

В. Ефремов

# Сравнительная эмбриология земноводных

2016 г



**РАЗВИТИЕ АМФИБИЙ (1)**

Каждая группа изучаемых позвоночных имеет свою привлекательность, и исследование онтогенеза её представителей вносит свой бесценный вклад в наше понимание разнообразия развития и его универсальности. Земноводных можно с полным основанием отнести к наиболее популярным объектам биологических исследований (анатомия, физиология, эмбриология, биология и генетика развития). В сущности, Земноводные это группа, обеспечившая зарождение и развитие экспериментальной эмбриологии (Вильгельм Ру, Шпеман, Мангольд, Гольтфретер).

Несколько слов о порядке изложения материала курса. Дело в том, что, руководствуясь ходом филогенетического возрастания сложности организации разных классов позвоночных, мы должны были бы теперь знакомиться с особенностями развития круглоротых (Миксины, Миноги,), затем Хрящевых рыб, Осетровых, Костистых и только потом Амфибий и др. Четвероногих. Однако, такой порядок изложения в данном случае не самый оптимальный для восприятия материала и к тому же связан с неоправданной затратой времени на повторение общих моментов в развитии отдельных классов позвоночных. Поэтому мы отступим от филогенетического принципа подачи материала и воспользуемся достаточно распространенной схемой изложения, подразделив все классы позвоночных на три группы по характеру дробления яйца [голобластическое (полное), голобластическое чередующееся (ротационное) и меробластическое (неполное)].

Именно с земноводных мы и начнем последовательное знакомство с другими группами Anamnia. Благодаря своей распространенности, удобству и неприхотливости амфибий, работа с ними постоянно сопровождалась значительными успехами в исследовании развития позвоночных в целом. По сравнению с другими группами онтогенез амфибий изучен много полнее и подробнее. Кроме того в плане преподавания накоплен огромный материал как в феноменологии развития амфибий, так и в молекулярно генетических основах их развития.

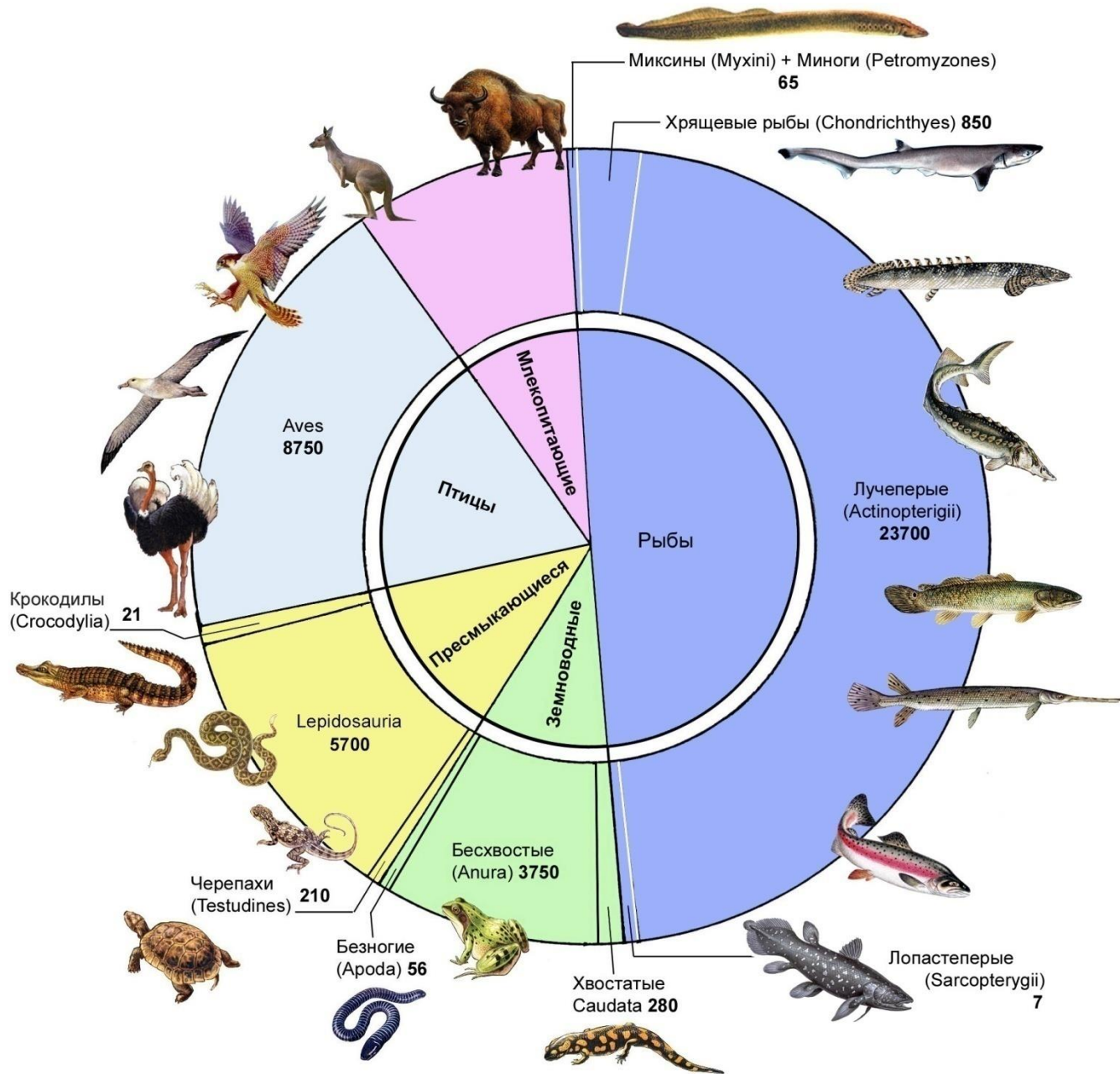
**Происхождение Земноводных** датируется Средним девоном (около 300 млн лет); предками были рыбы, обладавшие легкими и такими парными плавниками, из которых могли развиться пятипалые конечности. Таким требованиям удовлетворяли древние **Кистеперые рыбы** (отр. Crossopterygii) из подкласса Мясистолопастных (Sarcopterygii). ★4

Класс современных Земноводных – это относительно немногочисленная группа, включающая **три отряда**:

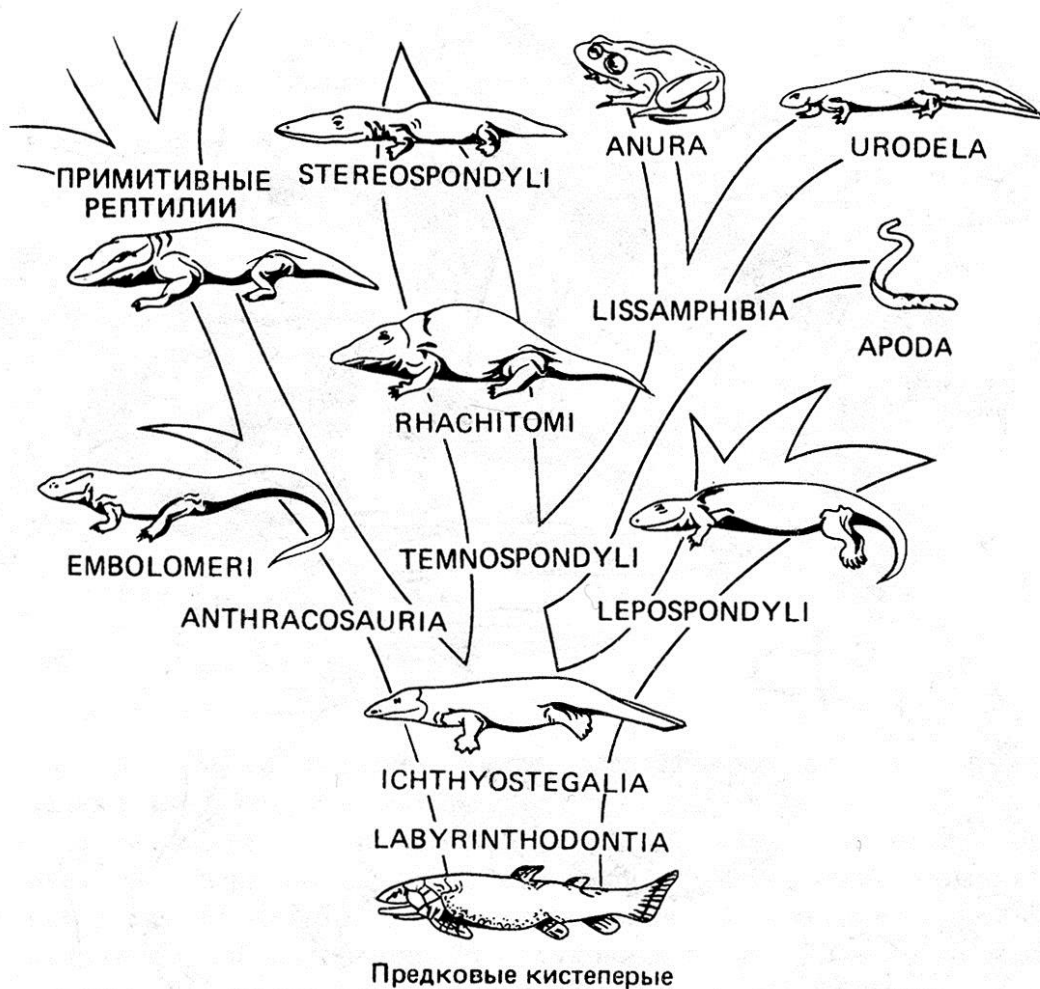
Хвостатых (Caudata или Urodela) ★

Безногих (Apoda или Gimnophiona) ★

Бесхвостых (Anura или Ecaudata) ★ Эти три отряда резко отличны друг от друга не только анатомически, но и по своей биологии и особенностям эмбриогенеза, что определяется независимым развитием их, по крайней мере, с **триаса**. ★ 4



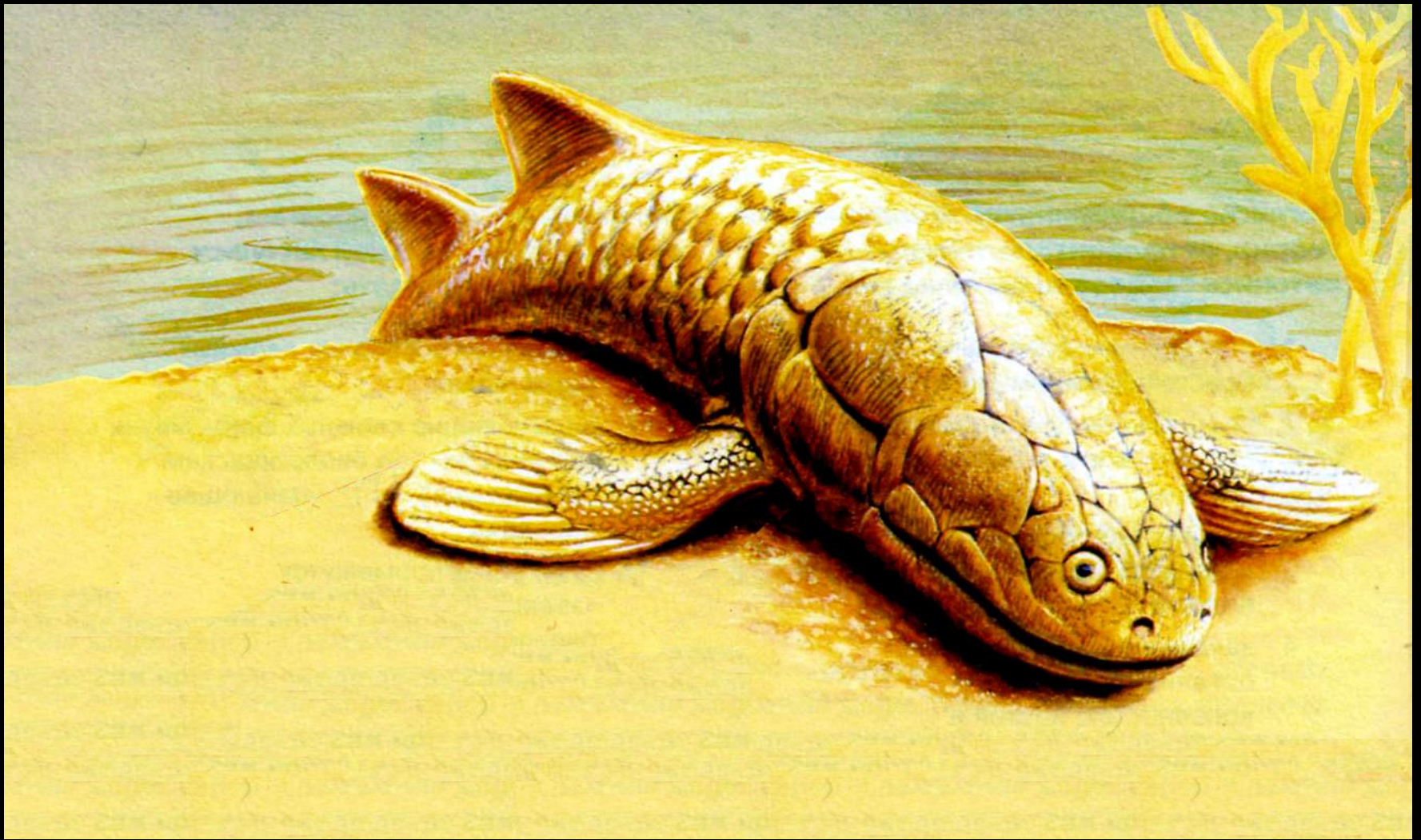
# Происхождение Земноводных



Гипотетическое родословное древо Земноводных. Три современных отряда (Anura, Urodela, Apoda) имеют, возможно, общее происхождение, возникнув в позднем палеозое от примитивных Rhachitomi или Temnospondyli.

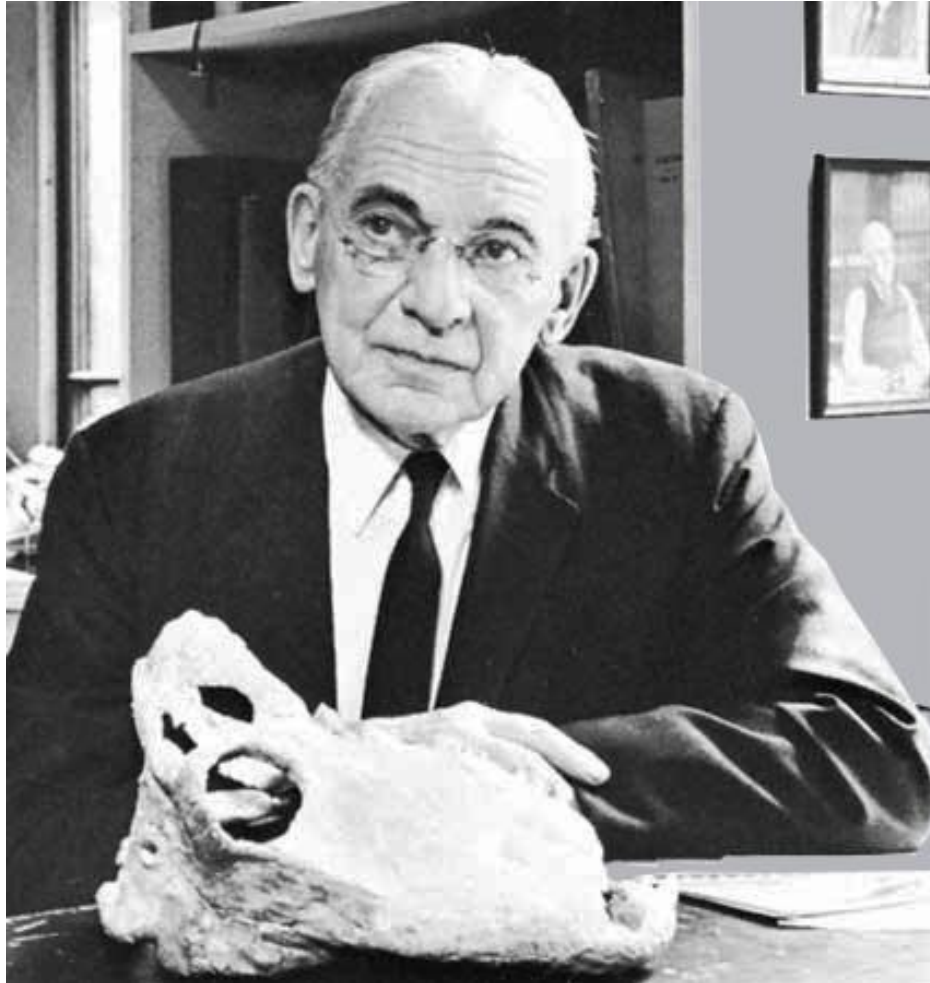
По Ромер А., Парсонс Т. (1986)





«Самой грандиозной из всех рискованных затей, предпринятых позвоночными за всю их долгую историю, было, пожалуй, развитие четвероногости и выход на сушу»

*Альфред Ромер*



Alfred Sherwood Romer  
(1884 – 1973)

Альфред Ромер, выдающийся морфолог и палеонтолог США, автор многочисленных работ по сравнительной морфологии и палеонтологии позвоночных. Всемирную известность приобрели его учебники по палеонтологии и сравнительной анатомии позвоночных и, в частности, последнее посмертное издание «Анатомии позвоночных», доработанное его учеником и помощником Томасом Парсонсом



Сразу же отметим, что Земноводные (Amphibia) – это класс наземных позвоночных, сохранивший в своей эволюции ещё ряд черт водных предков.

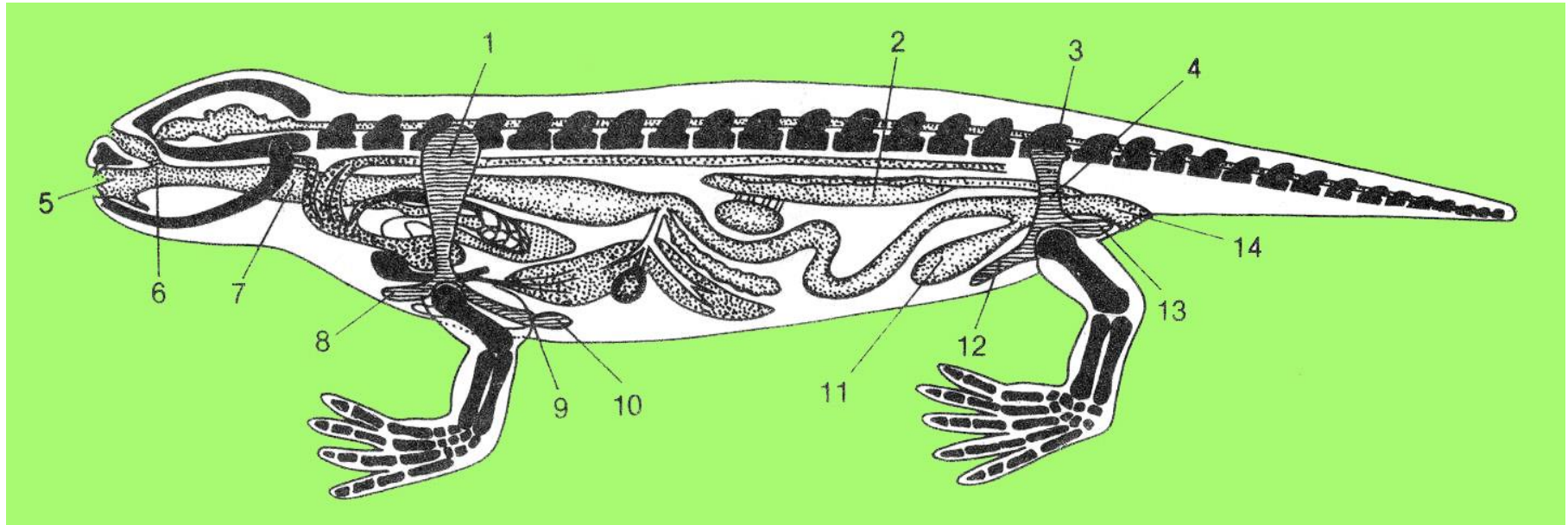
### Главные характеристические особенности Земноводных:

- 1 – В онтогенезе происходит смена среды обитания (с водной на наземную)
- 2 – Пятипалые конечности
- 3 – Подвижное сочленение черепа с позвоночником
- 4 – Особенности органов дыхания и кровообращения (здесь участвуют *легкие* и *кожа*); в связи с легкими – в кровеносной системе два круга кровообращения и два предсердия

### Черты примитивной организации Земноводных:

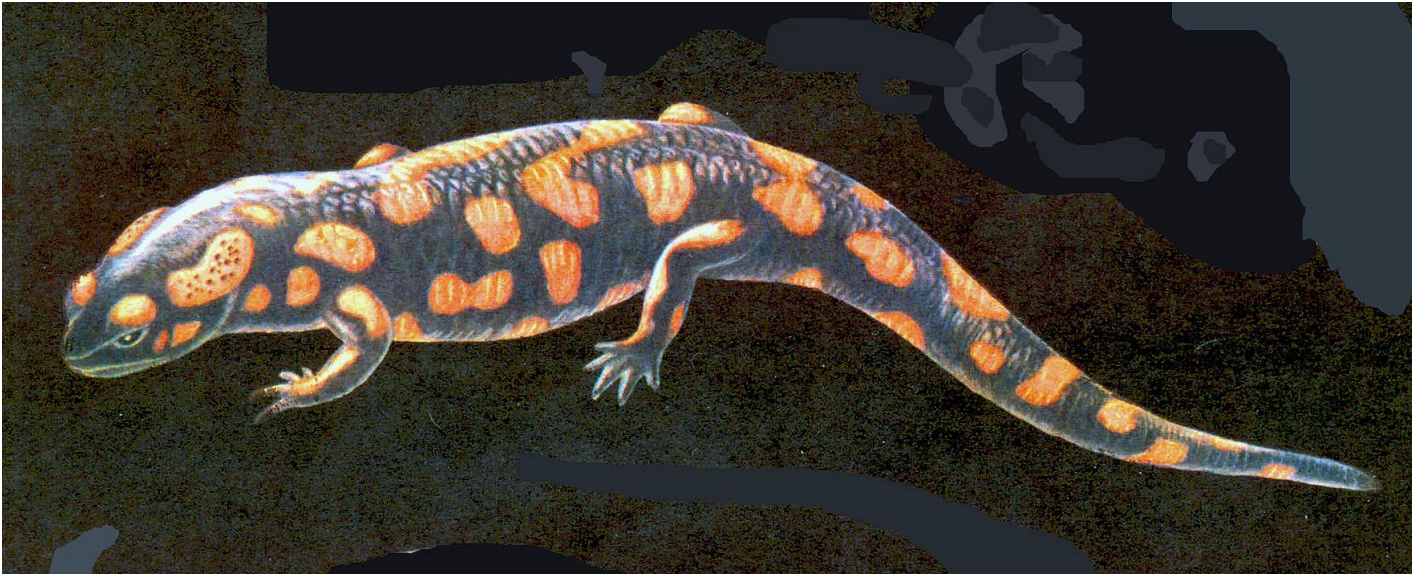
- 1 – Водный характер обмена веществ и туловищные почки
- 2 – Голая кожа, пронцаемая для воды
- 3 – Яйца, как правило, лишены плотных оболочек и развитие их возможно только в водной среде
- 4 – Пойкилотермия

# План строения тела позвоночного (самец саламандры)



1- лопатка, 2 – почка, 3 – крестцовый позвонок, 4 – подвздошная кость, 5 – ротовая полость, 6 – хоана, 7 – глотка, 8 – прокоракоид, 9 – коракоид, 10 – грудина, 11 – мочевой пузырь, 12 – лобковый хрящ, 13 – седалищная кость, 14 – клоака.

# Наши современники



- Пятнистая или огненная саламандра (*Salamandra salamandra*) – типичный представитель отряда Хвостатых земноводных (**Caudata** или **Urodela**). Этому виду присущи внутреннее осеменение и живорождение.

# Наши современники



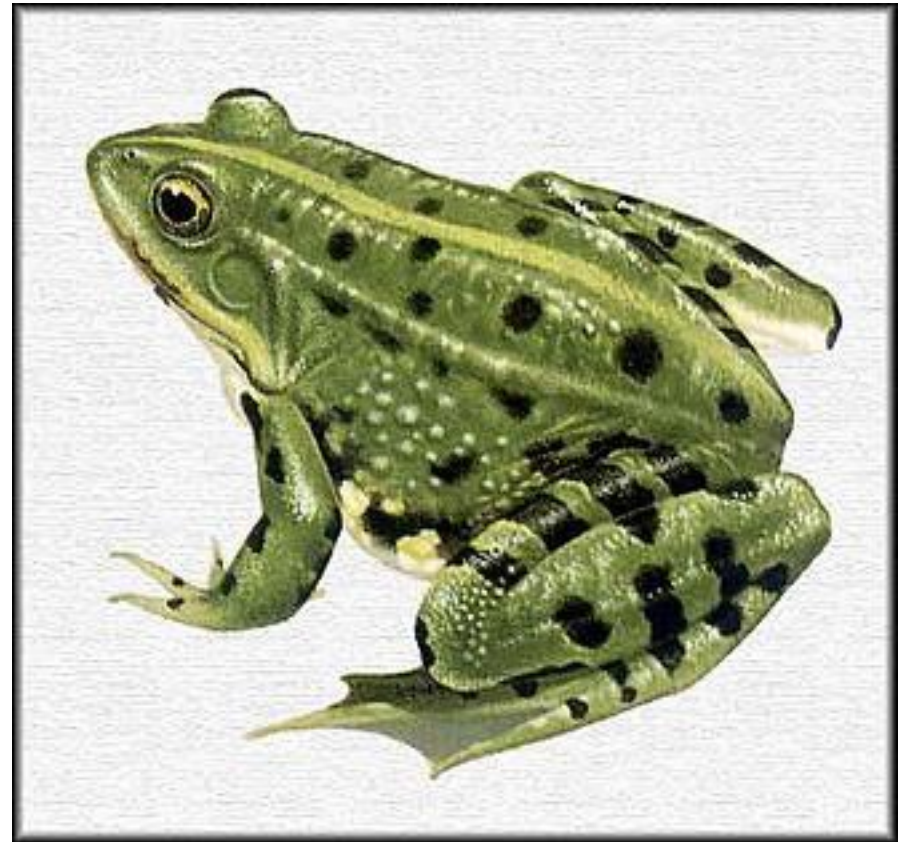
Кольчатая червяга, *Siphonops annulatus* (слева) и африканская червяга *Schistomeyrum thomensis* (справа), как и все представители отряда (**Apoda** или **Gymnophiona**), лишены не только парных конечностей, но и хвоста, т.к. клоака у них располагается почти на конце тела.

Следует отметить особый тип специализации червяг. Эти слепые существа живут как дождевые черви во влажной почве тропиков и ведут роющий образ жизни; для большинства из них характерно живорождение. Их конечности вторично редуцированы.



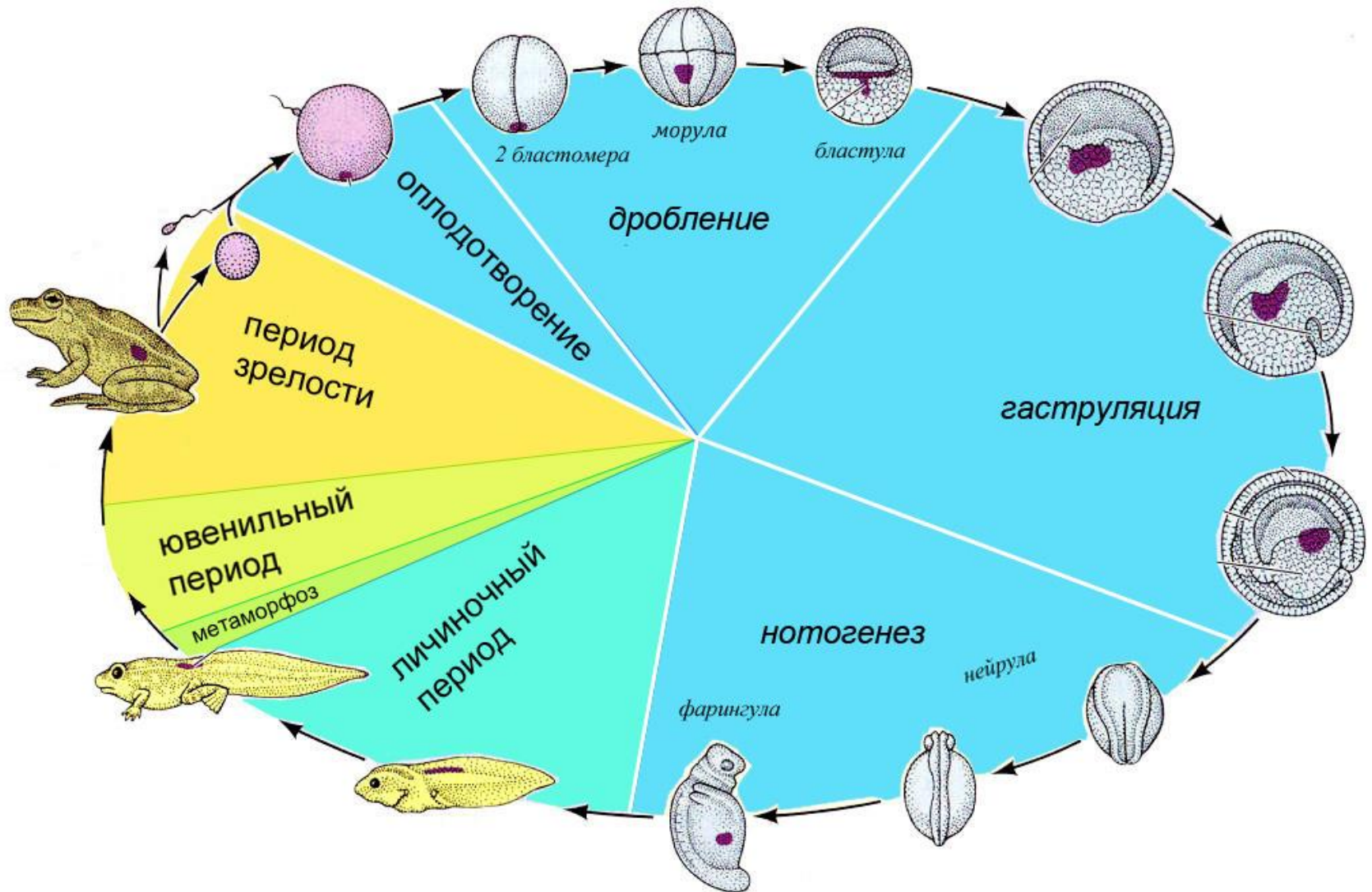
# Наши современники

Лягушка прудовая, *Rana esculenta* – европейский вид из отряда Бесхвостых амфибий (**Ecaudata** или **Anura**). Для Anura характерно наружное осеменение и *моноспермное оплодотворение*; развитие происходит в воде. Эмбриональный период протекает сравнительно быстро; из яйца вылупляется личинка – головастик. В процессе метаморфоза головастик превращается в молодую лягушку.

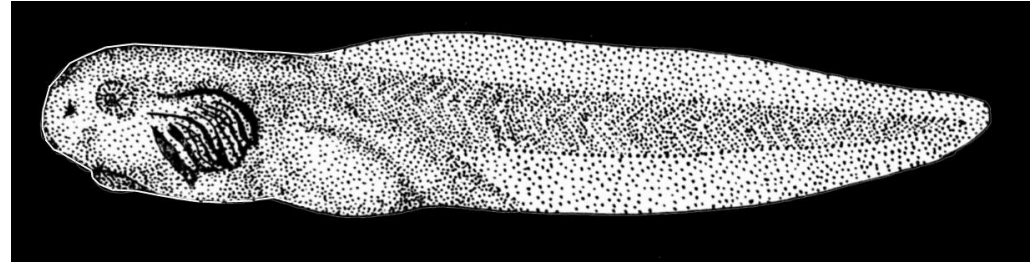




# Жизненный цикл леопардовой лягушки *Rana ripiens*



Для большинства Земноводных характерен «голобластический тип» развития



# Лабораторные объекты из мира Anura (Ecaudata)



Травяная лягушка,  
*Rana temporaria*



Шпорцевая лягушка,  
*Xenopus laevis*

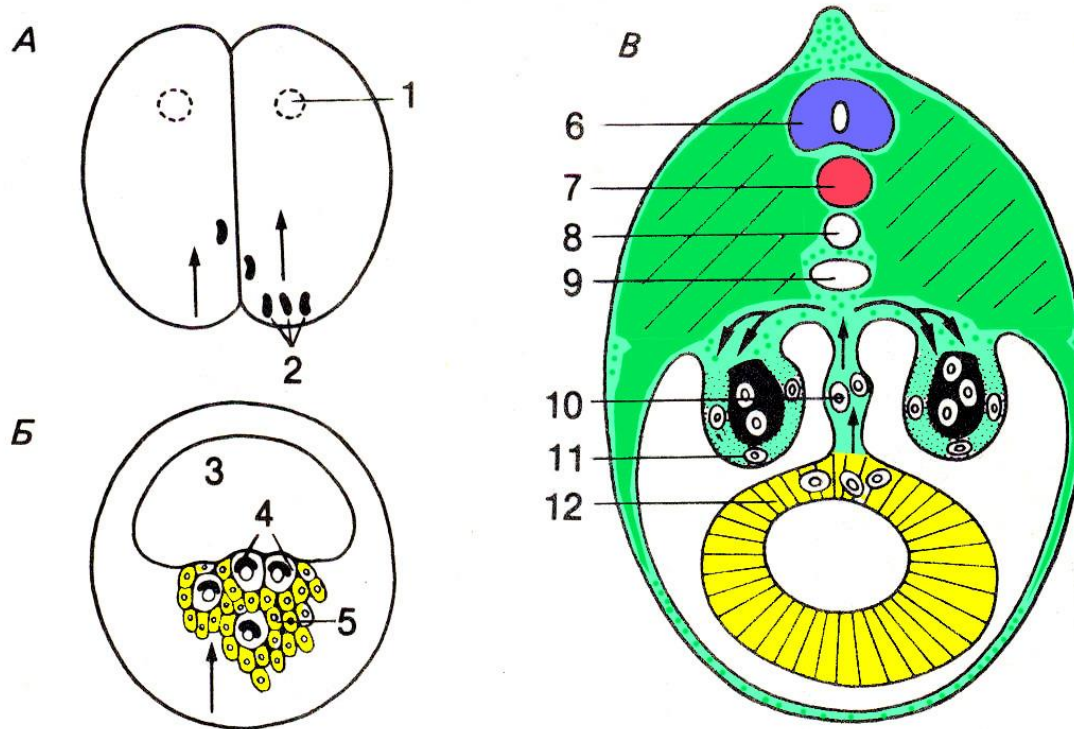
В 1960-е годы *Xenopus laevis* заменила лягушек *Rana* и саламандр, так как ее половое размножение оказалось возможным стимулировать в любое время года. К сожалению, *Xenopus laevis* является тетраплоидом, а кроме того, ей требуется 1-2 года для полового созревания. Эти обстоятельства затрудняют генетические исследования. В последнее время в лабораториях начинают использовать другой вид *X. tropicalis*. Наряду с преимуществами *Xenopus laevis*, эта лягушка диплоидная и достигает стадии полового созревания уже через 6 месяцев.

Из Gilbert, 2003

ГАМЕТЫ и ОПЛОДОТВОРЕНИЕ  
у  
ЗЕМНОВОДНЫХ



## Первичные половые клетки лягушки



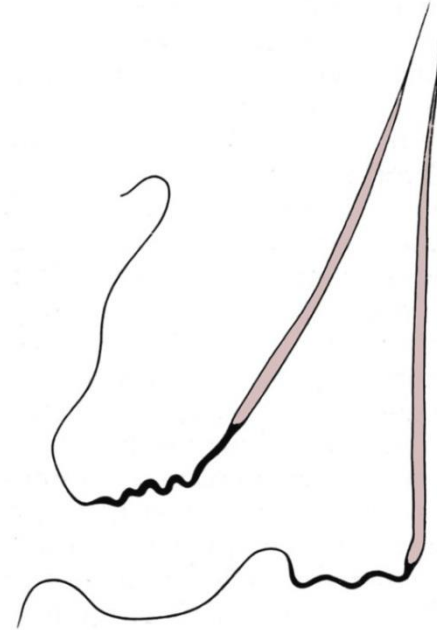
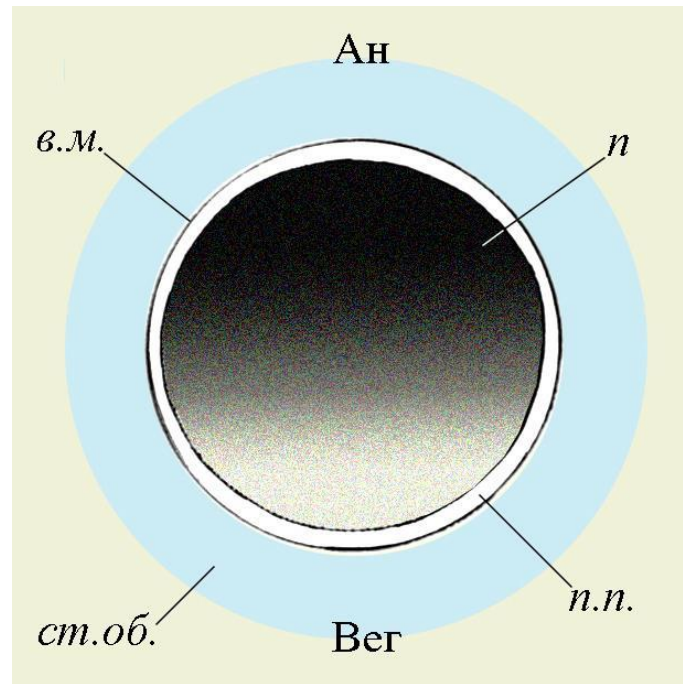
**А** – половые детерминанты 2 (тельца зародышевого пути), 1 – ядро клетки. **Б** – первичные половые клетки (4) с половыми детерминантами внедряются между клетками вегетативного основания бластулы (энтодерма) в области бластоцеля (3). **В** – миграция ППК (светлые) из дорсальной стенки кишечника (12) по брыжейке (10) в мозговое вещество (черного цвета) и корковый слой эмбриональных гонад (11); (показан точками светло-зеленого цвета) 6 - нервная трубка; 7 – хорда; 8 – спинная аорта; 9 – задняя полая вена.

По Хадорн и Венер (1989)



Для понимания механизмов морфогенетических процессов, составляющих содержание отдельных фаз эмбриогенеза, в частности гаструляции, следует проследить возникновение условий (предпосылок), обеспечивающих с одной стороны возможность, а с другой – неизбежность совершения того или иного морфопроцесса. И сделать это желательно с возможно более раннего момента или стадии, например, с ооцита. (Смотри слайды 21★)

## Гаметы травяной лягушки, *Rana temporaria*



Яйца лягушки плазмолецитального типа, мезо- и телолецитальные. Анимальный полюс интенсивно пигментирован. Яйца имеют диаметр 2 мм, а икринки с набухшими оболочками - 8 – 10 мм. *Обозначения: Ан – анимальный полюс; Вег – вегетативный полюс; в.м. – вителлиновая мембрана (желточная оболочка); п – пигмент; п.п. – перивителлиновое пространство; ст.об. – многослойная студенистая оболочка.*

Справа – сперматозоиды травяной лягушки. Длина хвоста соответствует длине головки. Шейка короткая, широкая.

# Препаттерн развития

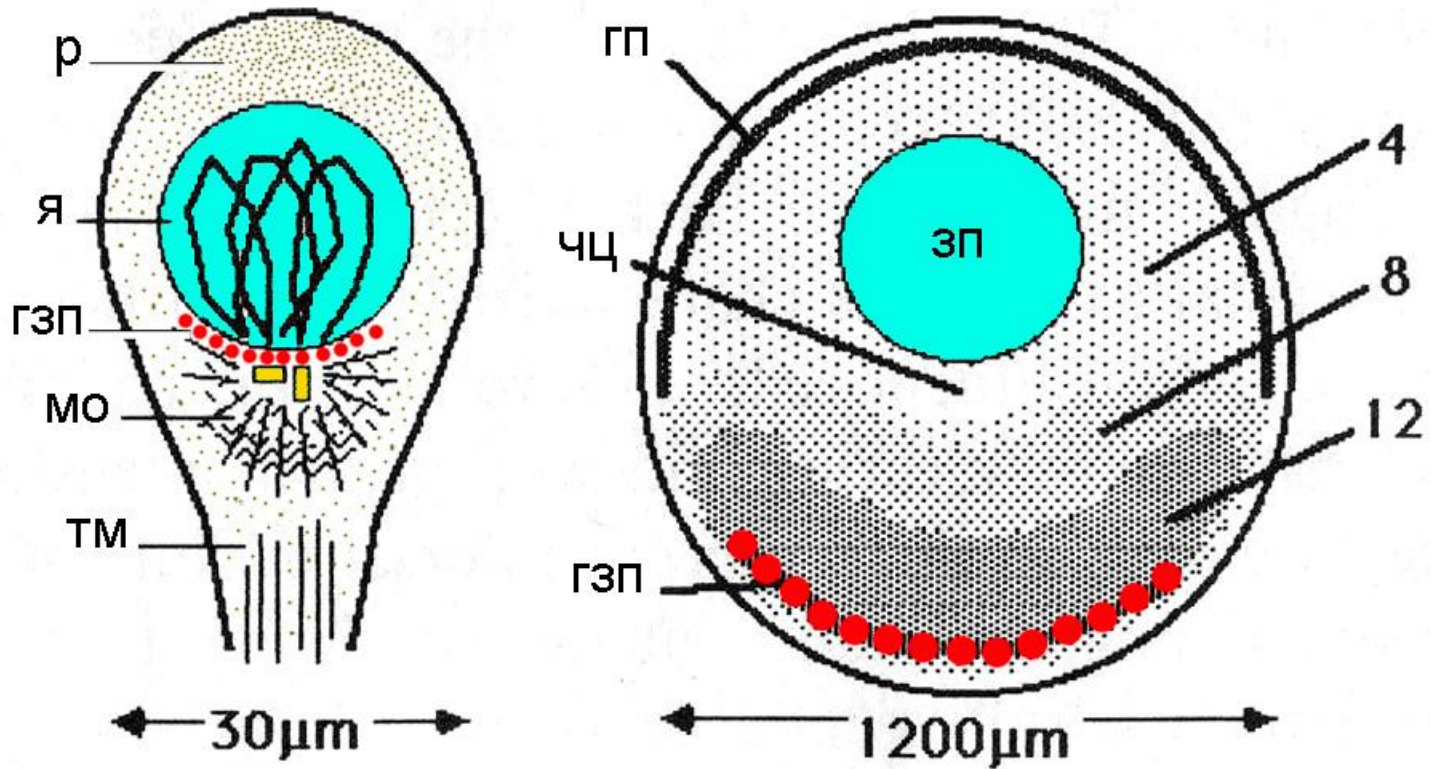


Схема строения ооцита *Xenopus laevis* в начале и в конце периода роста.

гзп – гранулы зародышевой плазмы; гп – гранулы пигмента; мо – митохондриальное «облако»; р – рибосомы; тм – телофазный мостик; чц – «чистая» цитоплазма; я – мейотическое ядро на стадии «букета»; 4-, 8-, 12 – зоны цитоплазмы ооцита, содержащие гранулы желтка разного размера: 4  $\mu$ ; 8  $\mu$ ; 12  $\mu$ .

## Ооцит *Xenopus laevis* в начале периода роста.

На рисунке показано схематическое изображение строения ооцита *Xenopus laevis* (шпорцевой лягушки) в начале оогенеза и по завершении периода роста. Молодой ооцит - это маленькая (30 мкм в диаметре) клетка, образующаяся из самоподдерживающихся стволовых клеток (stem cells) предшественниц - оогониев, как результат 4-х генераций митозов. Уже на этой стадии может быть отмечена регионализация ооцита, По форме клетка напоминает теннисную ракетку. Её вытянутый конец содержит остатки митотического веретена и виден как "*телофазный мостик*" (division bridge), представляющий связи с сестринской клеткой после завершения цитокинеза. Следующие структуры, обращающие на себя внимание - это центросома, окружённая многочисленными митохондриями, предшественники зародышевой плазмы (*половые детерминанты*) красного цвета, пузырьки аппарата Гольджи (АГ) и, наконец, расположенное на противоположном конце от телофазного мостика крупное ядро. Поскольку ооцит находится на ранней мейотической стадии "*букета*", хромосомы ориентированы своими концами по направлению к центросоме (★ слайд).

## **Ооцит в конце периода роста.**

На этой стадии в ооците можно выделить 4-е отчетливые области (зоны) ★20

1. *«Зародышевый пузырек»* - ядро 300 мкм в диаметре, содержащее ядерные белки и ядерную мембрану в количествах, равных содержимому нескольких тысяч ядер бластулы. После созревания зародышевый пузырек разрушается и белки рассеиваются в анимальном полушарии.

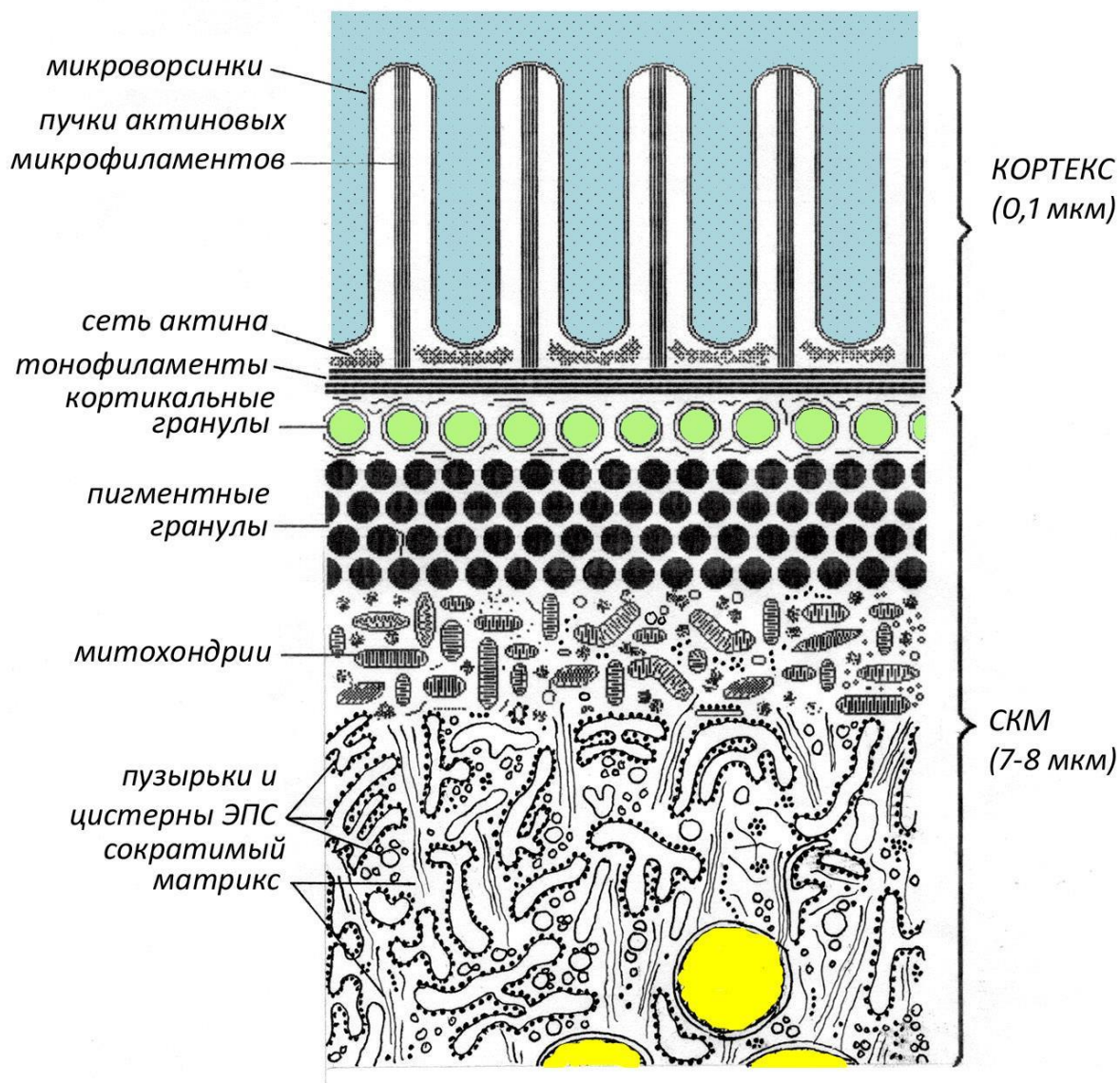
2. *Область в вегетативном полушарии*, в которой сосредоточены массы крупных плотно упакованных, окруженных мембранами *желточных пластинок*. Желточные белки составляют 80% всех белков ооцита. Предшественник белков желтка – *вителлогенин* (растворимый *липофосфопротеин*) – поступает в ооцит в системе пиноцитозных пузырьков. Белок микротрубочек – *тубулин* составляет 1%.

3. *Полярная зона вегетативного полушария*: гранулы зародышевой плазмы (*гзп*) и особенно крупные (12 мкм) желточные пластинки. Граница их расположения отмечает уровень образования будущего бластопора.

4. *Периферия ооцита или кортекс*. Собственно кортекс – зона 0,1 мкм и *субкортикальный матрикс* 3-7 мкм толщиной. Субкортикальный матрикс представляет слой кортикальных альвеол, слой гранул пигмента, слой митохондрий и пузырьки эндоплазматической сети.



# Схема строения кортикального слоя зрелой яйцеклетки Земноводного



Процессы раннего развития у хвостатых и бесхвостых амфибий проходят по-разному и иногда существенно различаются. С целью сопоставления этих начальных этапов онтогенеза я привожу соответствующую таблицу.

## Сопоставление некоторых параметров развития Anura и Urodela

№	Признак	Anura (Xenopus)	Urodela
1	Совпадение анимально-вегетативной и кранио-каудальной полярностей	Не совпадают	Совпадают
2	Осеменение	Наружное	Внутреннее
3	Оплодотворение	Моноспермия	Полиспермия
4	Ротация кортикального слоя	Играет важную роль	Не обнаружена (?)
5	Образование «серого серпа»	Имеет место	?
6	Фактор, определяющий вектор переднезадней оси	Точка вхождения спермия	Силы гравитации

## Осеменение и оплодотворение.

У Хвостатых амфибий осеменение *внутреннее*, несмотря на то, что специального копулятивного органа самцы этих Амфибий, как уже отмечалось, не имеют. Выделяемая семенная жидкость упаковывается в специальные слизистые мешки - *сперматофоры*, которые прикрепляются к водным растениям. Самки захватывают такие сперматофоры способной выдвигаться за пределы тела клоакой. Оплодотворение яиц у них происходит в каудальных частях яйцевода, в непосредственной близости к клоаке. У *Anura* осеменение *наружное* и происходит при непосредственном тесном контакте партнёров.

Оплодотворение у *Urodella* **полиспермное**. В яйцо одновременно проникают несколько (от 6 до 14) сперматозоидов. О числе вошедших спермиев судят по местам их проникновения или по наличию сверхчисленных “сперматических звезд” в яйцах. Через 20 мин после откладки яиц сперматозоиды у испанского тритона обнаруживаются в кортикальном слое. Первое направительное тельце и ядро ооцита обнаруживаются в так называемой “воронке созревания” в центре пятна созревания. Второе деление созревания (*эквационное*) завершается после активации, вызванной проникновением спермия, примерно через 40 мин после откладки яиц.

Оплодотворение у *Anura*, как правило, **моноспермное**, здесь полиспермия предупреждается поверхностными реакциями. В яйцах моноспермных животных имеется поверхностный слой кортикальных гранул. Как будто бы теперь кортикальные гранулы описаны и в яйцах некоторых представителей *Caudata*.

# Амплексус у жабы *Bufo bufo*







Hepect *Rana temporaria*

ДРОБЛЕНИЕ И БЛАСТУЛА  
у  
ЗЕМНОВОДНЫХ

## ***События в I клеточном цикле.***

### *Серый серп и окончательная установка дорсо-вентральной полярности*

Вскоре после оплодотворения (через 0,5 часа у Х.Л.) начинается реорганизация в поверхностных слоях яйца – так называемая *кортикальная ротация*. В ходе этой реорганизации кортекс поворачивается примерно на 30° по меридиану, проходящему через точку вхождения сперматозоида в анимальном полушарии. В результате вращения кортикального слоя становится видимой скрытая ранее серая цитоплазма анимального полушария. Такой «серый серп» образуется строго напротив ТВС.

★ *Кортикальная ротация (КР)* связана с формированием в вегетативном полушарии обширной зоны *параллельных поверхностных тяжей микротрубочек (ПРМКТ)* на глубине от 1 до 3 мкм под плазматической мембраной.

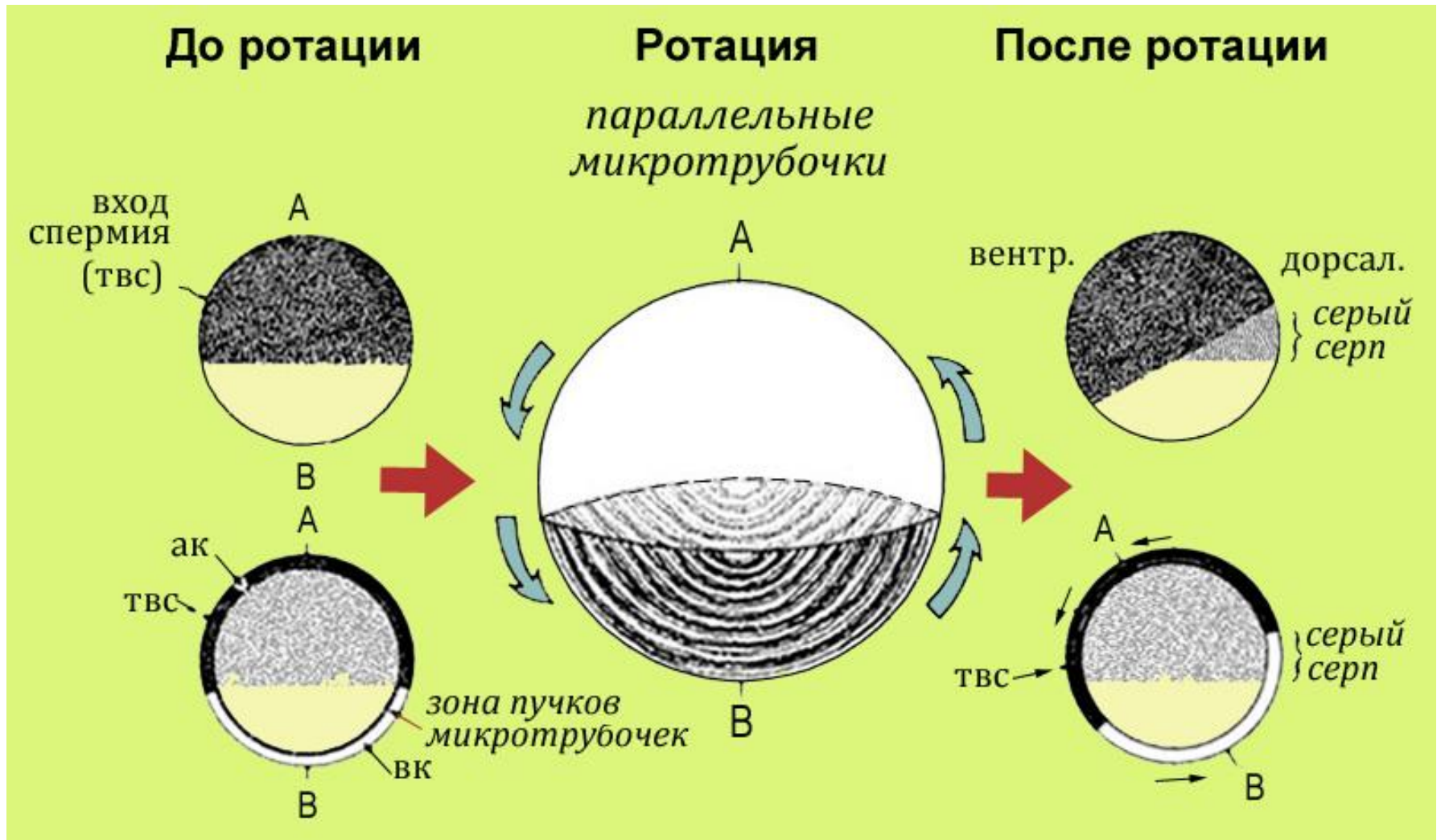
Ориентация этих тяжей строго коррелирует с ТВС (*спермастер*)

Ингибирование ротации УФ-облучением вегетативной половины яйца говорит о прямом участии этой структуры в данной реорганизации.

*Морфогенетическое значение ротации.* КР обуславливает перемещение и активацию ряда морфогенетических факторов и предопределяет положение осей зародыша. Серый серп размещается всегда на будущей спинной стороне зародыша и обозначает место клеточного материала будущей дорсальной губы бластопора. Плоскость меридиана, который проходит через середину СС, представляет собой сагиттальную плоскость зародыша.



# Кортикальная ротация и образование серого серпа



*Пояснения к предыдущему слайду*

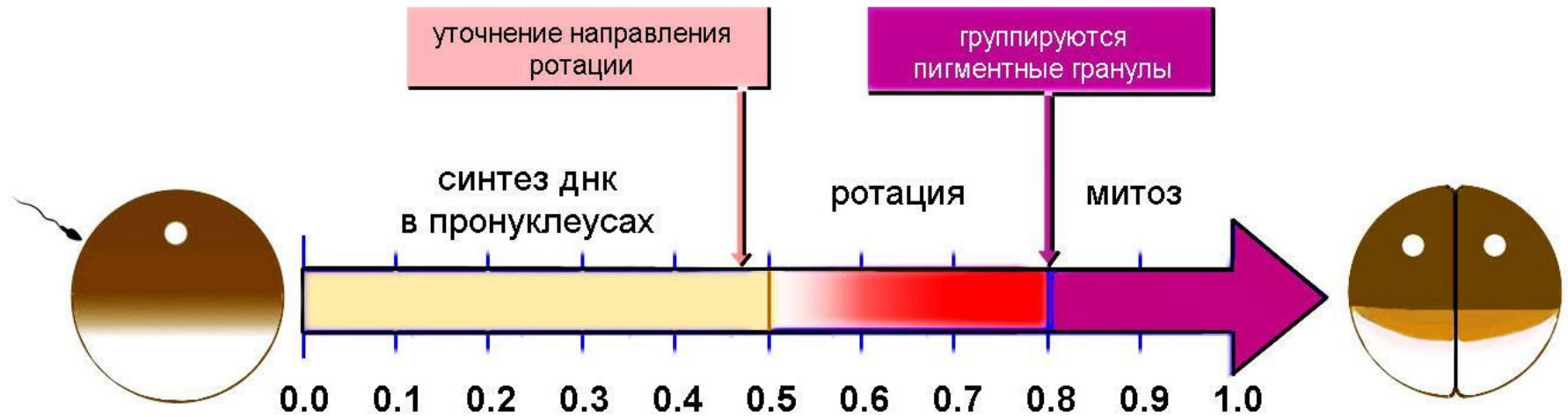
## «Кортикальная ротация и образование серого серпа»

Из пяти представленных на схеме изображений оплодотворенной яйцеклетки Anura рисунки в левом и правом рядах показывают внешний вид (верхний рисунок) и продольный разрез (нижний рисунок). Рисунки в левом ряду отражают состояние яйцеклетки до начала ротации, в правом – после завершения ротации. В середине представлена объемная схема, изображающая положение , организацию области упорядоченных пучков микротрубочек в вегетативном полушарии яйцеклетки и направления вращения яйцеклетки .

*Условные обозначения: А – анимальный полюс; В – вегетативный полюс; ак – анимальный кортекс; вк – вегетативный кортекс; ТВС – точка вхождения в яйцо сперматозоида.*



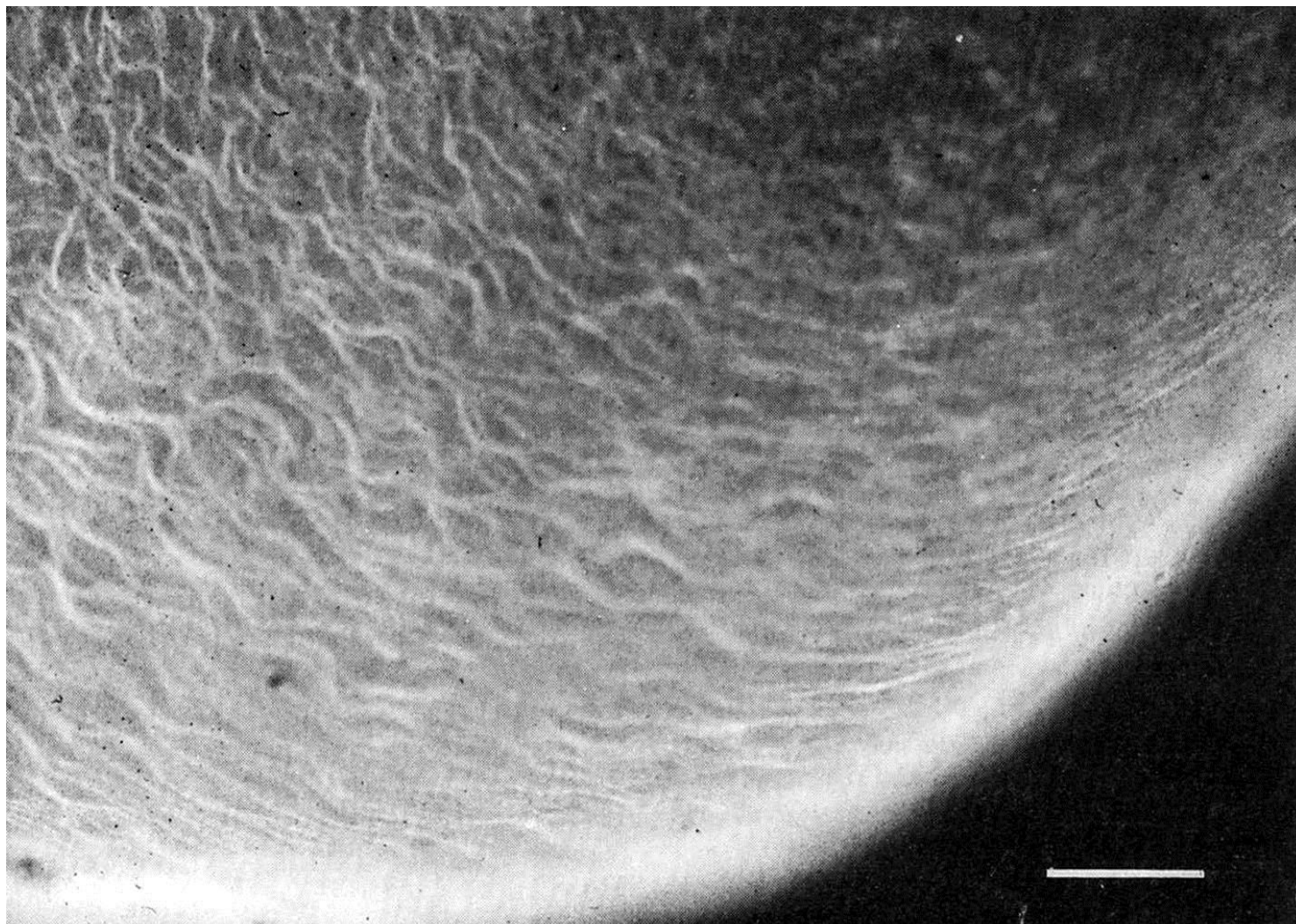
# Хронология кортикальной ротации



тубулины МКТ не полимеризованы  
текучесть цитоплазмы

Полимеризация тубулинов. Цитоплазма затвердевает к 0,8 и сохраняет твердость, несмотря на снижение числа МКТ, но теперь цитоплазма становится чувствительной к цитохалазину и, следовательно, зависит от полимеризации актина

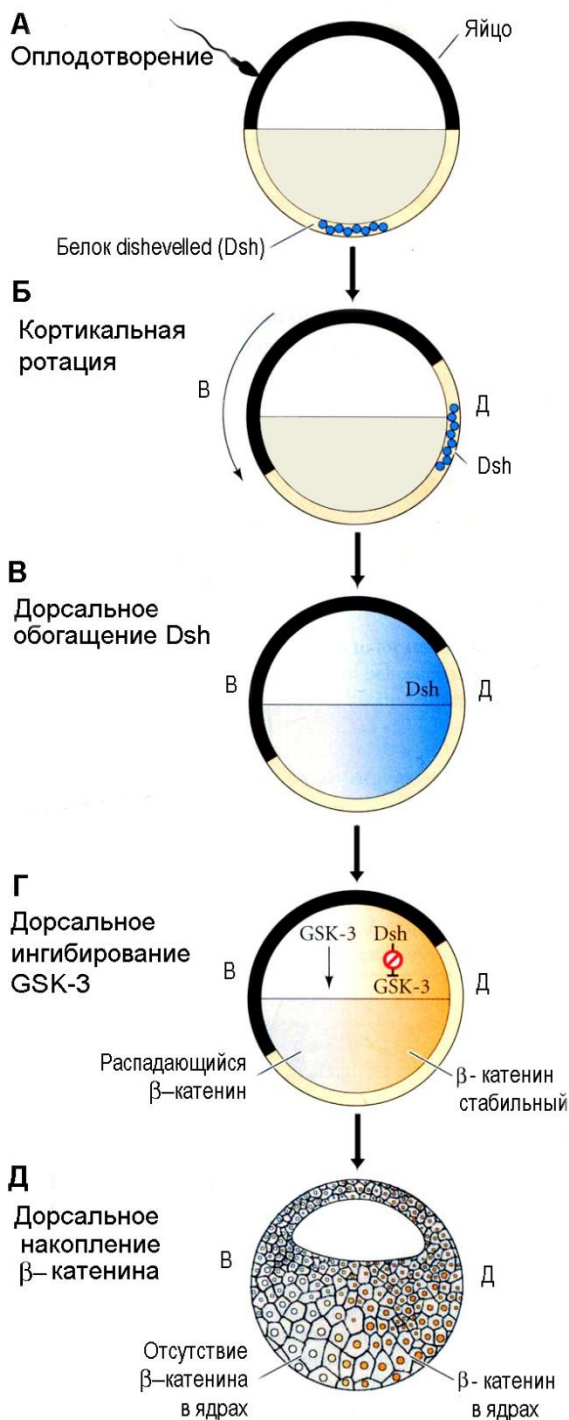
# Параллельные тяжи микротрубочек



# Молекулярные основы кортикальной ротации

Гипотетический механизм, с помощью которого белок Disheveled стабилизирует  $\beta$ -катенин в дорсальной части яйца амфибии.  $\beta$ -катенин – полифункциональный белок, одна из функций которого обеспечить закрепление в плазматической мембране кадгеринов, другая – служить ядерным фактором транскрипции. (А) Disheveled (Dsh) связывается с особым набором белков, сосредоточенных в вегетативном полюсе неоплодотворенного яйца.

(Б) При оплодотворении эти белковые пузырьки перемещаются вдоль тяжей субкортикальных микротрубочек в дорсальном направлении. (В) После этого Disheveled высвобождается из пузырьков и распределяется на будущей дорсальной трети 1-клеточного зародыша. (Г) Disheveled связывается с киназой 3 гликозилтрансферазы (GSK-3) и блокирует ее действие, препятствуя деградации  $\beta$ -катенина на дорсальной стороне зародыша. (Д) Ядра бластомеров в дорсальной области зародыша получают  $\beta$ -катенин, в то время как ядра бластомеров во внезародышевой области его не получают.

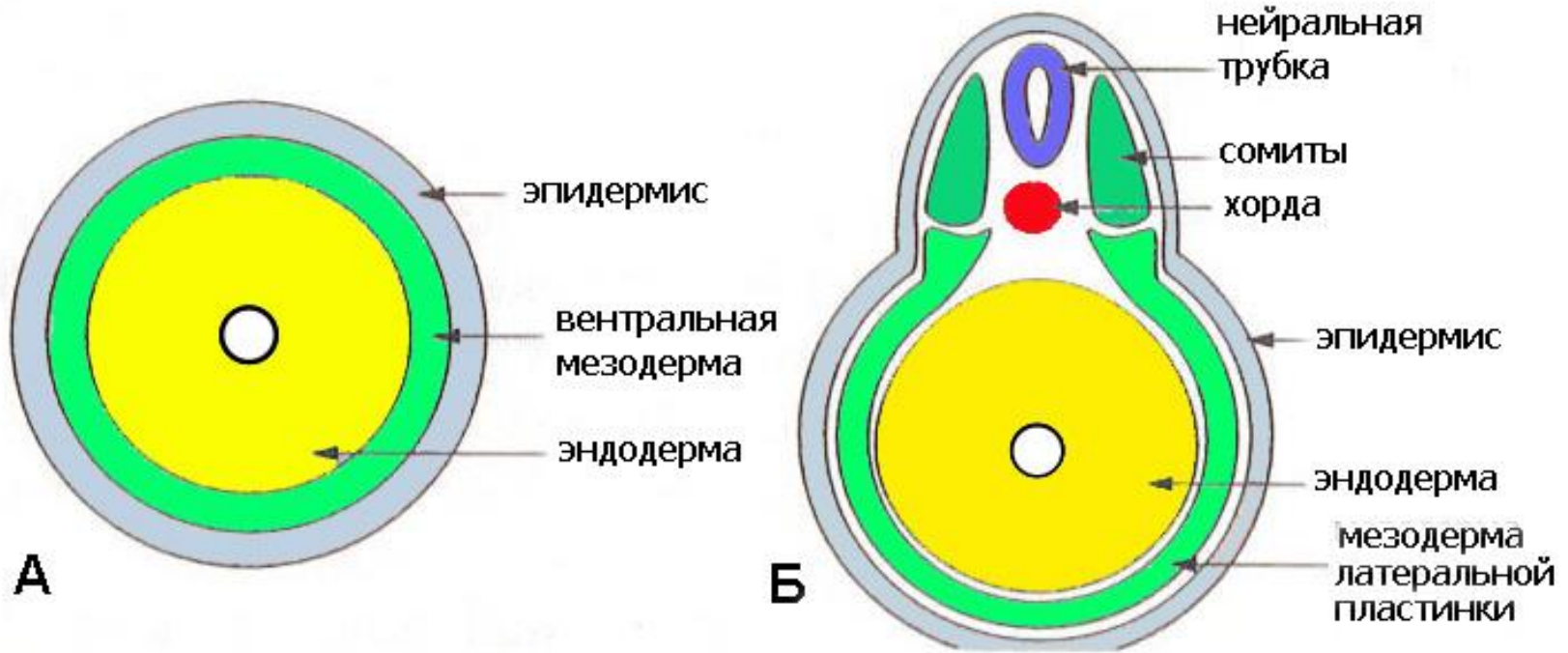


## ***Эксперименты с получением «вентрализованных» зародышей.***

Ингибирование кортикальной реакции (действие пониженных температур, облучения ультрафиолетом, ингибиторов полимеризации тубулинов) приводит к возникновению цилиндрически симметричного зародыша. У него отсутствует осевой комплекс зачатков, характерный для позвоночного зародыша.

*Контроль носит явно количественный характер*

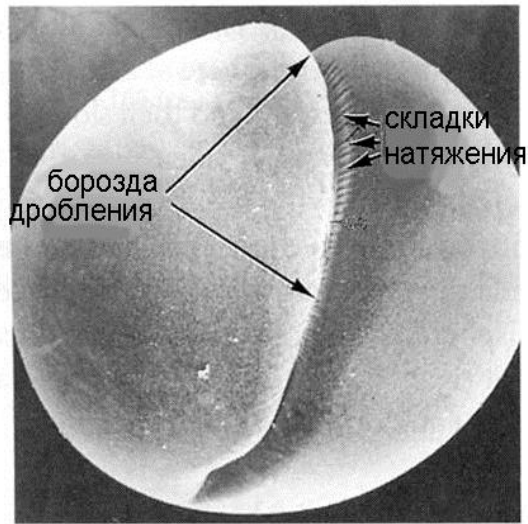
# Морфогенетическое значение ротации



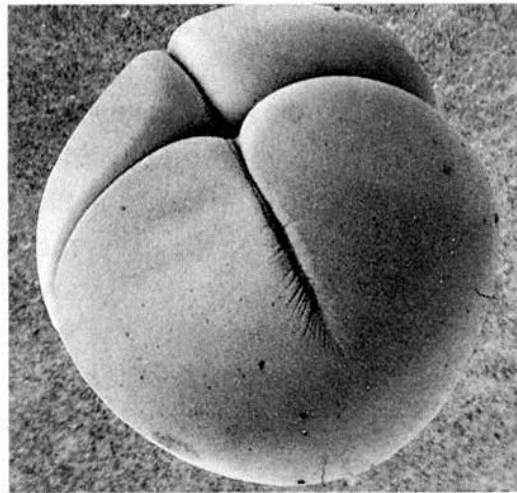
- А – «вентрализованное развитие», вызванное экспериментальным подавлением кортикальной ротации. В результате такого дефективного развития формируется «беспозвоночное» животное.
- Б – нормальное «дорсализованное развитие», приводящее к образованию характерных структур позвоночных, всецело зависит от полноты ротации яйцевого материала после оплодотворения.



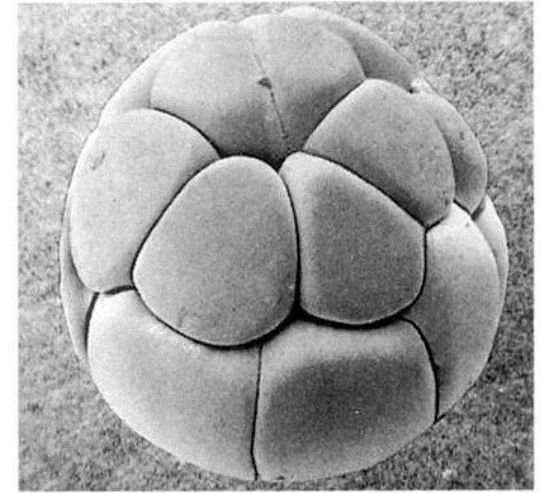
# Радиальное голобластическое дробление яйца Земноводных



А



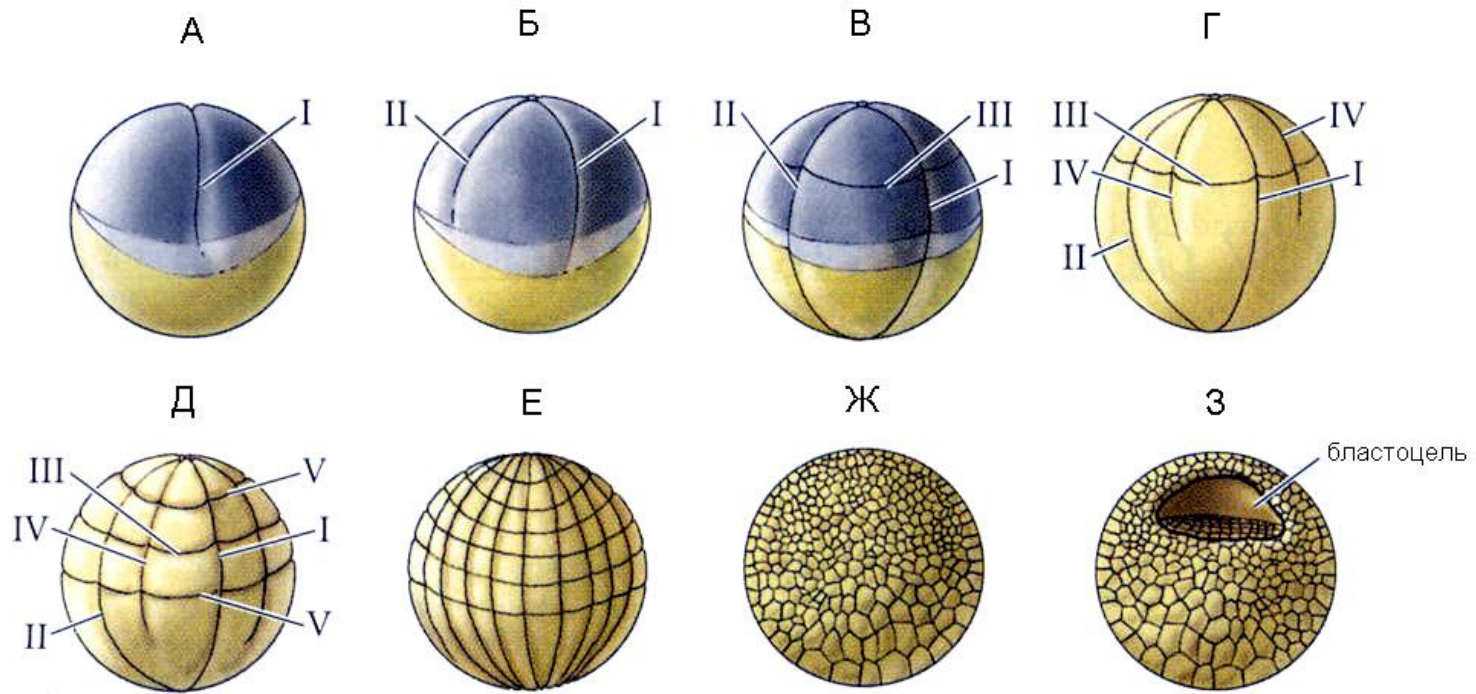
Б



В

СКАН. Ранние стадии полного стереотипного дробления яйца лягушки. (А) Первое меридиональное деление. Врезающаяся борозда. (Б) Второе, также меридиональное деление (4 клетки). Третье - широтное деление приводит к образованию двух квартетов клеток. (В) Результатом четвертого деление (вновь меридионального) является 16-клеточная стадия; хорошо видны различия в размерах клеток анимального и вегетативного полушария.

# Порядок дробления яйца Земноводных

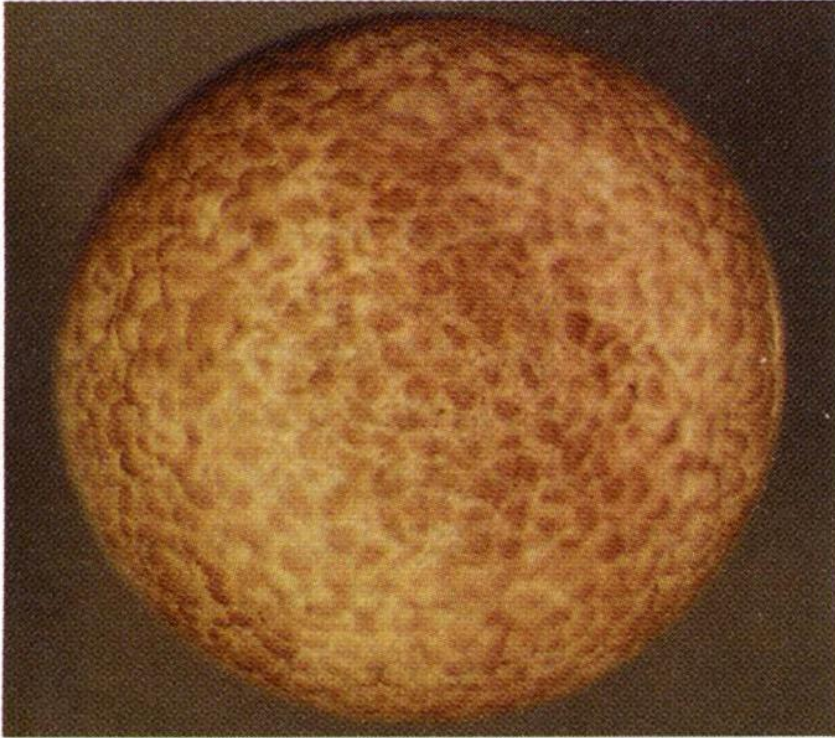


Дробление яйца лягушки. Римскими цифрами обозначены борозды последовательных циклов дробления. (А-Е) Стадии дробления. (Ж-З) Стадия средней бластулы; вид снаружи (Ж) и вид на разрезе (З)



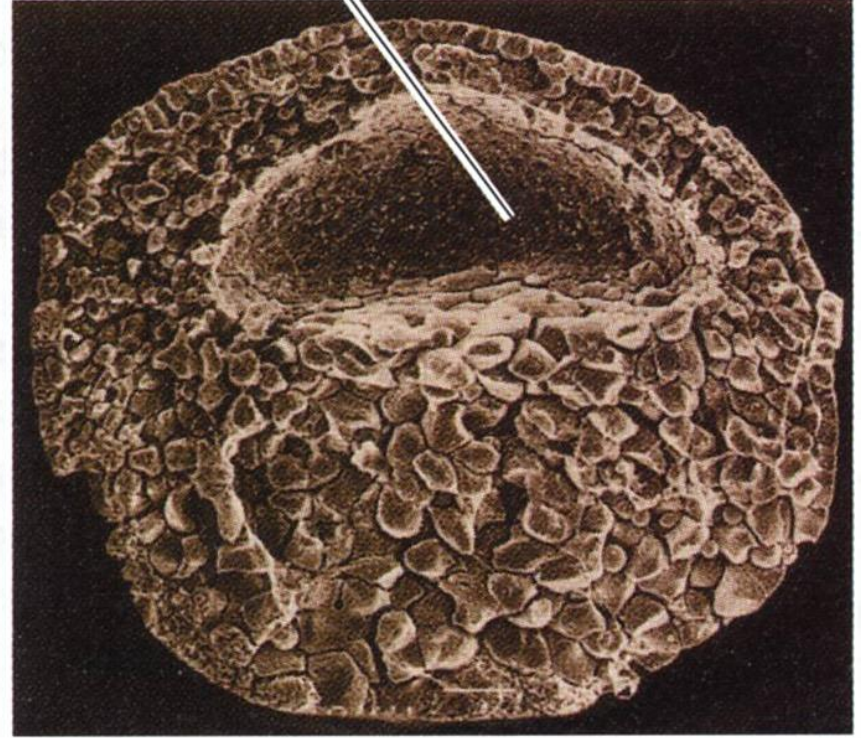
# Поздняя бластула *Xenopus laevis*

**А**



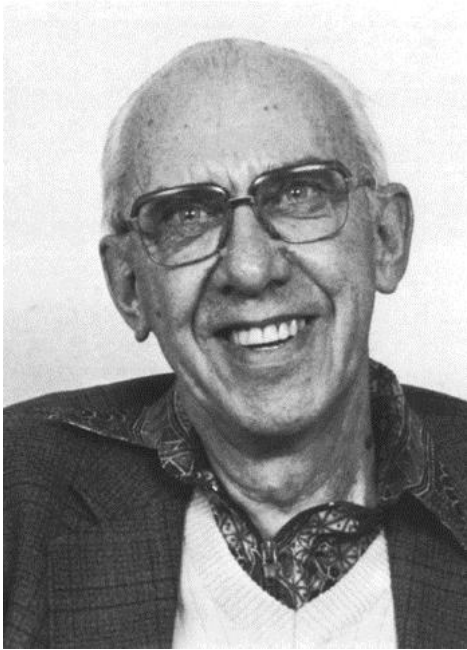
**Б**

бластоцель



(А) внешний вид (яйцевые оболочки удалены); (Б) Поперечный разрез такой бластулы. Виден расположенный в анимальном полушарии бластоцель. Стенки бластоцеля содержат несколько рядов клеток

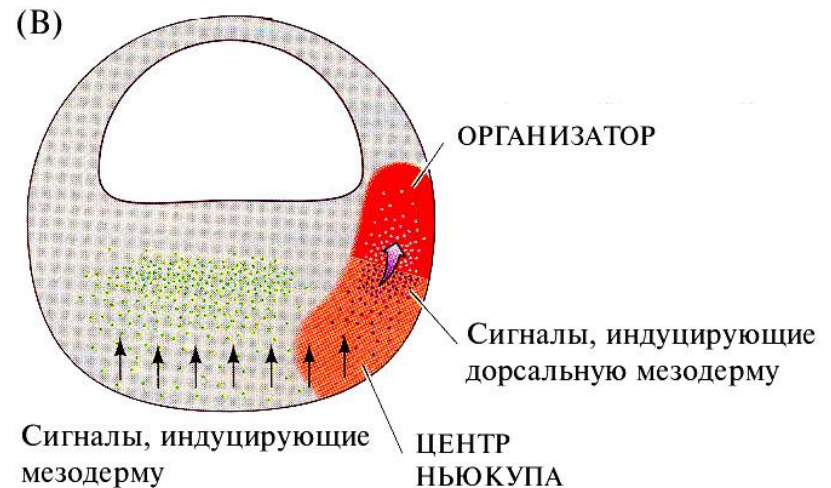
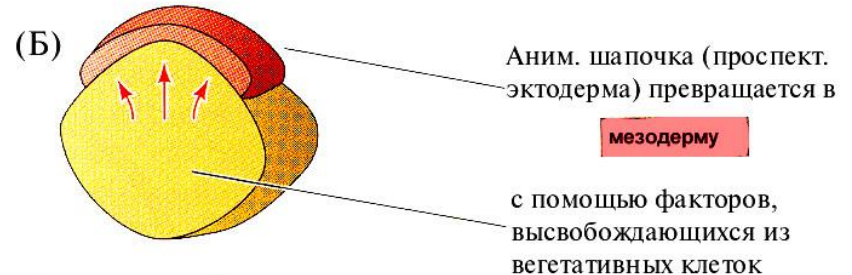
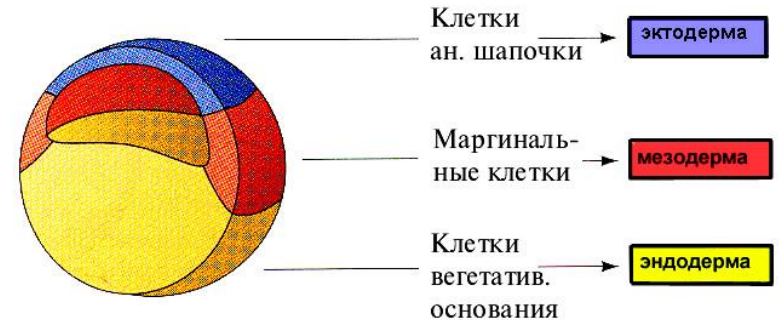
# Ранние индукции в развитии амфибий



Pieter D. Nieukoop  
(1917 – 1996)

Основной ключ к разгадке того, как дорсальная губа бластопора приобретает свои свойства, дали эксперименты Петера Ньюкупа. Он и его коллеги показали, что мезодермальные свойства индуцируются подлежащими вегетативными (презюмтивными эндодермальными) клетками.

(А) Эксплантаты трёх изолированных фрагментов бластулы дают производные разных зародышевых листков



Основной кандидат на роль фактора, формирующего центр Ньюкупа в наиболее дорсальных вегетативных клетках, - **β-катенин**. В зародышах *Xenopus* β-катенин начинает накапливаться в дорсальной области яйца при перемещениях цитоплазмы во время оплодотворения, в ходе раннего дробления β-катенин обнаруживается преимущественно на дорсальной стороне, выявляясь в ядрах дорсальных клеток (Schneider et al., 1996; Larabell et al., 1997). Эта область накопления β-катенина, вероятно, первоначально перекрывает как центр Ньюкупа, так и область организатора. Для позднего дробления характерна специфическая локализация клеток, содержащих высокий уровень β-катенина, в центре Ньюкупа (Heasman et al., 1994a; Guger, Gumbiner, 1995).

β-катенин играет ключевую роль в формировании дорсальной оси, экспериментальное уменьшение количества транскриптов β-катенина антисмысловыми олигонуклеотидами приводит к отсутствию дорсальных структур (Heasman et al., 1994a). Более того, инъекция экзогенного β-катенина в вентральную область зародыша дает вторичную ось (Funayama et al., 1995; Guger, Gumbiner, 1995). β-катенин обеспечивает часть пути передачи сигнала Wnt и негативно регулируется киназой 3 гликогенсинтазы (GSK-3). GSK-3 также играет критическую роль в спецификации дорсовентральной оси, ингибируя развитие ткани по дорсальному пути, в чем можно убедиться в результате введения активированной GSK-3 в яйцо (Pierce, Kimelman, 1995; He et al., 1995; Yost et al., 1996). Нокаут эндогенной GSK-3 в вентральных клетках раннего зародыша доминантным негативным белком приводит к формированию оси в вентральной части зародыша.



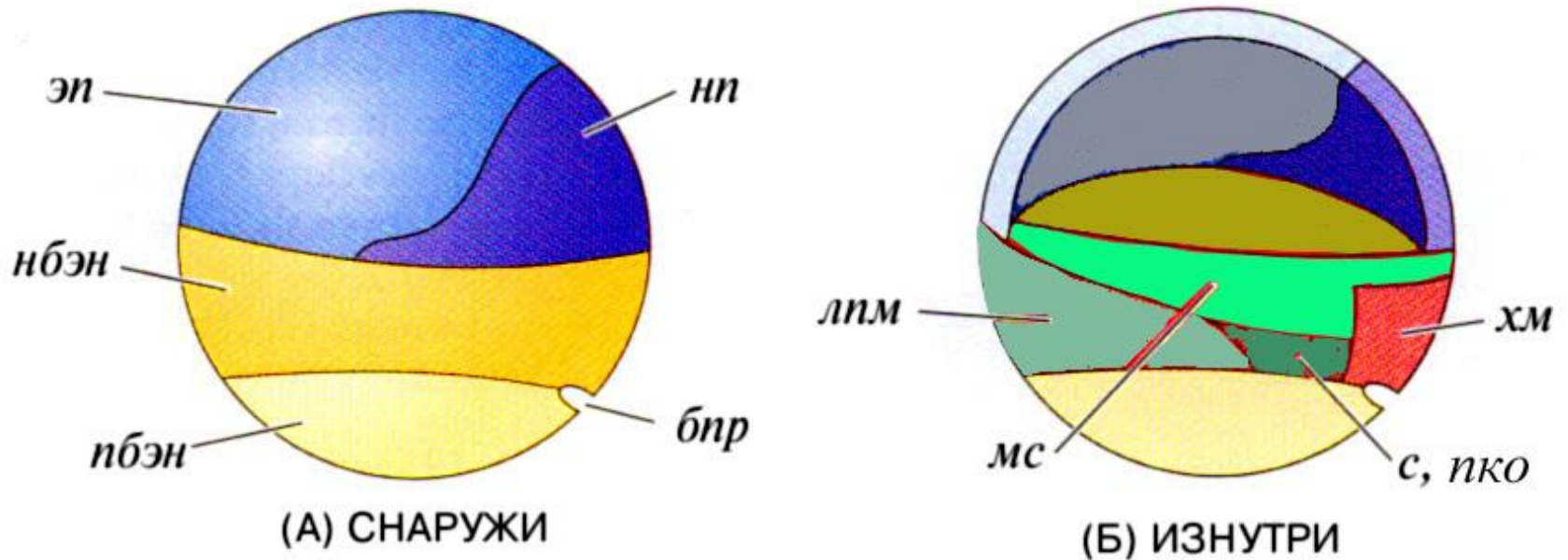
Но каким образом  $\beta$ -катенин оказывается локализованным в ядрах клеток на будущей дорсальной стороне бластулы? Эксперименты с мечением (Yost et al., 1996; Larabell et al., 1997) показали, что  $\beta$ -катенин изначально синтезируется (на материнских матрицах) по всему зародышу, но специфически деградирует в вентральных клетках в результате фосфорилирования, опосредованного GSK-3. Решающим событием в детерминации оси может быть перемещение ингибитора GSK-3 в цитоплазму напротив места вхождения спермия (то есть к будущим дорсальным клеткам). Одним из кандидатов на роль такого агента является белок Disheveled. Этот белок, служащий нормальным репрессором GSK-3 на пути Wnt, впервые обнаруживается в вегетативном кортексе неоплодотворенного яйца *Xenopus*. Однако после оплодотворения Disheveled транслоцируется вдоль лучей, образуемых микротрубочками, на дорсальную сторону зародыша. В результате здесь, на дорсальной стороне зародыша  $\beta$ -катенин будет оставаться стабильным, так как GSK-3 не может вызвать его деградации, в то время как на вентральной стороне он деградирует под её влиянием.

## **Карты презумптивных зачатков в начале гаструляции у *Anura* и у *Caudata* (*Urodela*).**

Разработав оригинальный метод витального окрашивания с помощью кусочков *агар-агара*, осторожно помещаемых на поверхность зародыша, Фогт (1925) получил неоспоримые свидетельства сложных движений групп клеток гаструлы. В последующем маркирование клеток (бластомеров) различными способами, прослеживание их движений в моменты активных перестроек в зародышах (при гаструляции) и определение их дефинитивной судьбы в свое время явилось величайшим достижением экспериментальной аналитической эмбриологии (W. Vogt, 1929). В настоящий момент существуют разные способы маркирования: это и витальные красители, частички мела, радиоактивное включение ( $^3\text{H-Tdr}$ ), разнообразные флюорохромы (в т.ч. и иммунофлюоресцентное маркирование), кариомаркирование, генетические маркеры. Сконструированные с помощью этих методов карты распределения клеток разных судеб показали, что судьба клеток бластулы Земноводных зависит от того, локализованы ли клетки в поверхностных или в глубинных слоях зародыша ★. В частности, предшественники мезодермы у *Xenopus* располагаются преимущественно в клетках глубинного слоя, тогда как эндодерма и эктодерма происходят из наружного слоя клеток зародыша. Большинство предшественников хорды и других мезодермальных тканей локализованы под поверхностью в экваториальной (маргинальной, или краевой) области зародыша. У **хвостатых амфибий** (таких как тритоны или аксолотли) и у некоторых лягушек, исключая *Xenopus*, значительное количество клеток-предшественниц хорды и мезодермы располагается среди поверхностных клеток ★ (Purcell, Keller, 1993; Shook et al., 2002).

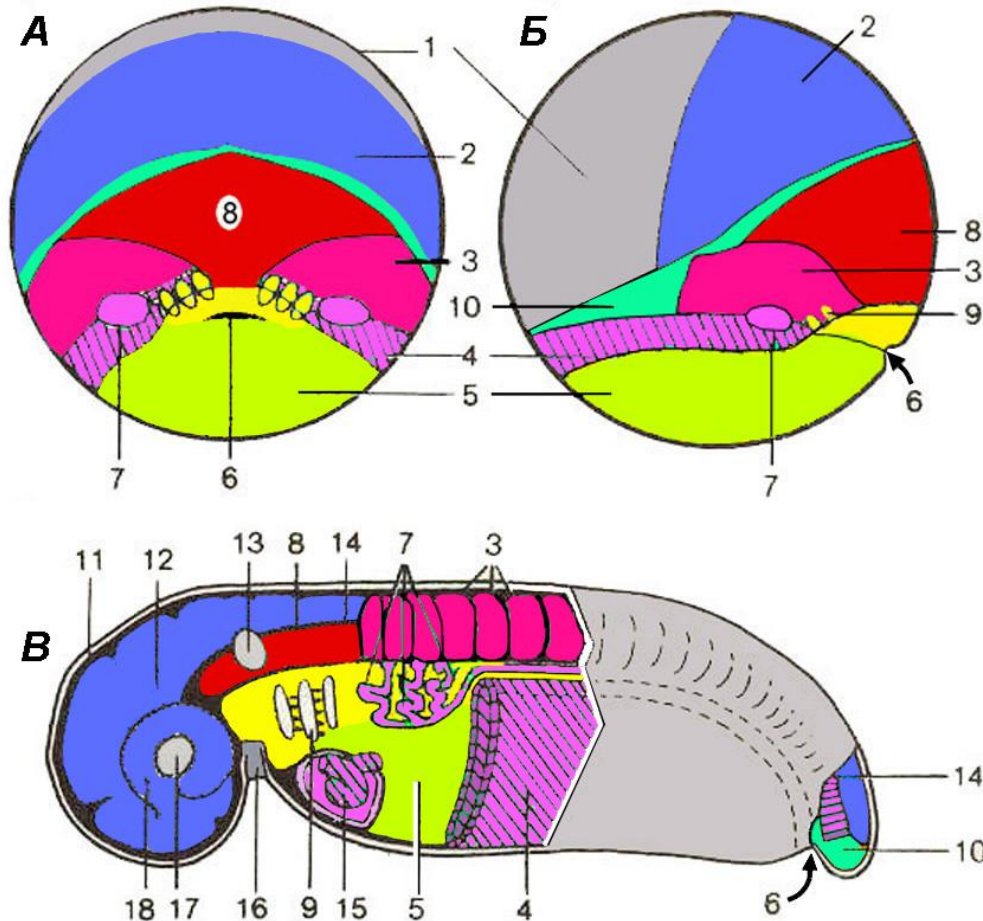
Как мы уже видели, неоплодотворенное яйцо обладает **анимально-вегетативной полярностью**. Это дает возможность построить карту перспективных зародышевых листков в ооците до оплодотворения. Поверхность анимального полушария даст клетки эктодермы.

## Карты презумптивных зачатков зародыша *Xenopus laevis* перед началом гастрюляции



*Эп* – покровная эктодерма, *нп* – нейральная пластинка, *бпр* – бластопор, *нбэн* – эндодерма свода архентерона, *пбэн* – эндодерма дна архентерона, *лпм* – мезодерма латеральной пластинки, *хм* – хордомезодерма, *мс* – мезодерма сомитов, *с, пко* – мезодерма сердца и мезодерма передних кровяных островков,

# Карты презумптивных зачатков зародышей тритона к началу гаструляции



А – вид со стороны бластопора (6), Б – вид слева, В – локализация образующихся органов на стадии фарингулы.

1 – покровная эктодерма образует эпидермис (11), хрусталик (17), слуховой пузырёк (13) и стомодеум (16); нейральная эктодерма (2) образует нейральную трубку с головным (12), спинным мозгом (14) и глазным бокалом (18). 8 – хорда, 3 – сомиты, 4 – боковые пластинки, 15 – сердце, 10 – материал хвостовой почки, 7 – пронефрос. Эндодерма (5) занимает снаружи вегетативную область ранней гаструлы и образует позднее кишку с жаберными щелями (9). 6 – анус.



# Клеточные движения гаструляции Земноводных

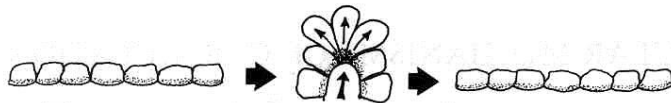
# Клеточные трансформации и транслокации в ходе гастрюляции у *Xenopus*

## Четыре основных типа клеточных транслокаций



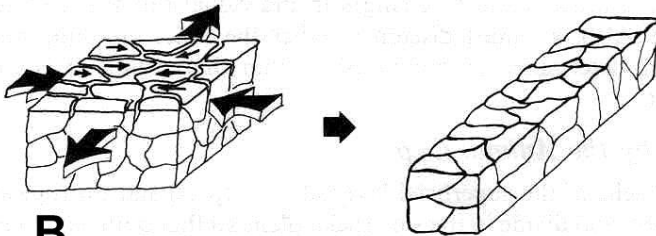
**A**

A – радиальная интеркаляция в ани-  
мальной шапочке



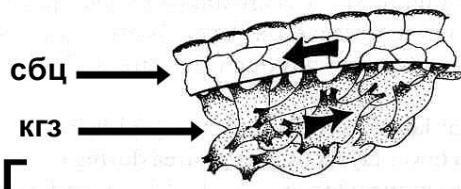
**Б**

Б – трансформация бокаловидных  
клеток



**В**

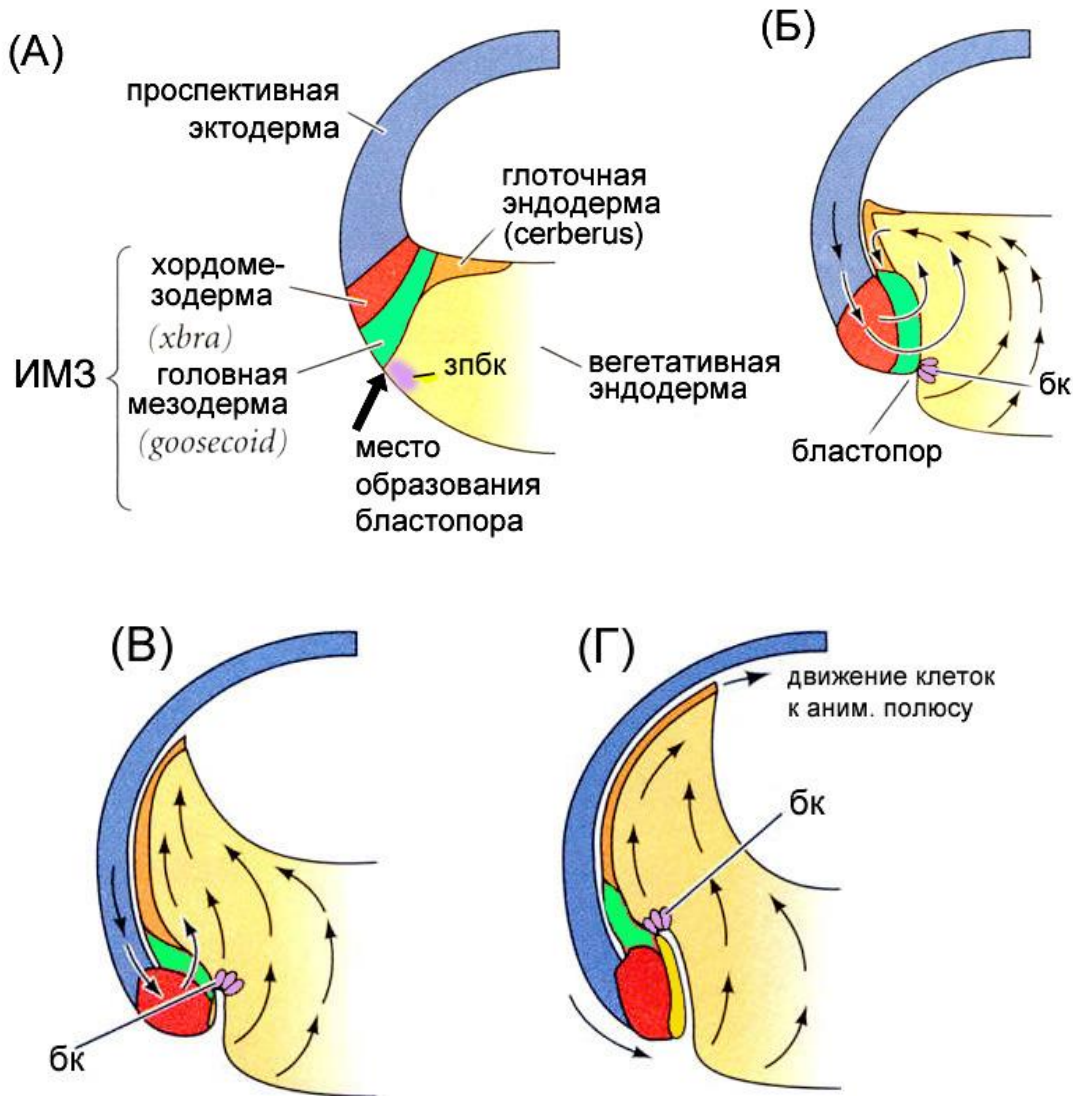
В – интеркаляция в ходе конвергент-  
ного удлинения,



**Г**

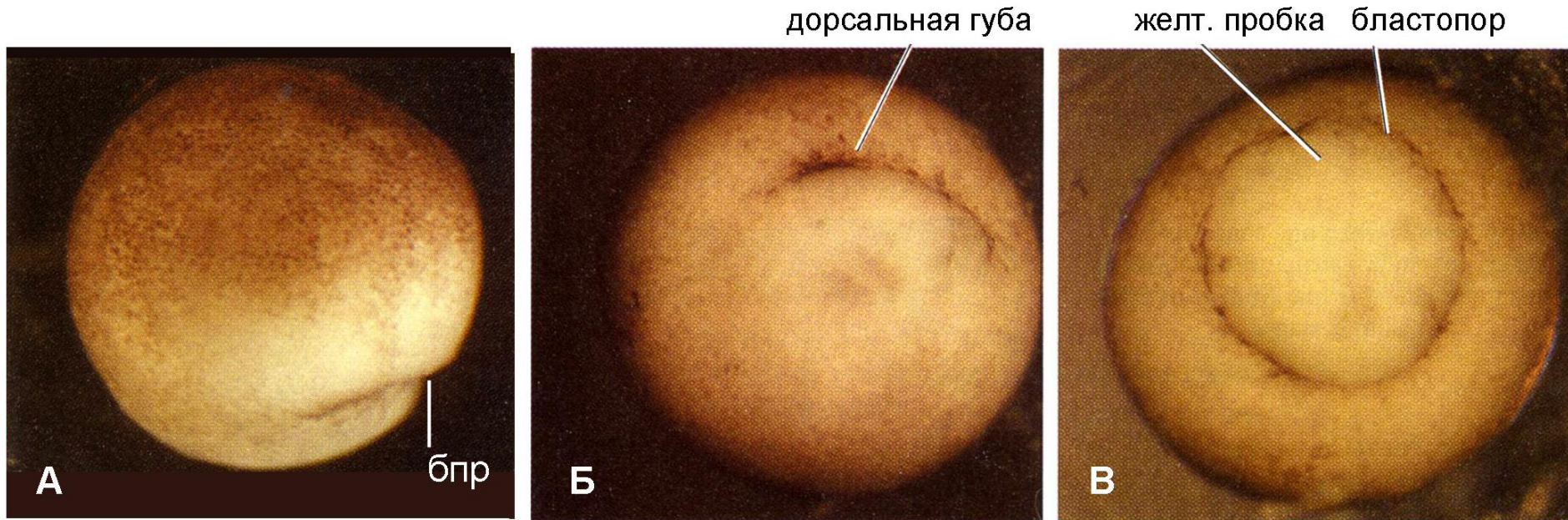
Г – перемещение «спянной популя-  
ции» клеток глубинной зоны

## Ранние движения гаструляции у зародыша *Xenopus*. Вегетативная ротация.



(А) В начале гаструляции формируется инволюирующая маргинальная зона (ИМЗ). (Б) Вегетативная ротация (стрелки) перемещает проспективную эндодерму глотки к стенке бластоцеля. (В,Г) Движения вегетативной эндодермы направляют эндодерму глотки вперед, ориентируя движение пока еще пассивной мезодермы внутрь зародыша и в сторону анимального полюса. Становится заметной щель архентерона (гастроцеля), которая постепенно удлиняется по мере углубления её фронта, в основании которого находятся бутылковидные клетки, всё ещё сохраняющие свою необычную форму.

# Преобразование бластопора у Xenopus

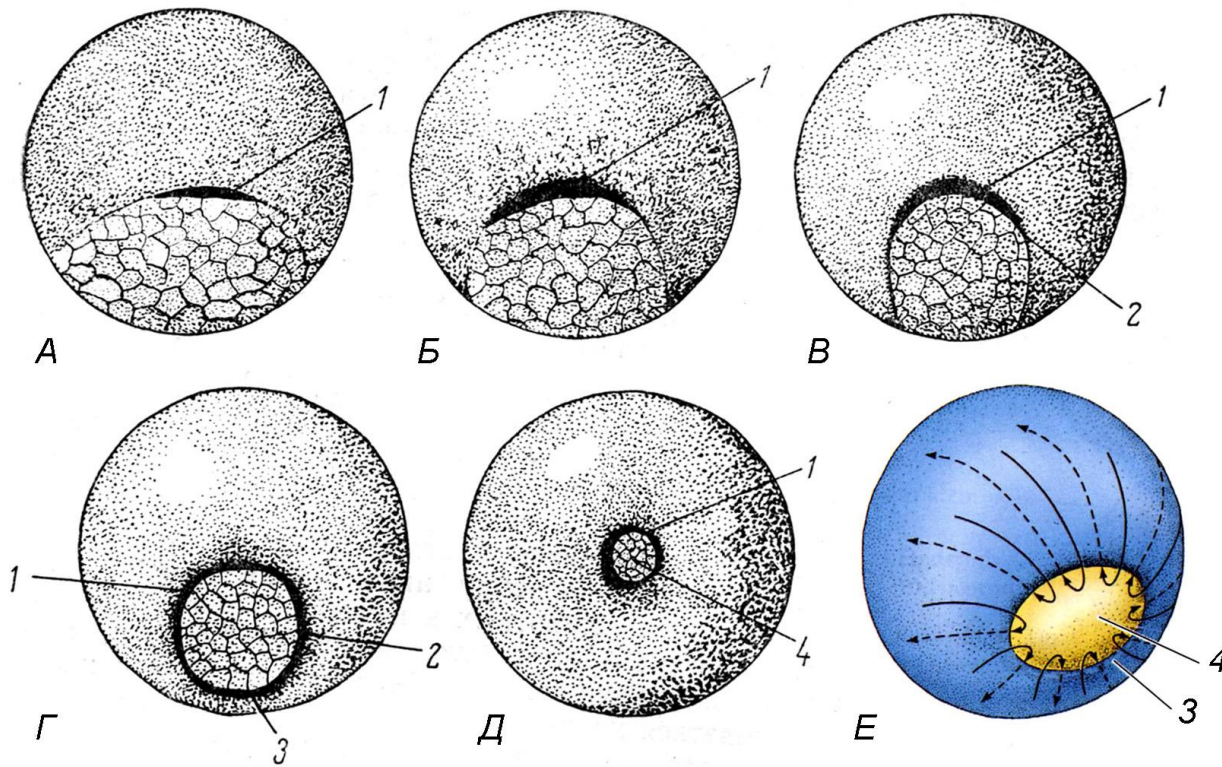


**А** – начало гастрюляции. Гастрюляция начинается процессом инвагинации, в результате которого образуется щелевидный бластопор (бпр) на будущей дорсальной стороне эмбриона. **Б** – та же стадия развития, но вид с вентральной поверхности. **В** – разгар гастрюляции. Щель бластопора приобретает форму кольца, от края которого внутрь перемещаются будущие клетки мезодермы, на поверхности зародыша останутся клетки эктодермы. В центре – клетки эндодермы в виде т.н. «желточной пробки».

Из Gilbert (2003)



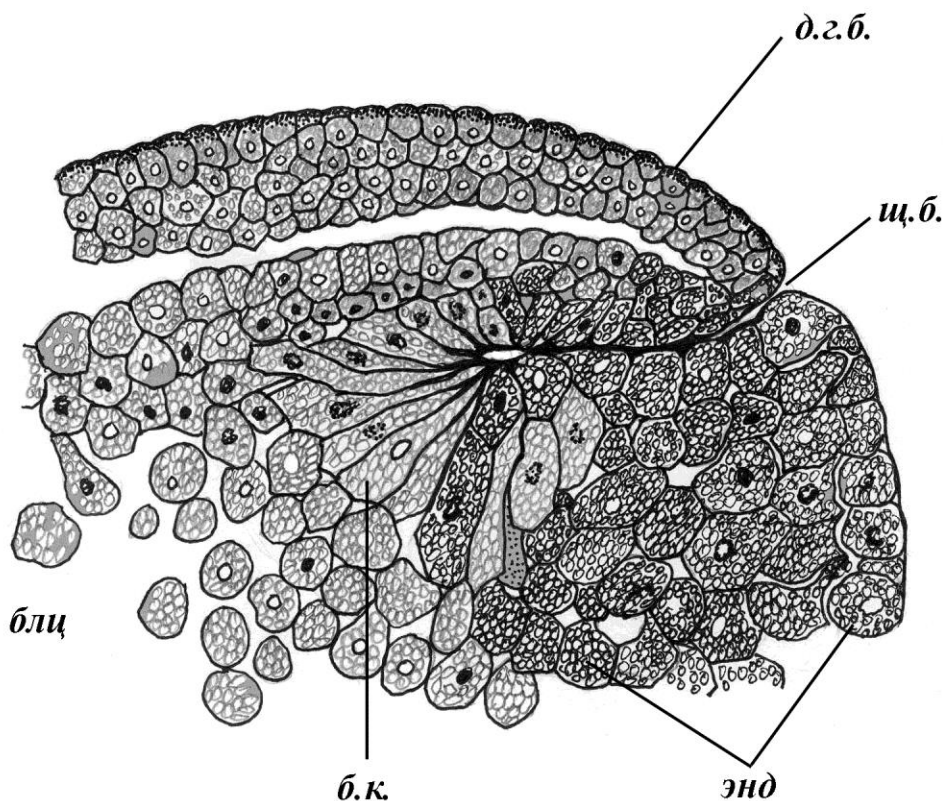
# Внешние признаки гастрюляции у лягушки



Вид со стороны будущего заднего конца зародыша. А, Б – возникновение серповидной бороздки (дорсальной губы бластопора 1). В – образование боковых губ бластопора (2). Г – возникновение вентральной губы (3) и завершение формирования бластопора. Д – concentрическое замыкание бластопора [видна желточная пробка (4)]. Е – движения эпителии эктодермы (сплошные стрелки) и инволюция мезодермальных клеток (пунктирные линии), перемещающихся через бластопор внутрь и затем под поверхность в обратном направлении.

# Начало инволюции у травяной лягушки

## *Rana temporaria*



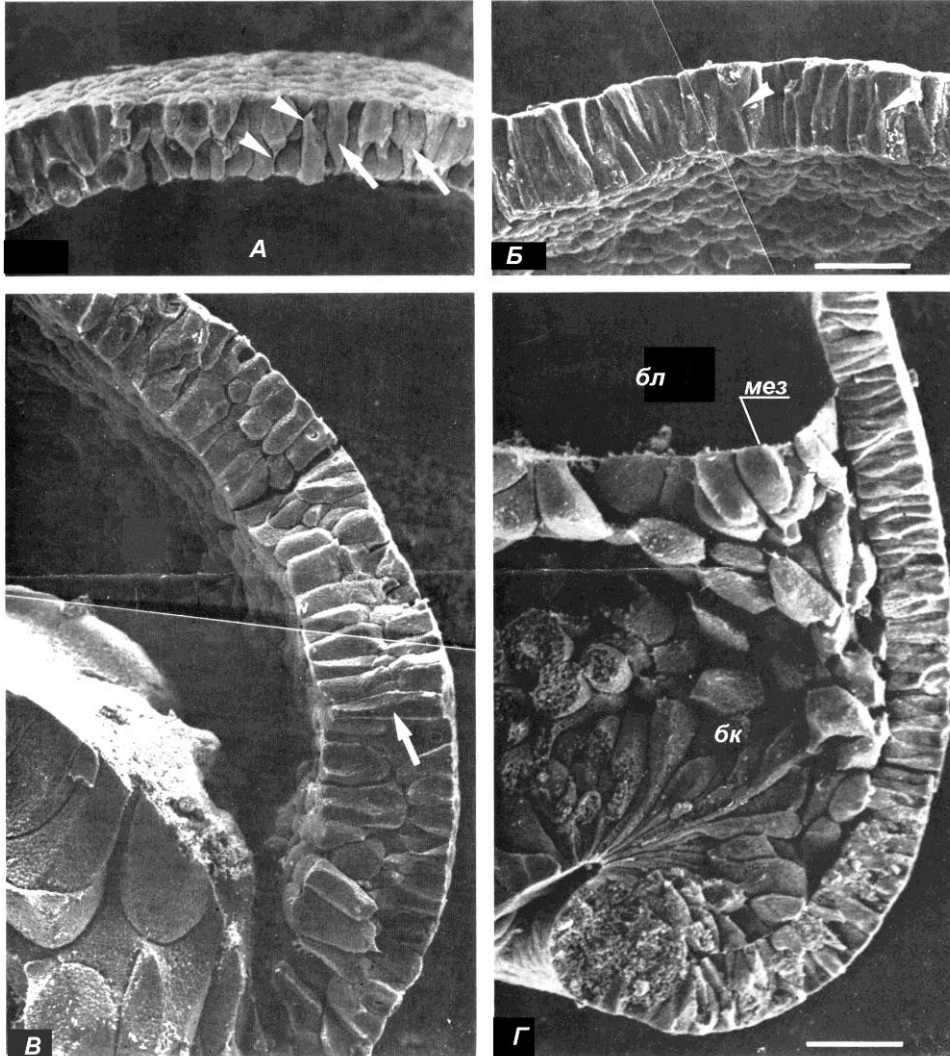
Окрашенный сагиттальный срез зародыша лягушки на стадии ранней гаструлы в области дорсальной губы бластопора.

Обозначения: б.к. – бутылковидные клетки; блц – бластоцель; дгб – дорсальная губа бластопора; щ.б. – щелевидный бластопор; энд – клетки вегетативного основания – клетки эндодермы.

Оригинальный рисунок, выполненный с препарата из кафедральной коллекции.



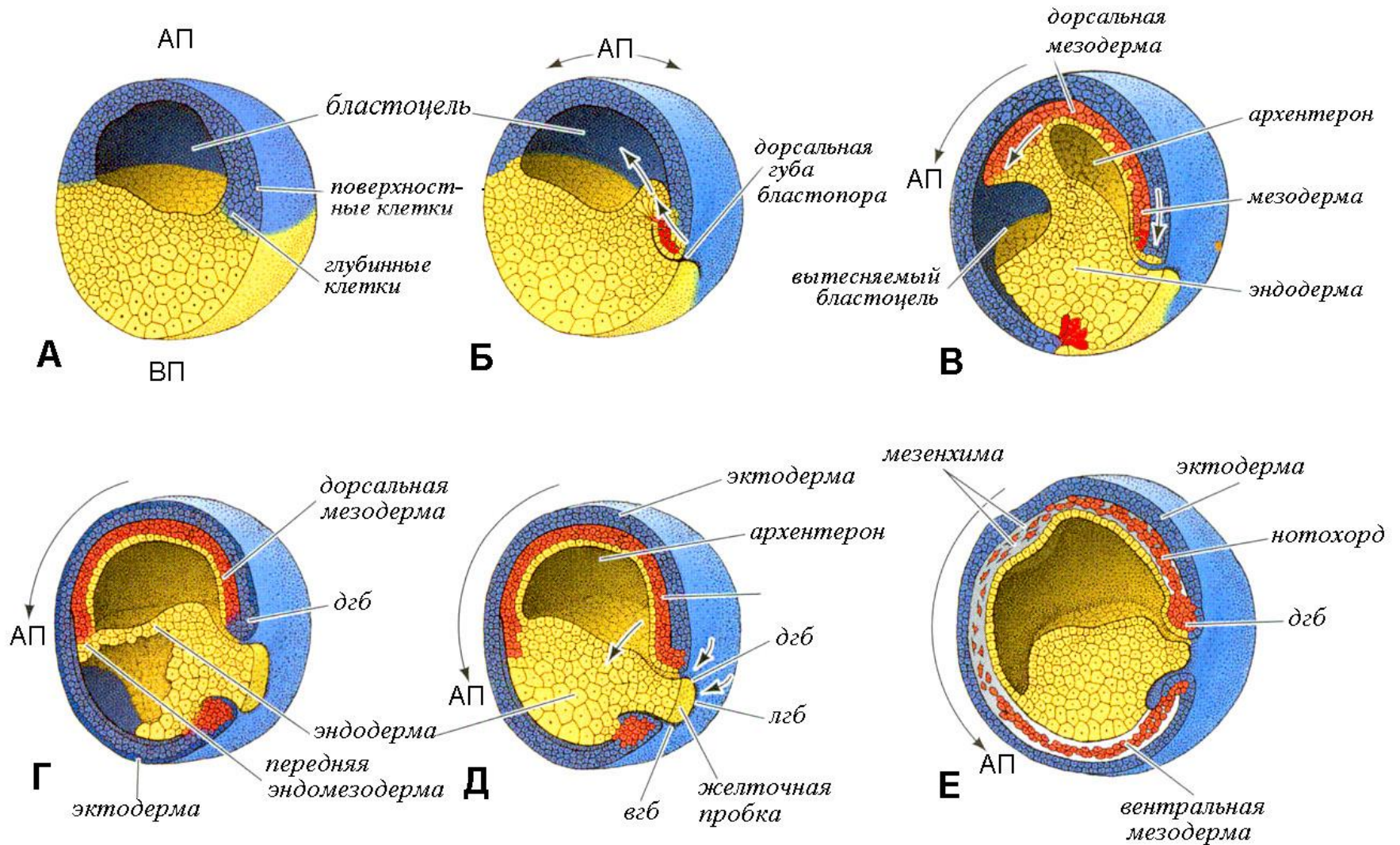
## Радиальная интеркаляция клеток в стенке бластулы *Pleurodeles valtli*



Различие в локализации презумптивных зачатков перед началом гаструляции и в ходе гаструляции у Anura и Caudata определяется многослойностью свода бластоцеля и области губ бластопора у первых и однослойностью его у вторых.

На фото (А и Б) свода бластоцеля и (В и Г) дорсальной губы бластопора зародышей тритона *Pleurodeles valtli*, полученных с помощью СЭМ, показан постепенный, по мере приближения к началу гаструляции, переход к однослойности

# Последовательность движений гаструляции Земноводных



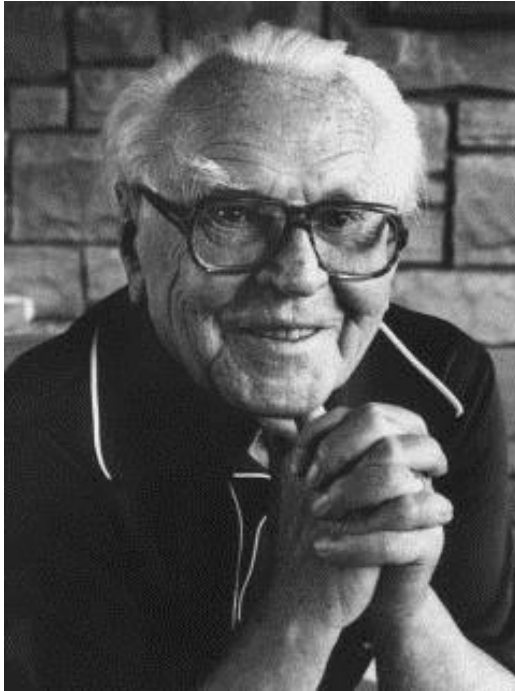


*Пояснение к предыдущему слайду «Последовательные стадии (А-Е) гаструляции у Земноводных»*

(А) Стадия поздней бластулы; (Б) Стадия ранней гаструлы. Вслед за кратковременной инвагинацией бутылковидных клеток начинается инволюция поверхностных клеток дорсальной губы бластопора. АП обозначает положение анимального полюса, который, по мере развития, будет постепенно перемещаться. (В) и (Г) Средине гаструляции. Образуется архентерон (гастроцель), который оттесняет уменьшающийся в объеме бластоцель. Начинается миграция клеток из боковых и вентральной губ бластопора внутрь эмбриона. Клетки анимального полушария перемещаются в направлении вегетативной области, смещая бластопор к области вблизи вегетативного полюса. (Д) и (Е) Ближе к концу гаструляции бластоцель исчезает, а эмбрион постепенно полностью покрывается эктодермой. При этом бластопор сужается (как стягивается табачный кисет), эндодерма интернализуется, а мезодермальные клетки располагаются между эктодермой и эндодермой, образуя мезенхимную мантию; в какой-то момент этих событий лишь совсем небольшая часть вегетативной эндодермы просматривается в виде т.н. «желточной пробки».

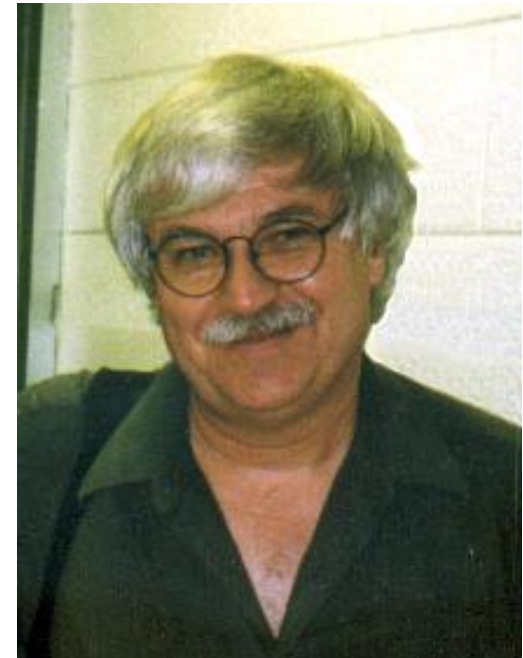
*Не показаны конвергентные движения клеток, приводящие к удлинению тела эмбриона*

Какие силы в гастрале амфибий обеспечивают инволюцию и удлинение гастроцеля? Существуют два мнения.



*Углубление и удлинение архентерона обеспечивают бутылковидные клетки, выступающие в роли своеобразного тягача.*

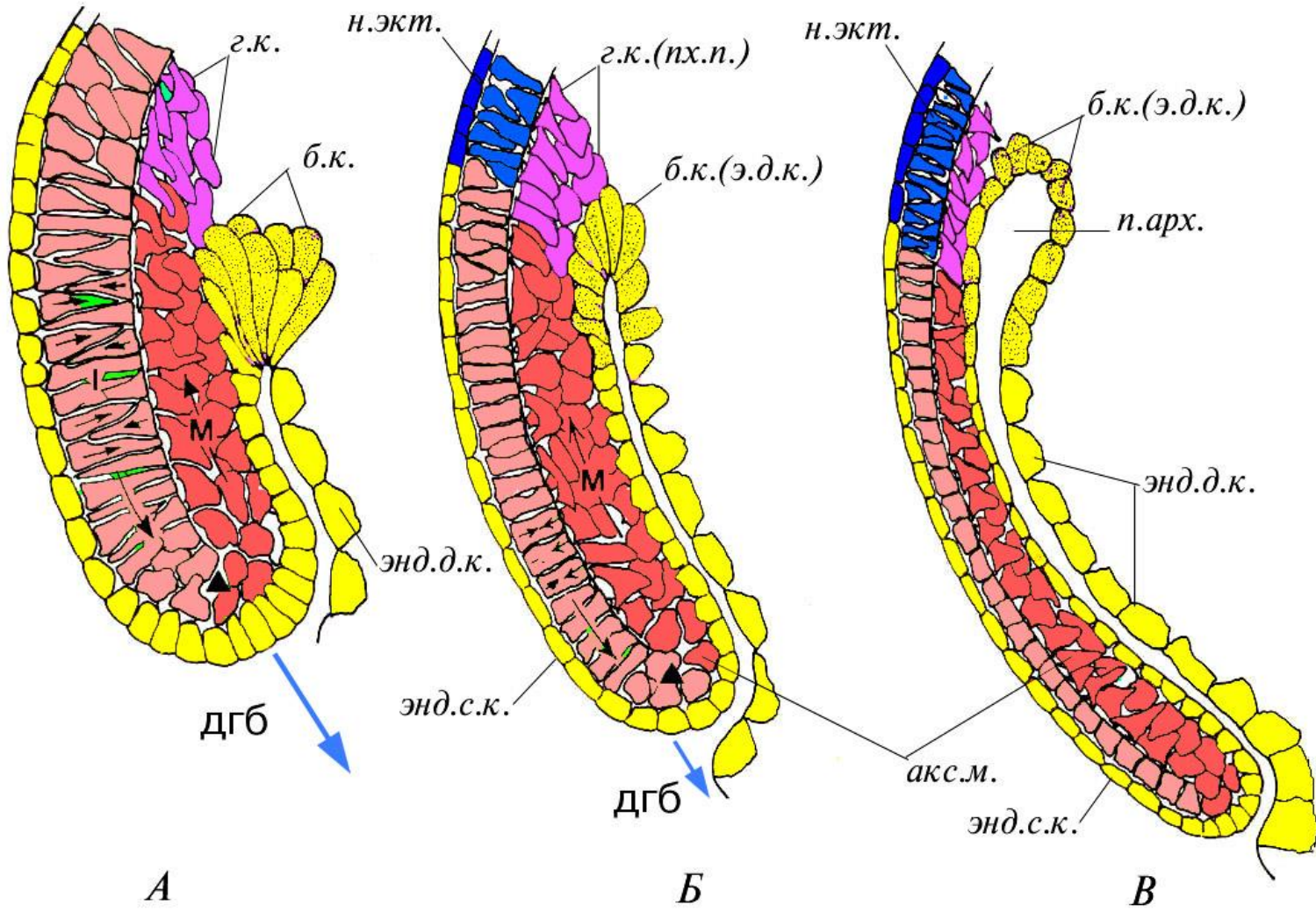
Иоганн Гольцфретер (1943, 1944)



*Своеобразное изменение формы бутылковидных клеток необходимо лишь для инициации гастрюляции через образование щелевидного бластопора. Главным двигателем инволюции является перемещение подповерхностных (глубинных) клеток маргинальной зоны.*

Рэй Келлер (1981)

# Поведение клеток дорсальной губы бластопора в ходе гастрюляции у *Xenopus*



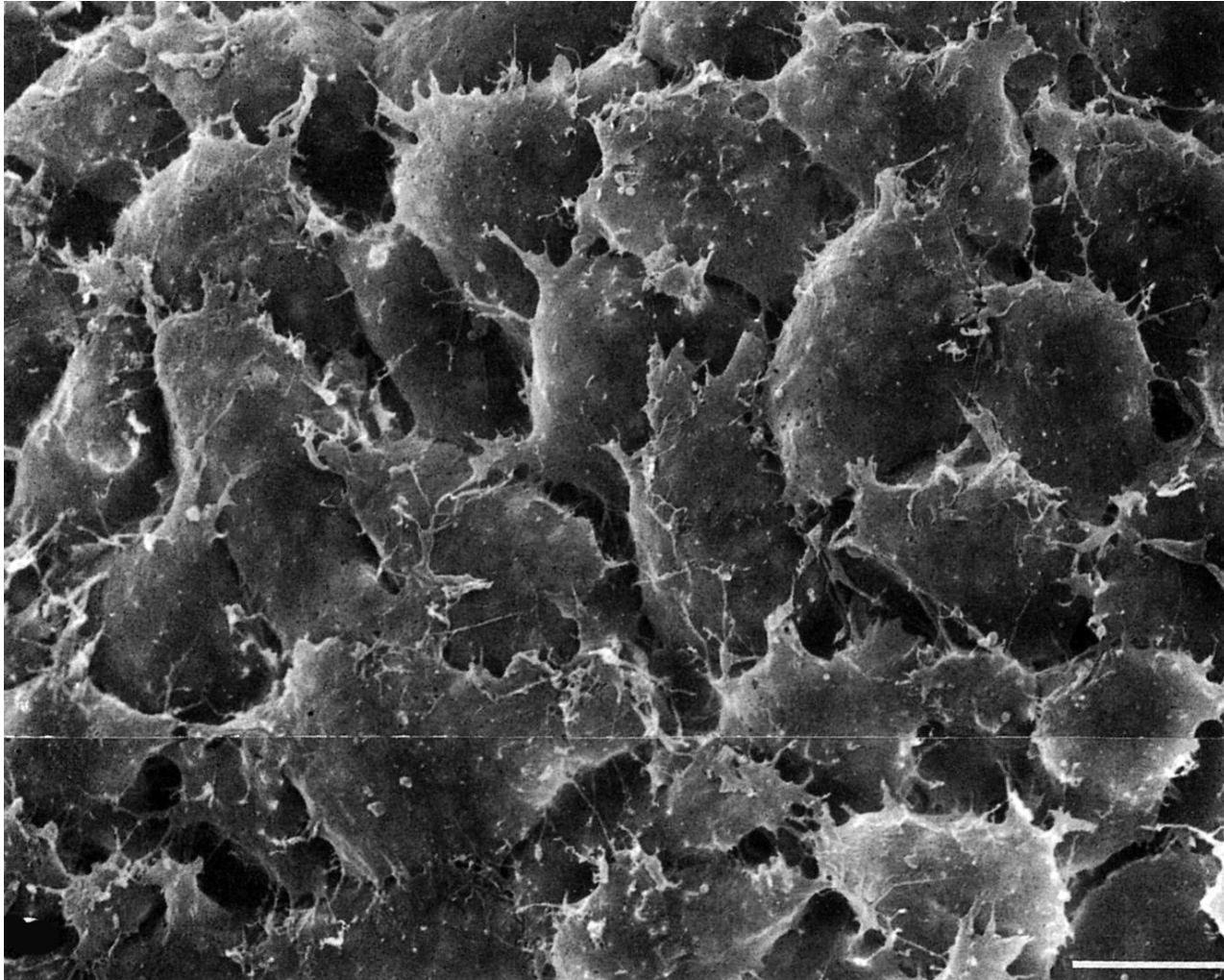
# Поведение клеток дорсальной губы бластопора в ходе гастрюляции у *Xenopus*

Пояснения к предыдущему слайду

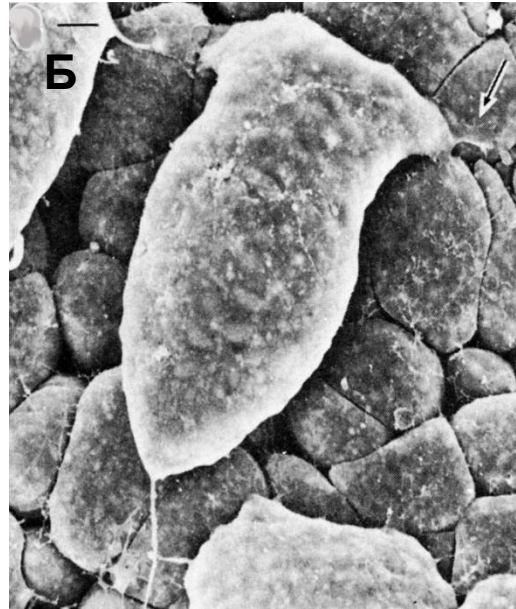
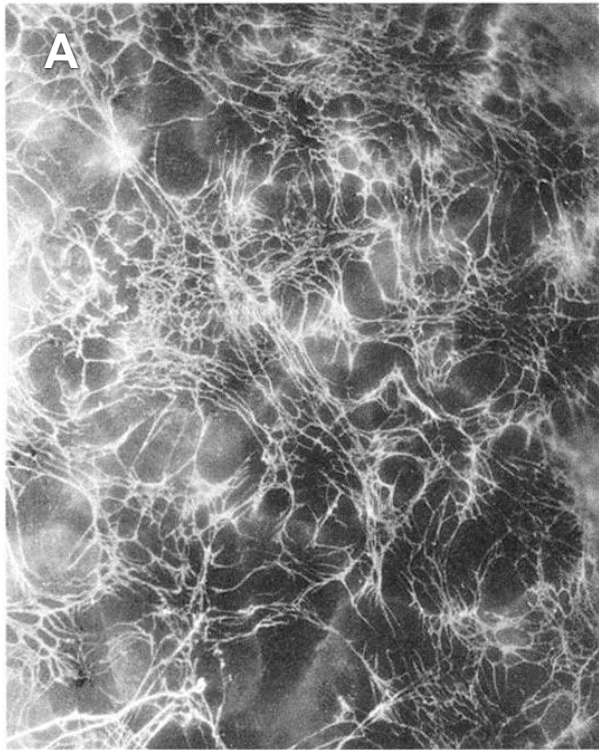
- Черным треугольником обозначен край дорсальной губы бластопора (место смены направлений движения клеток после **инволюции**, показано длинными стрелками). Встречными стрелками промежуточного размера вдоль осей клеток обозначены движения **интеркаляции** при **конвергентном удлинении** и сужении слоя внутренней инволюирующей маргинальной зоны. Самыми мелкими встречными стрелками обозначено уплощение клеток, обеспечивающее движение **экстензии** при сужении бластопора. Голубой стрелкой за пределами дорсальной губы бластопора показано движение **обдукции (эпиболии)**.
- Обозначения: *дгб* – дорсальная губа бластопора; *акс.м.* – аксиальная мезодерма (хорда); *б.к.* – бутылковидные клетки (*энд.д.к.* – эндодерма дна кишки); *г.к.* – глубинные клетки; *пх.п.* – прехордальная пластинка; *м* (со стрелкой) – движение клеток мезодермы; *н.экт.* – нейральная эктодерма; *п. арх.* – полость архентерона; *энд.с.к.* – эндодерма свода кишки;



# Осевая мезодерма зародыша земноводных

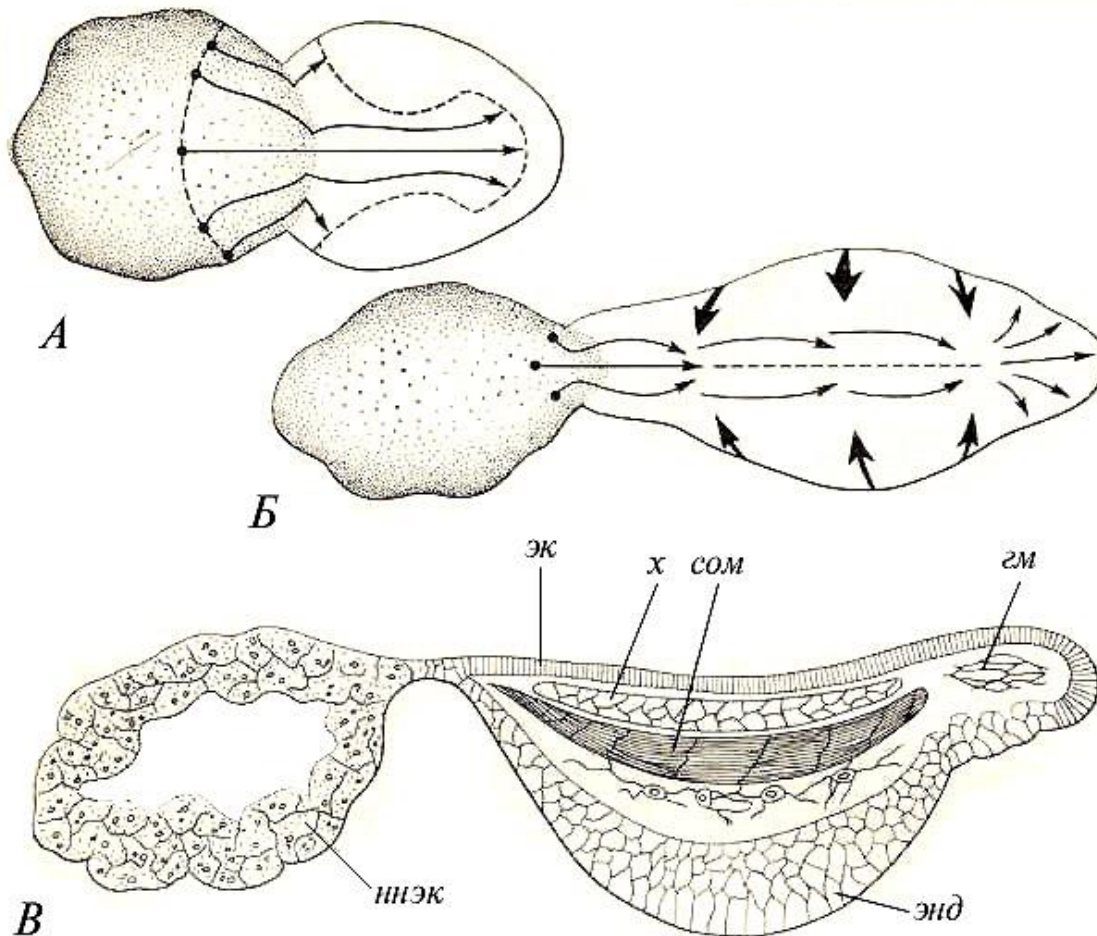


# Движитель инволюции в гаструляции земноводных (роль фибронектина)



Основным средством удлинения гастроцеля является инволюция подповерхностных (глубинных) клеток инволюирующей маргинальной зоны, которые отличаются высокой протрузионной активностью (Б) и аффинитетом к элементам ВКМ и, в частности, к фибронектину, выстилающему к началу гаструляции свод бластоцеля (А).

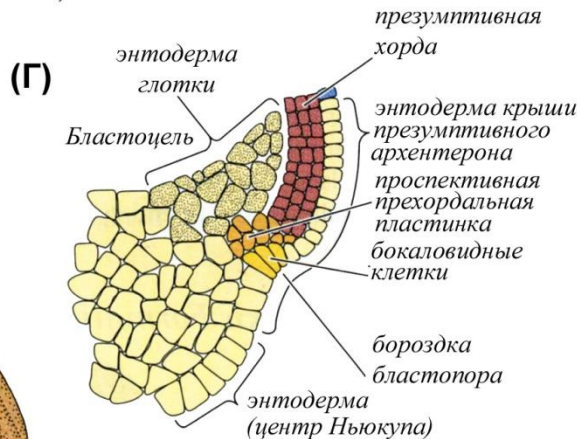
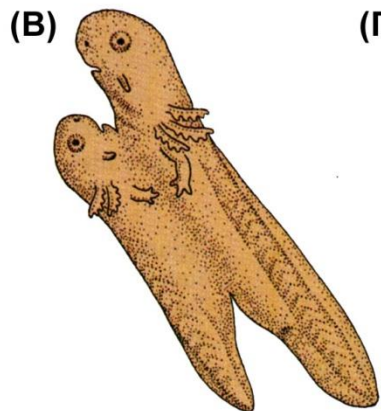
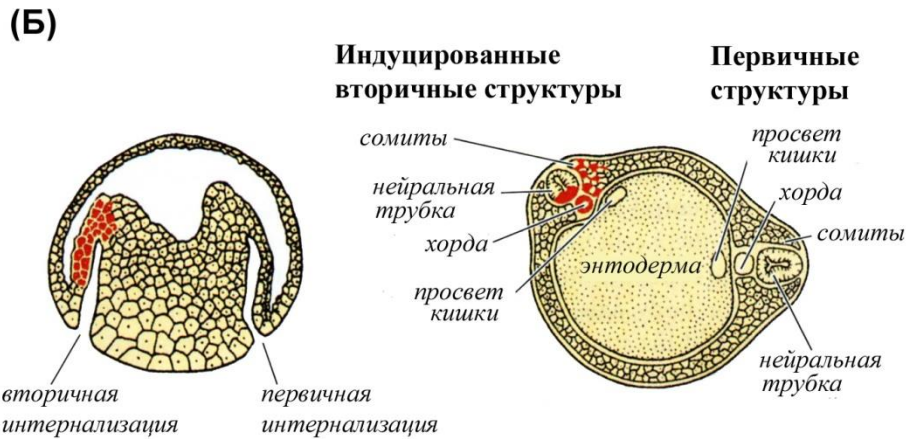
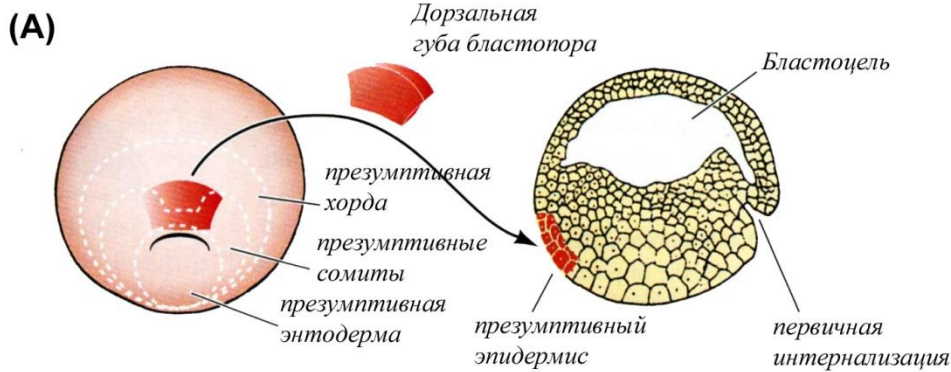
## Экзогастрюляция в развитии Земноводных и её последствия



ЭГ (от греч. *éxō* – вне, снаружи и *гастрюляция*) – нарушения процесса гастрюляции у зародышей многоклеточных животных, заключающиеся в изменении обычного направления клеточных движений. Имеет место при неблагоприятных условиях развития; в эксперименте ЭГ может быть вызвана, например, удалением яичевых оболочек, изменением pH среды. У Земноводных при ЭГ материал хордомезодермы и энтодермы, который в норме попадает внутрь зародыша, здесь перемещается наружу и оказывается разобщенным с эктодермой.

По Holfreter (1943)





## Индукция вторичной оси тела дорсальной губой бластопора земноводных

(А) Материал дорсальной губы бластопора из ранней гастролы трансплантировали в другую раннюю гастролу, в область, которая в норме дает всего лишь вентральный эпидермис. (Б) Ткани донора интернализируются и образуют вторичный архентерон, а затем и вторичную эмбриональную ось, включающую новые нейральную трубку, хорду и сомиты. В организованную вторичную ось вносят свой вклад и клетки донора, и клетки хозяина. (В) В конце концов формируются два взаимосвязанных организма. (Г) Строение области дорсальной губы бластопора в ранней гастролу *Xenopus*.



# Конец презентации

