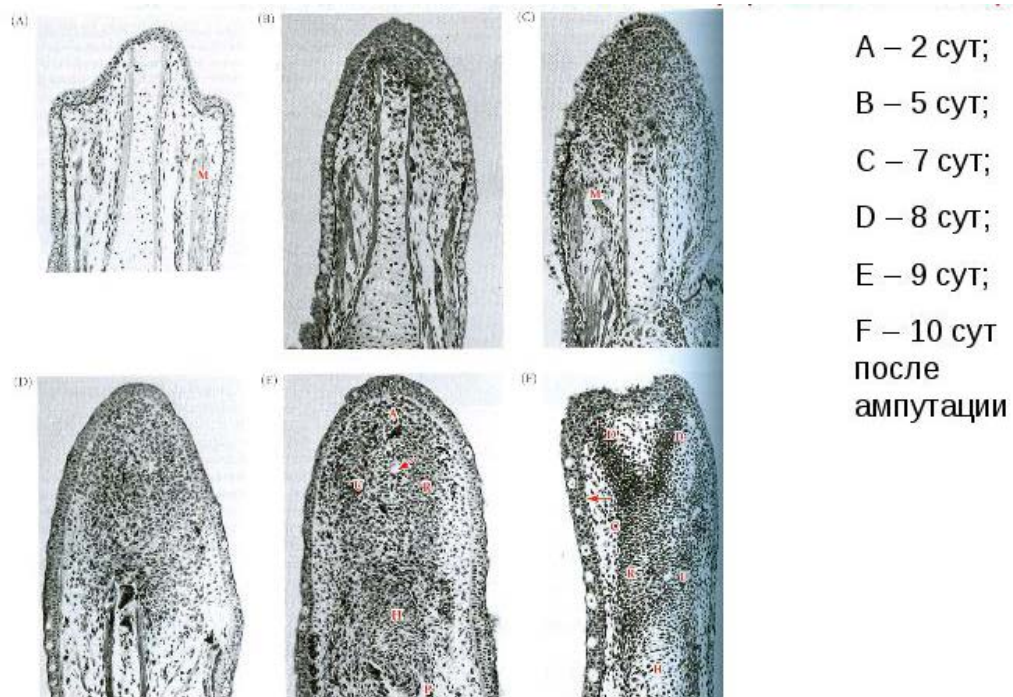


Рисунок 46. Регенерация передней конечности у личинки пятнистой саламандры.  
Н – плечо; А – аликальная мезенхима бластемы; U – зачаток лучевой кости; R – зачаток локтевой кости; P – место ампутации; D1, D2 – формирующиеся первые 2 пальца.



БИОЛОГИЧЕСКИЙ  
ФАКУЛЬТЕТ  
МГУ ИМЕНИ  
М.В. ЛОМОНОСОВА



*teach-in*  
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

