



Министерство образования и науки Российской Федерации

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

С.А. Александрова Н.А. Боголюбова

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ОНТОГЕНЕЗА

Учебное пособие



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ

ББК 28.0я73

А46

Рецензенты:

Кандидат биологических наук, научный сотрудник Отдела клеточных культур
Института цитологии РАН *Н.С. Николаенко*

Кандидат физико-математических наук, доцент СПбГПУ *О.Л. Власова*

Александрова С.А. **Клеточные и молекулярные основы онтогенеза:** учеб. пособие / С.А. Александрова, Н.А. Боголюбова. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2011. – 221 с.

Изложены фундаментальные основы биологии развития многоклеточных животных. Приведены сведения о жизненном цикле и основных этапах индивидуального развития организма, эмбриональном гистогенезе и органогенезе, механизмах дифференцировки клеток и формирования пространственной организации организма. Рассмотрены механизмы реализации генетической информации в ходе развития. Поэтапно прослежено раннее развитие млекопитающих, раскрыты его механизмы и обсуждены особенности, связанные с внутриутробным развитием.

Предназначено для студентов высших учебных заведений, обучающихся по магистерской программе «Прикладные основы геномной и клеточной инженерии» направления подготовки магистров «Техническая физика». Также может быть использовано при обучении в системах повышения квалификации, в учреждениях дополнительного профессионального образования.

Работа выполнена в рамках реализации программы развития национального исследовательского университета «Модернизация и развитие политехнического университета как университета нового типа, интегрирующего мультидисциплинарные научные исследования и надотраслевые технологии мирового уровня с целью повышения конкурентоспособности национальной экономики».

Печатается по решению редакционно-издательского совета
Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

© Александрова С.А. Боголюбова Н.А., 2011
© Санкт-Петербургский государственный
политехнический университет, 2011

ISBN 978-5-7422-3576-7

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	6
1. Закономерности развития многоклеточных животных.....	9
1.1. Жизненные циклы и эволюция путей развития.....	9
1.1.1. Принципы организации про- и эукариот.....	9
1.1.2. Эволюция путей развития одноклеточных эукариот.....	12
1.1.3. Типы развития многоклеточных животных.....	17
1.2. Характеристика основных этапов онтогенеза многоклеточных животных.....	19
1.2.1. Основные стадии онтогенеза.....	19
1.2.2. Гаметогенез и оплодотворение.....	21
1.2.3. Типы дробления многоклеточных животных.....	27
1.2.4. Гастрюляция: зародышевые листки и внезародышевые оболочки.....	33
1.2.5. Раннее развитие позвоночных: производные эктодермы.....	45
1.2.6. Раннее развитие позвоночных: производные мезодермы.....	55
1.2.7. Раннее развитие позвоночных: производные энтодермы.....	69
1.3. Детерминация судьбы клеток и их дифференцировка.....	72
1.3.1. Автономная детерминация, мозаичный тип развития.....	73
1.3.2. Зависимая детерминация: регуляторный тип развития.....	74
1.4. Формирование пространственной организации	87
1.4.1. Градиентные модели позиционной информации.....	87
1.4.2. Генетика формирования пространственной организации у дрозофилы.....	89
1.5. Регуляция экспрессии генов в процессе развития.....	99
1.5.1. Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции.....	101

1.5.2. Регуляция экспрессии генов на уровне процессинга РНК.....	106
1.5.3. Регуляция экспрессии генов на уровне трансляции.....	108
1.5.4. Посттрансляционная регуляция экспрессии генов.....	109
1.6. Клеточные взаимодействия в развитии.....	111
1.6.1. Способы клеточной миграции	114
1.6.2. Изменения в строении клеточной поверхности.....	116
1.6.3. Молекулы клеточной адгезии.....	116
1.6.4. Морфогенез путем взаимодействия между клеткой и субстратом.....	119
1.6.5. Контактные модификации и морфогенез.....	122
1.7. Детерминация пола и ее молекулярно-генетические основы.....	123
1.7.1. Некоторые типы определения пола в животном мире.....	124
1.7.2. Развитие гонад у млекопитающих.....	126
1.7.3. Хромосомная детерминация пола у млекопитающих.....	128
1.8. Программы развития.....	133
Задания для самоконтроля к главе 1.....	139
2. Предзародышевое и раннее эмбриональное развитие млекопитающих.....	140
2.1. Общая характеристика развития млекопитающих.....	140
2.2. Строение репродуктивной системы млекопитающих.....	142
2.2.1. Мужская половая система.....	142
2.2.2. Женская половая система.....	145
2.3. Предзародышевое развитие	148
2.3.1. Происхождение половых клеток млекопитающих...	148
2.3.2. Мейоз.....	149
2.3.3. Сперматогенез.....	154
2.3.4. Оогенез и фолликулярный цикл яичников.....	160
2.3.5. Половые циклы.....	171
2.4. Оплодотворение.....	181

2.4.1. Строение зрелых гамет.....	181
2.4.2. Последовательность событий при оплодотворении...	187
2.5. Раннее эмбриональное развитие.....	195
2.5.1. Одноклеточный зародыш на стадии пронуклеусов...	195
2.5.2. Общая характеристика дробления млекопитающих..	198
2.5.3. Зародыши ранних стадий дробления.....	200
2.5.4. Зародыши поздних стадий дробления.....	203
2.5.5. Стадия бластоцисты.....	206
2.5.6. Имплантация.....	214
2.5.7. Эмбриональная диапауза.....	218
2.5.8. Плацента.....	219
2.5.9. Близнецы.....	222
2.6. Критические периоды развития.....	225
Задания для самоконтроля к главе 2.....	229
Библиографический список.....	230

ВВЕДЕНИЕ

Каждый многоклеточный организм формируется в результате непрерывного процесса прогрессивных изменений, который называют индивидуальным развитием, или онтогенезом. Онтогенез охватывает весь жизненный цикл организма от его возникновения до смерти и включает в себя точно скоординированные между собой процессы клеточного деления, дифференцировки, морфогенетических движений, находящиеся под сложным генетическим контролем. Изменения, сопровождающие развитие, происходят на молекулярном, клеточном, тканевом и организменном уровне; уникальной чертой процессов развития является то, что все они протекают во времени и должны рассматриваться как функция времени.

Изучением индивидуального развития организмов занимается биология развития. В настоящее время она является комплексной дисциплиной, исследующей закономерности изменения структурной организации и функционального состояния организма на протяжении всего времени его существования, и использующей для этого современные морфологические, генетические и молекулярно-биологические методы исследования. Заимствуя методы и подходы целого ряда биологических дисциплин, биология развития, в свою очередь, вносит значительный вклад в развитие многих направлений фундаментальной биологии и биотехнологии. И действительно, получают все более широкое распространение биомедицинские технологии, связанные с лечением бесплодия или с использованием недифференцированных (стволовых) клеток, развивается заместительная клеточная терапия и регенеративная медицина. В фундаментальных исследованиях, на которых базируется развитие биотехнологий, крупные эмбриональные клетки с ядрами большого размера и эмбриональные ткани незаменимы при исследовании регуляции экспрессии генов, функции и взаимодействия генов, клеточной дифференцировки и трансдифференцировки,

репрограммирования клеточного ядра, регенерации и многого другого.

Указанные обстоятельства послужили причиной включения дисциплины «Молекулярные и клеточные основы онтогенеза» в программу подготовки специалистов в области клеточной и генной инженерии, что позволило в общих чертах познакомить их с фундаментальными основами биологии развития и особенностями индивидуального развития тех модельных организмов, которые связаны с исследованиями в данных направлениях клеточной биологии.

Предлагаемое вниманию читателей пособие состоит из двух частей. Первая часть знакомит с основными закономерностями развития многоклеточных организмов и направлена на формирование фундаментальных представлений об эволюционном усложнении эмбрионального развития многоклеточных животных, эмбриональном гистогенезе и органогенезе, молекулярно-генетических и цитологических механизмах дифференцировки клеток и формировании пространственной организации живого организма. Также здесь рассматриваются механизмы реализации генетической информации в процессе индивидуального развития.

Вторая часть пособия посвящена подробному рассмотрению раннего развития млекопитающих и человека. Поэтапно прослежен цикл развития половых клеток, процесс оплодотворения и начальные этапы развития зародыша. Структурные изменения рассматриваются во взаимосвязи с молекулярно-биологическими процессами, обеспечивающими развитие эмбриона. Представлены общие сведения о строении репродуктивной системы млекопитающих, при этом внимание акцентировано на взаимодействии соматических и половых клеток.

При работе с пособием авторы рекомендуют активно использовать представленный в нем иллюстративный материал. Он подобран таким образом, чтобы дополнять и детализировать

информацию, содержащуюся в тексте. После каждой части пособия предлагаются задания для самоконтроля усвоения материала.

1. ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАЗВИТИЯ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

1.1. ЖИЗНЕННЫЕ ЦИКЛЫ И ЭВОЛЮЦИЯ ПУТЕЙ РАЗВИТИЯ

1.1.1. Принципы организации про- и эукариот

Все организмы разделяются на две основные группы по признаку наличия или отсутствия в их клетках ядерной оболочки: прокариоты и эукариоты (табл. 1.1).

Таблица 1.1

Принципы организации и функционирования про- и эукариотических организмов

Организмы	<i>Прокариоты</i>	<i>Эукариоты</i>
	Бактерии, сине-зеленые водоросли	Простейшие, грибы, растения и животные
Ядро	Лишены истинного ядра.	Имеют оформленное ядро, окруженное ядерной оболочкой и содержащее хромосомы.
Хромосома	Двойная спираль кольцевой формы и небольшого размера (около 1 млн. п.о.) Гаплоидность. Нет гистонов.	Несколько хромосом и количество ДНК даже у самых примитивных эукариотических простейших более чем в 10 раз превышает количество ДНК, имеющееся у наиболее сложно организованных прокариот. Диплоидность. Гистоны, хроматин.

Продолжение табл. 1.1

Организмы	Прокариоты	Эукариоты
	Бактерии, сине-зеленые водоросли	Простейшие, грибы, растения и животные
Механизмы генной регуляции	Транскрипция и трансляция происходят одновременно и координированно. Новосинтезированная мРНК немедленно начинает транслироваться с образованием белка, в то время как другой конец еще продолжает транскрибироваться с ДНК (оперон).	Существование ядерной оболочки делает возможным другой тип регуляции. Транскрипция происходит по одну стороны ядерной оболочки, трансляция - по другую. Регулируя выход мРНК в цитоплазму, клетка способна отбирать те, которые должны транслироваться.
Клеточное деление	Не по типу митоза: после репликации ДНК дочерние хромосомы остаются прикрепленными к соседним участкам на клеточной мембране. Расстояние между этими участками увеличивается в результате роста клеточной мембраны между ними, так что хромосомы, в конечном счете, оказываются в разных дочерних клетках.	В процессе митоза ядерная оболочка разрушается и два набора реплицированных хромосом равномерно распределяются между дочерними клетками.

Окончание табл. 1.1

Организмы	<i>Прокариоты</i>	<i>Эукариоты</i>
	Бактерии, сине-зеленые водоросли	Простейшие, грибы, растения и животные
Строение клетки	Отсутствие компартментов – невозможность разделения метаболических процессов в пространстве, отсутствие активного внутриклеточного транспорта.	Компартментализация.
Направление эволюции	Усложнение не морфологии, а метаболизма (в том числе путем формирования бактериальных сообществ). В итоге, благодаря разнообразию их метаболизмов, бактерии замкнули биогеохимические циклы, что впоследствии стало основой существования биосферы.	Дифференцировка. Морфогенез. Межклеточные коммуникации. Движение. Поведение.

Бактерии в естественной среде, как правило, существуют в виде сообществ, в которых имеется общий пул метаболитов и генов (метагеном), взаимодействующих друг с другом на основе гибридных

генных сетей (состоящих из компонентов — генов, белков, небелковых веществ — относящихся к различным организмам), сформированных бактериями разных видов или штаммов одного и того же вида. Информационная емкость метагенома потенциально неограниченна и может возрастать без увеличения размеров отдельного генома. Кроме того, в таких сообществах решается проблема компартментализации — роль компартментов играют бактерии с разным метаболизмом. Межклеточные коммуникации у бактерий ограничены экзоскелетом, поэтому могут осуществляться небольшими молекулами, неуниверсальными механизмами (пили, белковые комплексы), фагами и плазмидами. У ряда бактерий (циано, миксобактерии и др.) существует более консолидированная форма организации, сравнимая с многоклеточностью (например, у цианобактерий азотный голод индуцирует дифференцировку азотфиксирующих клеток — гетероцист из обычных клеток).

Что же помешало появлению многоклеточных организмов на основе прокариотного мира? Возможно, это отсутствие в метагеноме централизованного, иерархически высокого уровня регуляции, а также — оперонная система (ограничивала разнообразие генетических программ), ограниченное число генов (не хватало для кодирования сложных процессов, таких как дифференцировка, транспорт, поведенческие реакции), экзоскелет — препятствовал межклеточным взаимодействиям и ограничивал морфологическое разнообразие клеток.

Характерные особенности генома эукариот — низкая плотность белок-кодирующих последовательностей, наличие хроматина, диплоидность, кроссинговер — все это вызвало устойчивость геномов эукариот к повторам, и привела к появлению принципиально новых свойств ДНК и кодирования генетической информации. Таким образом, сложность организации у эукариот достигла нового уровня, который, как мы увидим, чрезвычайно важен для развивающегося организма.

1.1.2. Эволюция путей развития одноклеточных эукариот

Все многоклеточные эукариотические организмы произошли в процессе эволюции от одноклеточных простейших. Еще у простейших впервые появились основные особенности, присущие развитию эукариот. Одноклеточные эукариоты сформировали основные элементы процессов развития, характерные для более сложных организмов. Изучая их развитие, можно наблюдать простейшие формы клеточной дифференцировки и полового размножения.

Контроль с помощью ядра клеточного морфогенеза. Гигантская одноклеточная водоросль *Acetabularia* представляет собой одиночную клетку 2-5 см в длину и состоит из трех частей — шляпки, стебелька и ризоида (в котором располагается ядро). Если пересадить ядро одного вида в энуклеированный ризоид другого, шляпка которого сильно отличалась по форме, то можно обнаружить, что через несколько недель образовывалась новая шляпка, соответствующая виду донора ядра. Можно сделать вывод, что во время этого процесса происходит ядерный контроль клеточного морфогенеза и взаимодействие между ядром и цитоплазмой.

Клеточное разнообразие. Одним из наиболее замечательных случаев «дифференцировки» у простейших является пример жизненного цикла *Naegleria gruberi*. Этот организм имеет строение то амебы, то жгутиконосца. На протяжении большей части своего жизненного цикла *Naegleria* представляет собой типичную амебу, питающуюся почвенными бактериями и размножающуюся путем простого деления. Однако, когда суспензия бактерий оказывается разбавленной, каждая особь *Naegleria* быстро приобретает обтекаемую форму, и на переднем конце ее развиваются два длинных жгутика. Таким образом, вместо того, чтобы иметь в одном организме несколько дифференцированных клеточных типов, одна эта клетка обладает разными клеточными структурами и биохимическими особенностями в разные периоды своей жизни.

Происхождение полового размножения. Половое размножение — это еще одно изобретение в мире простейших. Необходимо отметить, что половой процесс и размножение — два различных явления, которые могут существовать отдельно друг от друга. **Размножение** — это возникновение новых особей, **половой процесс** — создание новых комбинаций генов, происходящих от двух разных особей. Размножение при отсутствии полового процесса свойственно тем организмам, которые размножаются простым делением; когда происходит деление амебы или отпочковывание новых особей гидры, при этом никакого перераспределения генов не наблюдается. Простейшие также способны перераспределять гены независимо от размножения. Так, например, у инфузории-туфельки (*Paramecia*) размножение происходит путем простого деления надвое, а половой процесс — путем конъюгации. Две инфузории соединяются своими ротовыми аппаратами, и между ними возникает цитоплазматический мостик. У обеих инфузорий макронуклеус (осуществляющий регуляцию метаболических процессов) разрушается, тогда, как микронуклеус подвергается мейозу, за которым следует митоз; возникает восемь гаплоидных микронуклеусов, из которых все, за исключением одного, разрушаются. Оставшийся микронуклеус делится снова и образует два микронуклеуса — стационарный и мигрирующий. Каждый мигрирующий микронуклеус перемещается по цитоплазматическому мостику в соседний конъюгант и сливается с его стационарным микронуклеусом, благодаря чему в обеих клетках возникает новое диплоидное ядро. Когда конъюгирующие партнеры расходятся, это диплоидное ядро делится, давая начало новому микронуклеусу и новому макронуклеусу. При этом инфузории не размножаются, происходит только половой процесс.

У одноклеточных эукариот наблюдается и объединение этих двух независимых явлений, полового процесса и размножения; в этом случае говорят о **половом размножении**. Хламидомонады

(*Chlamydomonas*) обычно существуют в виде гаплоидной формы. Однако особи каждого вида по поведению при спаривании подразделяются на две группы — плюс и минус. Когда особи разных групп встречаются, происходит объединение их цитоплазмы и слияние ядер с образованием диплоидной зиготы. Эта зигота является единственной диплоидной клеткой в жизненном цикле хламидомонады; осуществляя, в конечном счете, мейоз, она образует четыре новые клетки. Это настоящее половое размножение, поскольку хромосомы при мейозе пересортируются, и формируется большее число особей.

Возникновение дифференцировки и многоклеточности.

Возникновение многоклеточности шло, по-видимому, несколькими путями; здесь мы рассмотрим только два. Первый из путей связан с упорядоченным делением репродуктивной клетки и последующей дифференцировкой ее потомства на разные типы клеток. Этот путь к многоклеточности можно проследить на примере интересной группы организмов, относящихся к порядку *Volvocales*, или вольвоксовых.

Наиболее просто устроенные организмы среди *Volvocales* представляют собой совокупность нескольких клеток, по строению напоминающих хламидомонад. У рода *Gonium* в результате деления одной клетки образуется плоская пластинка, состоящая из 4-16 клеток, каждая из которых имеет собственный жгутик; все жгутики находятся на одной и той же стороне пластинки. У близкого рода *Pleodorina* 16 клеток образуют шар, а у *Eudorina* подобный шар содержит 32 или 64 клетки, расположенные строго закономерно. Эта особенность развития является предвестником процесса дробления яйца у более высокоорганизованных животных.

Для следующих двух родов (*Pleodorina* и *Volvox*) вольвоксовых характерна другая важная особенность развития — дифференцировка клеток разных типов в пределах одного организма, причем репродуктивные клетки дифференцируются из соматических. Так, *V. carteri* можно рассматривать как истинный многоклеточный организм

с двумя четко обособленными и независимыми типами клеток (соматическими и репродуктивными). Половые клетки у него формируются под воздействием высоких температур. Эти условия приводят к синтезу и секреции соматическими клетками белка, являющегося индуктором полового процесса. Возникшие в результате оплодотворения зиготы могут долго оставаться в анабиотическом состоянии, переживая длительный период высыхания. Так вольвокс нашел способ существовать во временных водоемах, образуемых весенними дождями и пересыхающих в жаркую погоду летом. У многих видов вольвоксовых наблюдается изогамное половое размножение, при котором встречаются гаметы, сходные по размеру, структуре и подвижности. Однако существуют виды, у которых образуются гаметы разных размеров (гетерогамия), а крупные вольвоксовые приобрели дальнейшую специализацию гамет — оогамия, при которой формируются крупные малоподвижные яйцеклетки или мелкие подвижные гаметы.

Другой тип многоклеточной организации наблюдается у простейшего *Dictyostelium discoideum* (слизевик) — при определенных условиях отдельные клетки собираются вместе, образуя слитную структуру, дифференцируются в один из двух клеточных типов, образуя ткани наподобие более сложных организмов. Жизненный цикл слизевика начинается с того, что гаплоидные споры дают начало миксамебам, которые размножаются бесполом путем и образуют опять же гаплоидные миксамебы. Когда пищевые ресурсы истощаются, начинается агрегация миксамеб и образуется мигрирующий псевдоплазмодий. Попадая в освещенную область, он прекращает движение и образует плодовое тело, которое состоит из споровых клеток и ножки. Клетки ножки погибают, а споровые клетки, поднявшиеся по нему, становятся спорами, отделяются и каждая становится новой миксамебой. Кроме этого бесполого цикла, у *Dictyostelium* возможен и половой процесс. Две миксамебы могут слиться, образуя гигантскую клетку, которая

поглощает все остальные клетки из агрегата. После этого она инцистируется в плотную оболочку и претерпевает мейотическое и митотические деления, в результате которых образуются новые миксамебы.

Слизевик является модельным организмом для изучения различных фундаментальных процессов — дифференцировка клеток, агрегация тысяч клеток в единый организм, программируемая гибель. Было выявлено, что агрегация миксамеб происходит благодаря хемотаксису, при этом клетки направляются к центру растворимым веществом — циклическим аденозин-3',5'-монофосфатом (цАМФ). Дифференцировка отдельных миксамеб в клетки ножки (соматические) или споры (репродуктивные) — явление комплексное, было показано, что передние клетки обычно образуют ножку, а задние — споры. Формирование единого многоклеточного организма достигается молекулами клеточной адгезии. Во время делений клетки не адгезивны друг к другу, но когда деления приостанавливаются, адгезивность возрастает. Изначальная межклеточная адгезия обеспечивается гликопротеином массой 24 кД (gp24), который появляется на клеточной мембране миксамеб. Произошедшая изначально адгезия стабилизируется другой молекулой клеточной адгезии — gp80, без нее формируются только мелкие слизевики. В конце агрегации уровень синтеза этого белка снижается, а его роль передается третьему гликопротеину — gp150, который остается на клеточной поверхности в ходе миграции слизевика. Кроме того, этот белок весьма важен для рассортировки будущих клеток — сначала он синтезируется в клетках будущей ножки, а спустя несколько часов — в предспоровых клетках, но на более низком уровне.

1.1.3. Типы развития многоклеточных животных

Эволюция многоклеточных животных шла по нескольким направлениям, в результате чего возникло множество различных групп животных. Современная филогенетика, основанная на данных

молекулярной биологии, выделяет пять основных типов развития, имеющих свои специфические особенности раннего развития. Под типом развития нужно понимать сложившийся в ходе эволюции комплекс взаимосвязанных морфогенетических процессов.

1) Двухслойные животные (Губки).

(Представляют собой одну из наиболее древних и обособленных групп. Есть три основных типа соматических клеток, но один из них — археоциты, может дифференцироваться во все остальные. У них нет ни мезодермы, ни настоящих органов.)

2) Двухслойные животные с радиальной симметрией (Diploblastica: Медузы и Гребневики).

(Есть эктодерма и энтодерма, нет настоящей мезодермы, она рудиментарна, состоит из редко разбросанных по матриксу клеток.)

Трехслойные и билатеральные животные (Triploblastica, Bilateria):
- *первичноротые* (Protostomia).

3) Ecdyzoa («линяющие») (Приапулиды, Нематоды и Членистоногие).

4) Lophotrochozoa (спиральное дробление) (Моллюски, Черви, Брахиподы, Мшанки, Форониды и Плоские черви)

- *вторичноротые*.

5) Deuterostomia, или Вторичноротые (Иглокожие, Полу-, Первично-, Головохордовые и Хордовые).

У Первичноротых рот формируется первым на месте, где открывается кишка, образуя гастрюляцию, или около него. Анус образуется позже в другом месте. Целом, или полость тела, образуется у этих форм при расхождении первоначально плотного тяжа мезодермальных клеток. У Вторичноротых ротовое отверстие открывается после появления ануса. Кроме того, если полости тела у первичноротых обычно формируются при расхождении плотных блоков мезодермы, то у большинства вторичноротых полость тела образуется из выпячиваний мезодермы, отпочковывающихся от кишки.

1.2. ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ЭТАПОВ ОНТОГЕНЕЗА МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

1.2.1. Основные стадии онтогенеза

Онтогенез — индивидуальное развитие многоклеточного организма от оплодотворения до смерти. Типичный онтогенез начинается с момента формирования одноклеточного зародыша — зиготы (оплодотворения) и далее продолжается стадиями дробления, гаструляции, органогенеза, метаморфоза, зрелости и заканчивается в процессе старения и смерти организма. Кроме того, необходимо выделить предзародышевый период, или прогенез, который включает в себя процессы, предшествующие оплодотворению: возникновение первичных половых клеток и формирование гамет — ооцитов и спермиев.

Рассмотрим основные стадии развития многоклеточных организмов на примере лягушки. Новый организм возникает в результате слияния генетического материала двух гамет — **сперматозоида** и **яйцеклетки**. Это слияние, называемое **оплодотворением**, побуждает яйцо к развитию. Вслед за оплодотворением идет совокупность стадий, которая носит название **эмбриогенеза**. Первая из этих стадий — дробление. **Дробление** — это ряд чрезвычайно быстро протекающих митотических делений, в результате которых огромный объем цитоплазмы зиготы разделяется на многочисленные более мелкие клетки. Эти клетки называют **бластомерами**, и к концу дробления они образуют шар, носящий название **бластулы**. Часть цитоплазмы яйца дает начало клеткам-предшественникам гамет. Эти клетки называют **первичными половыми клетками**, и они обособляются для осуществления репродуктивной функции. Все остальные клетки тела называют соматическими.

Половые клетки — обеспечивают возникновение нового поколения организмов. **Соматические клетки** — дают начало индивидуальному организму. Это разделение на соматические клетки

и половые, как правило, представляет собой один из первых этапов дифференцировки. *Дифференцировкой* называют возникновение клеточного разнообразия. Процессы организации дифференцированных клеток в ткани и органы называют *морфогенезом* (создание формы и структуры) и *ростом* (увеличение размеров).

После дробления бластомеры совершают энергичные перемещения, в результате которых их положение относительно друг друга изменяется. Эту серию клеточных перемещений называют *гастроуляцией*. В результате гастроуляции у типичного зародыша обычно образуются три клеточных пласта, называемые *зародышевыми листками: эктодерма, энтодерма и мезодерма*. После возникновения трех зародышевых листков клетки, взаимодействуя между собой и перемещаясь, образуют органы. Этот процесс носит название *органогенеза*. Во многих органах содержатся клетки, происходящие от разных зародышевых листков, и нередко наружную часть органа образуют клетки одного зародышевого листка, а внутреннюю — другого. Кроме того, при органогенезе некоторые клетки совершают длительные миграции от места, где они возникли, до места окончательной локализации. К таким мигрирующим клеткам относятся предшественники форменных элементов крови и лимфы, пигментные клетки и гаметы.

После формирования всех органов и систем головастика готов к вылуплению из оболочки и самостоятельному питанию. В определенное время гормональные стимулы инициируют *метаморфоз*, эти изменения готовят водный организм к существованию на суше, при этом практически каждый орган претерпевает перестройку. По окончании метаморфоза начинается развитие *первичных половых клеток*. В дальнейшем они мигрируют в гонады, где дифференцируются в *гаметы* — клетки, способные участвовать в оплодотворении, которое приводит к возникновению новой особи. Развитие гамет, называемое *гаметогенезом*, обычно

завершается к моменту достижения организмом половой зрелости. В зрелом организме гаметы высвобождаются и после оплодотворения дают начало новой жизни. Тем временем взрослый организм постепенно стареет и умирает.

Индивидуальное развитие животных имеет ациклический, поступательный характер. Каждая стадия имеет свои особенности и создает основу для дальнейшего развития. На ранних этапах развития (стадии оплодотворения, дробления и формирования бластулы) на первый план выступают клеточные механизмы, обеспечивающие активацию метаболизма, пролиферацию и межклеточные связи раннего зародыша. На более поздних стадиях включаются механизмы морфогенетических движений, и начинается формирование сложной пространственной организации тела животного. Последовательная смена стадий развития во времени отражает закономерное изменение программ развития — активацию одних и выключение других. Ранние стадии развития имеют универсальный характер. Огромное морфологическое разнообразие этих стадий у разных животных достигается на основе комбинаций ограниченного числа клеточных механизмов.

1.2.2. Гаметогенез и оплодотворение

Гаметогенез. *Гаметогенез* — это процесс формирования половых клеток, способных при определенных условиях обеспечить воспроизводство новых особей. Зрелые половые клетки, или **гаметы**, представляют собой высокоспециализированные клетки, дифференцировка которых связана как со специфическими изменениями ядерного аппарата (прежде всего с редукцией числа хромосом), так и с существенным преобразованием клетки в целом. Процесс гаметогенеза довольно специфичен для разных групп организмов. Тем не менее, можно выделить несколько последовательных этапов, имеющих свои морфофункциональные характеристики.

Клетки половой линии обычно обособляются на ранних этапах эмбрионального развития. Клетки, потомки которых дают начало исключительно гаметам, называются **первичными половыми клетками** (ППК). Спецификация клеток половой линии может происходить двумя способами: **эпигенетическим**, при котором свойства половой клетки индуцируются внешними по отношению к клетке факторами, и **преформационным**, обусловленным материнскими детерминантами, унаследованными клеткой вместе с цитоплазмой ооцита. ППК представляют собой диплоидные клетки, способные к митотическим делениям. У многих животных они способны к миграции и благодаря этому заселяют зачатки гонад, которые закладываются независимо. ППК, заселившие зачатки гонад, называются **гониями**. Гонии тоже являются диплоидными клетками и способны к митотическим делениям. Гонии мужских гонад называются **сперматогониями**, а женских — **оогониями**. Этап развития, который представлен ППК и гониями, называют периодом размножения половых клеток, а следующий за ним — периодом созревания. В этот период клетки теряют способность к митозу. Далее в ходе мейоза они претерпевают сложный процесс редукции числа хромосом и превращаются в гаплоидные клетки. Мейоз включает два последовательных деления. Половые клетки в этот период называются **сперматоцитами** и **ооцитами**. До завершения первого деления созревания половые клетки называют сперматоцитами (ооцитами) первого порядка, а после первого деления — второго порядка. После завершения деления созревания вторичный ооцит становится зрелой **яйцевой клеткой**. Вторичный сперматоцит образует гаплоидную **сперматиду**. В процессе сперматогенеза различают особый период формирования, в течение которого сперматиды преобразуются в зрелый **сперматозоид**.

Первичные половые клетки. Половые клетки большинства животных формируются из особого зачатка — **первичных половых клеток** (ППК). Этот зачаток у разных животных обособляется на

разных стадиях эмбриогенеза, но всегда независимо от зачатка половой железы. До развития гонады они активно перемещаются в организме, привлекаемые белками, выделяемыми гонадой. Проникнув в железу, половые клетки располагаются у самцов в мозговом, а у самок — в корковом слое гонады. У многих животных (в том числе позвоночных) зачаток ППК обособляется на стадии гаструлы или нейрулы, у некоторых других (например, большинства членистоногих) — уже в ходе дробления. Исключение составляют некоторые древние группы организмов, у которых половые клетки могут образовываться из соматических, причем на протяжении всего онтогенеза (губки, кишечнополостные, плоские черви).

Оогенез. В ходе *оогенеза*, т. е. при формировании женских половых клеток, их специализация определяется в первую очередь необходимостью создания запасов веществ, обеспечивающих энергетические потребности эмбриона до начала периода активного питания. Структура оогенеза в принципе одинакова у всех животных. Оогонии, мигрировавшие в зачаток женской половой гонады, делятся митозом (*период размножения*). У некоторых животных (рыбы, амфибии) деления происходят на протяжении всей жизни в периоды сезонного размножения, у млекопитающих — только во время внутриутробного периода развития. Следующий период — *период роста*. Ооциты перестают делиться митозом и вступают в профазу I мейоза. Выделяют стадии малого и большого роста. В *период малого роста (превителлогенез)* объемы клетки увеличиваются незначительно, а в *период большого роста (вителлогенез)* происходит очень интенсивное накопление желтка в цитоплазме. Профаза I может быть очень продолжительной, и большой рост ооцитов растягивается на десятки лет (у человека). Механизм роста ооцитов неодинаков у разных животных и зависит от типов питания яйцеклеток.

Фагоцитарный тип питания существует у половых клеток животных, не имеющих стабильных половых желез (губки,

кишечнополостные). Ооциты, перемещаясь по межклеточному пространству, фагоцитируют соматические клетки организма, синтезирующие желток. При **солиитарном типе питания** (кишечнополостные, иглокожие, некоторые черви, бескрылые насекомые) растущий ооцит получает низкомолекулярные вещества из целомической жидкости или половой железы, самостоятельно синтезирует желточные белки и накапливает желток в виде гранул. **Алиментарный тип питания** осуществляется с помощью вспомогательных клеток, он может быть двух видов. В случае **нутриментарного способа** (черви, членистоногие) ооцит связан цитоплазматическими мостиками с трофоцитами, которые представляют собой группу половых клеток с незавершенной цитотомией. Трофоциты синтезируют рРНК, которые поступают в ооцит и интенсифицируют белковый синтез. При **фолликулярном способе** вспомогательными клетками служат соматические клетки в составе яичника. Этот способ питания свойственен большинству животных (в т. ч. млекопитающим). Ооцит и окружающий его слой вспомогательных фолликулярных клеток формируют фолликул. Основная масса желтка образуется за счет поступлений веществ извне и поступает в ооцит путем активного эндоцитоза с помощью пиноцитозных пузырьков. Пузырьки содержат вителлогенин — основной структурный компонент желткового белка, который синтезируется у разных животных в разных соматических тканях. В процессе эволюции синтез этого белка постепенно концентрировался в определенном органе — у млекопитающих вителлогенин вырабатывается печенью самок и находится под гормональным контролем.

Развитие женских половых клеток завершается их **созреванием** — превращением в зрелую яйцеклетку с гаплоидным ядром, готовую к слиянию со сперматозоидом и образованию зиготы. В оогенезе мейоз завершается только у морских ежей и некоторых кишечнополостных (на стадии образования женского пронуклеуса). У

остальных животных мейоз блокируется на специфической для данного вида стадии (блок мейоза). Это может быть стадия диакинеза профазы I, метафаза I, метафаза II (почти у всех хордовых). Только после оплодотворения созревание яйцеклетки завершится, и образовавшаяся зигота продолжит развитие.

Яйцеклетки различных видов животных сильно различаются по форме и строению. У большинства видов яйцеклетка имеет округлую или овальную форму, реже — удлинённую (у насекомых). Иногда, например, у губок, яйцеклетка не имеет определенной формы и способна к амёбоидным движениям. Размеры яйцеклетки варьируют в зависимости от количества желтка в цитоплазме. Самые большие яйцеклетки у птиц — у страуса они достигают 15 см и весят 1,5 кг. Величина яйцеклетки не зависит от размеров тела животного, она обычно связано обратной зависимостью с плодовитостью — животные, охраняющие потомство (птицы), откладывают несколько крупных яиц, у рыб, не проявляющих заботы о потомстве, число яйцеклеток достигает нескольких миллионов. Такой корреляции нет у животных, имеющих плаценту — они производят одновременно несколько мелких зародышей.

Виды яйцеклеток. *Изолецитальные* — содержат равномерно распределённые одиночные желточные включения (иглокожие, моллюски, черви, млекопитающие). *Мезolecитальные* — содержат среднее количество желтка (амфибии). *Полецитальные* — содержат большое количество желтка. Делятся на *телolecитальные* — желток находится на одном из полюсов (рыбы, птицы) и *центroleцитальные* — желток сосредоточен в центре, а цитоплазма на периферии (насекомые).

Сперматогенез. Развитие мужских половых клеток, или *сперматогенез*, имеет свою специфику по сравнению с оогенезом. Направление дифференцировки мужских половых клеток резко отличается от стратегии формирования женских. Дифференцировка мужских гамет предполагает максимальную редукцию

цитоплазматического тела и развитие двигательного аппарата.

По структурной организации сперматозоиды можно подразделить на несколько типов. У подавляющего большинства видов они жгутиковые. Такие сперматозоиды обычно имеют три четко выраженных отдела: головку, шейку и жгутик. Известны некоторые группы животных, у которых спермии безжгутиковые. Безжгутиковые сперматозоиды характерны для некоторых *Ecdyzoa*. Так, они могут быть амебоидными (круглые черви), округлой или звездчатой формы (членистоногие), могут перемещаться с помощью псевдоподий или оставаться неподвижными. Мужские половые клетки никогда не развиваются в одиночку, а растут в виде клонов синцитиально связанных клеток. Сперматогенез всегда тесно связан со вспомогательными обслуживающими клетками соматического происхождения.

Развитие сперматозоидов у разных видов животных схоже. Сперматогенез подразделяется на несколько стадий:

1. Развитие первичных половых клеток (миграция к местам окончательной локализации, митотические деления).
2. Пресперматогенез (гоноциты-сперматогонии, делятся митозом, находятся в связи со вспомогательными клетками гонады).
3. Сперматогенез (сперматоциты I и II порядков делятся митозом, образуют клоны, дифференцируются; на определенной стадии митозы прекращаются, происходит мейоз; постмейотические гаплоидные сперматиды не делятся, происходит их специфическая дифференцировка в сперматозоиды).

Оплодотворение. *Оплодотворение* — это вызываемое сперматозоидом побуждение яйцеклетки к развитию с одновременной передачей наследственного материала. Во время этого процесса сперматозоид сливается с яйцом, при этом гаплоидное ядро сперматозоида объединяется с завершившим деление созревания гаплоидным ядром зрелого яйца, образуя диплоидное ядро зиготы. В результате возникает одноклеточный зародыш с диплоидным

набором хромосом и активируется цепь событий, лежащих в основе развития организма — восстанавливается способность к репликации ДНК и начинается подготовка к делениям дробления. Оплодотворение представляет собой многоступенчатый процесс, в котором различаются следующие этапы: **привлечение** сперматозоида яйцом, **связывание** гамет и, наконец, **слияние** мужских и женских половых клеток. При соединении гамет в этом процессе происходит кариогамия, или слияние ядер. Благодаря кариогамии происходит объединение отцовских и материнских хромосом, ведущее к образованию генома новой особи.

1.2.3. Типы дробления многоклеточных животных

Общая характеристика дробления. После объединения хромосомных наборов обоих пронуклеусов начинается митотическое деление ядра зиготы. За этим первым делением следует серия следующих делений, так называемых **делений дробления**, объединенных рядом общих свойств:

1) разделившиеся клетки зародыша не растут, т. е. в промежутке между делениями их масса не увеличивается — суммарный объем и масса всех возникших клеток не превышают объема и массы яйцеклетки сразу после оплодотворения;

2) количество ДНК в ядрах удваивается после каждого деления как при обычном митозе.

В период дробления из-за отсутствия роста клеток после делений их размеры непрерывно уменьшаются. Дробление завершается формированием **бластулы**, поэтому клетки дробящегося яйца называют **бластомерами**. Видовые особенности процесса дробления определяются двумя основными параметрами: количеством и распределением желточных белков в цитоплазме и присутствующими в цитоплазме факторами, которые влияют на ориентацию митотического веретена и время его образования (табл. 1.2).

Таблица 1.2

Классификация типов дробления

Тип дробления	Тип яиц по количеству и распределению желтка	Симметрия дробления	Типичные представители
Голобластическое (полное)	Изолецитальные (одинокые желточные включения распределены равномерно)	Радиальное	Иглокожие, ланцетник
		Спиральное	Моллюски, черви
		Билатеральное	Асцидии
		Ротационное	Млекопитающие
	Мезолецитальные	Радиальное	Амфибии
		Билатеральное	Головоногие моллюски
Меробластическое (частичное)	Телolecитальные (плотное скопление желтка у одного полюса)	Дискоидальное	Рыбы, птицы, рептилии
	Центролецитальное (желток сосредоточен в центре яйца)	Поверхностное	Большинство членистоногих

Голобластические типы дробления

Радиальное голобластическое дробление. Если провести разрез через зародыш в плоскости любого меридиана на любой стадии дробления, то этот разрез разделит его на две зеркальные половины. Такой тип симметрии присущ шару или цилиндру и носит название радиальной симметрии (рис. 1.1).

Наиболее простой вариант этого типа дробления присущ некоторым иглокожим (морской огурец *Synapta*) и представителю

бесчерепных — ланцетнику. Борозды дробления проходят параллельно и перпендикулярно анимально-вегетативной оси яйца. В результате возникает зародыш, у которого бластомеры располагаются горизонтальными рядами вдоль центральной полости. На обоих полюсах зародыша бластомеры сближаются, и возникает полый шар, стенка которого образована одним слоем клеток — целобластула.

Голобластические типы дробления

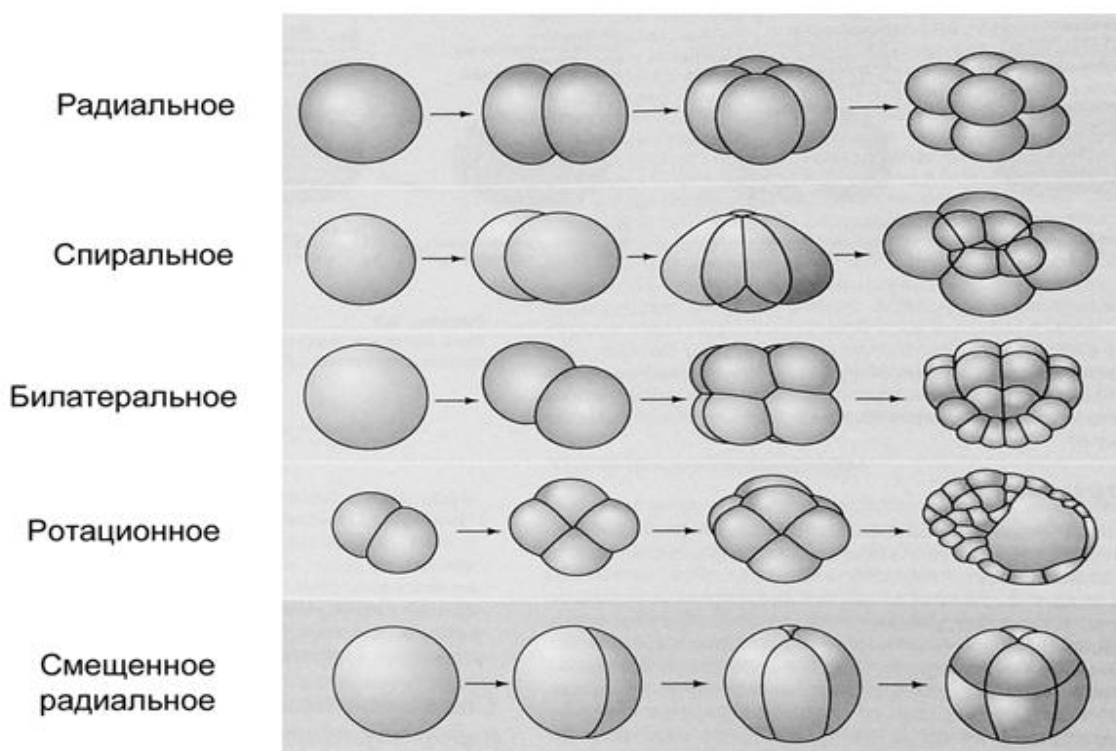


Рис. 1.1. Голобластические типы дробления многоклеточных животных (Гилберт, 2010).

Для морских ежей также характерно радиальное голобластическое дробление, но с некоторыми существенными модификациями. Первое и второе деления дробления очень сходны с такими же делениями у *Synapta*. Оба они меридиональные и перпендикулярны друг другу. Третье деление экваториальное и отделяет полюсы один от другого. Четвертое, однако, происходит иначе. Четыре клетки анимального яруса разделяются меридионально

на восемь бластомеров одинаковой величины. Эти клетки называют мезомерами. Вегетативный ярус претерпевает неравное экваториальное деление, в результате которого образуются четыре крупные клетки — макромеры и четыре клетки меньшего размера — микромеры у вегетативного полюса. В результате седьмого деления возникает 128-клеточная бластула (целобластула). На наружной поверхности клеток бластулы образуются реснички, что позволяет бластуле вращаться внутри оболочки оплодотворения. Вскоре клетки секретируют фермент вылупления, который переваривает оболочку. Зародыш вылупляется и становится свободноплавающей бластулой.

Дробление у зародышей большинства бесхвостых и хвостатых амфибий радиально-симметричное и голобластическое, как и у иглокожих. Однако яйцо амфибий содержит гораздо больше желтка. Этот желток, сосредоточенный в вегетативном полушарии, затрудняет дробление. Так, первое деление начинается на анимальном полюсе и медленно распространяется вниз на вегетативную область. Третье деление, как это можно было ожидать, бывает экваториальным. Однако из-за большой концентрации желтка в вегетативной области борозды третьего деления дробления располагаются значительно ближе к анимальному полюсу. Они разделяют зародыш лягушки на четыре анимальных бластомера меньшего размера и четыре более крупных бластомера в вегетативной области. В результате этого неравного голобластического деления возникают область быстро делящихся бластомеров вблизи анимального полюса и область более медленно делящихся бластомеров. На последующих стадиях деления анимальная область содержит многочисленные мелкие клетки, тогда как в вегетативной области имеется лишь относительно небольшое число крупных богатых желтком бластомеров. На 128-клеточной стадии появляется хорошо различимый бластоцель, и принято считать, что в это время зародыш достиг стадии бластулы (амфибластула).

Спиральное голобластическое дробление. Спиральное

дробление характерно для нескольких групп червей (кольчатых, турбеллярий, немертин) и всех моллюсков, за исключением головоногих. Оно во многих отношениях отличается от радиального дробления. Во-первых, яйца не делятся параллельно или перпендикулярно анимально-вегетативной оси. Плоскости делений дробления ориентированы наклонно, что приводит к «спиральному» расположению дочерних бластомеров. Во-вторых, число контактов между клетками больше, чем при радиальном дроблении. В-третьих, зародыши со спиральным типом дробления проходят меньше делений до начала гаструляции. Это позволило проследить судьбу каждой отдельной клетки бластулы. Когда сопоставили судьбы отдельных клеток зародышей кольчатых червей, плоских червей и моллюсков, то оказалось, что у клеток, занимающих одно и то же положение, судьба в принципе одинакова. Возникающие таким образом бластулы не имеют бластоцеля и носят название стерробластул.

Билатеральное голобластическое дробление. Встречается главным образом у асцидий (оболочники). Оно характеризуется тем, что плоскость первого деления устанавливает единственную плоскость симметрии зародыша. Каждое последующее деление ориентируется по отношению к этой плоскости симметрии, так что половина зародыша по одну сторону от первой борозды представляет собой зеркальное отражение половины зародыша по другую ее сторону.

Голобластическое ротационное асинхронное дробление. Такой тип дробления свойственен млекопитающим (см. главу 2.).

Меробластические типы дробления

Дискоидальное дробление. Характерно для рыб, птиц и рептилий. Большая часть объема яйца занята желтком, так что дробление происходит только в области бластодиска у анимального полюса яйца (рис. 1.2).

В результате экваториальных делений образуется однослойная бластодерма, затем она преобразуется в трех- или четырехслойный

клеточный пласт. Между бластодермой и желтком имеется пространство, называемое подзародышевой полостью. Постепенно формируется бластула, названная дискобластулой. К тому времени, когда курица откладывает яйцо, бластодерма содержит около 60 000 клеток. Они образуют два слоя клеток: наружный эпибласт и лежащий под ним гипобласт. Между ними находится бластоцель.

Меробластические типы дробления

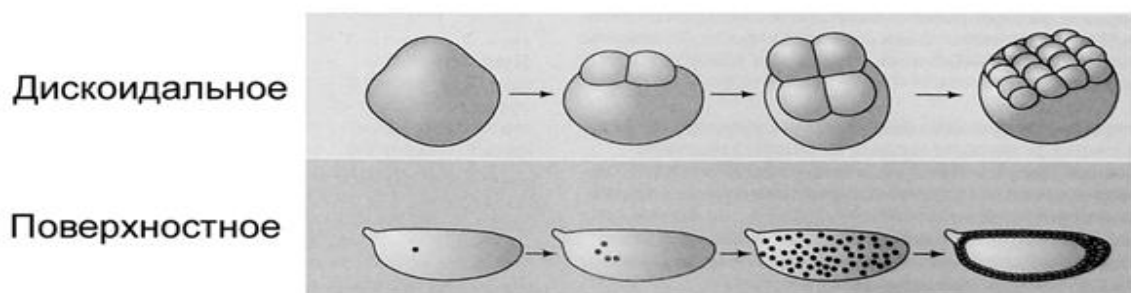


Рис. 1.2. Меробластические типы дробления многоклеточных животных (Гилберт, 2010).

Поверхностное дробление. Яйцам насекомых свойственно поверхностное дробление, при котором из-за большой массы центрально расположенного желтка дробление ограничено поверхностным слоем цитоплазмы.

Одна из примечательных особенностей этого типа дробления заключается в том, что обособление клеток происходит только после многократного деления ядер. Ядро зиготы претерпевает несколько митотических делений в центральной области яйца. Затем ядра с окружающими их островками цитоплазмы (энергиды) мигрируют на периферию яйца, где митозы продолжаются, но с убывающей скоростью. Теперь зародыш носит название синтициальной бластодермы, так как все ядра дробления заключены в общей цитоплазме и какие-либо плазматические мембраны, кроме мембраны самого яйца, отсутствуют. Ядра, мигрирующие к заднему полюсу яйца, вскоре окружаются новыми плазматическими мембранами,

образуя полярные клетки зародыша. Эти клетки дают начало половым клеткам взрослого организма. После образования полярных клеток плазматическая мембрана яйца образует впячивания, которые углубляются между ядрами и, в конечном счете, обособляют каждое из них в отдельной клетке. В результате возникает клеточная бластодерма, клетки которой однослойным покровом одевают богатую желтком сердцевину яйца. Распределение клеток в бластодерме не равномерное и не случайное: они концентрируются на вентральной поверхности, обозначая место, где возникнут зародышевые листки. Эта область, называемая зародышевой полоской, дает начало всем клеткам насекомого. Остальные клетки бластодермы образуют внезародышевые оболочки (перибластула — бластула насекомых).

1.2.4. Гастрюляция: зародышевые листки и внезародышевые оболочки

Бластула состоит из большого числа клеток, локализация которых определяется в период дробления. Во время гастрюляции эти клетки занимают новое положение и приобретают новых соседей. В этот период устанавливается план строения многослойного тела животного. Клетки, которые в будущем образуют энтодермальные и мезодермальные органы, попадают внутрь зародыша, тогда как клетки, из которых возникнут кожа и нервная система, распространяются по его поверхности. Движения гастрюляции охватывают всего зародыша, и миграции клеток в одной его части должны быть очень точно координированы с происходящими одновременно движениями в другой.

Гастрюляция — интегрированный процесс миграции клеток и тканей, приводящий к перераспределению клеток бластулы и образованию трех зародышевых листков — ***эктодермы, энтодермы и мезодермы***. Зародыш в этот период называется ***гастрюлой***. Характер гастрюляции в животном царстве необычайно сильно

варьирует, однако осуществляется она при участии сравнительно немногочисленных механизмов. Почти у всех животных гастрюляция осуществляется посредством интенсивных **морфогенетических движений**.

Инвагинация. Впячивание части стенки бластулы внутрь зародыша, приводящее к образованию гастрюлы с полостью (гастроцелем), сообщающимся с наружной средой отверстием (бластопором). Впячивание участка клеточной стенки зародыша подобно тому, как вдавливается внутрь мягкая стенка резинового мяча, когда на него нажимают.

Инволюция. Вворачивание внутрь зародыша увеличивающегося в размерах наружного пласта клеток, который распространяется по внутренней поверхности остающихся снаружи клеток.

Эпиболия. Обрастание крупных неподвижных клеток вегетативного полушария зародыша более мелкими клетками его апикальной области.

Иммиграция. Выселение в бластоцель отдельных клеток бластодермы из одного места (униполярная) или из разных (мультиполярная), гастроцель при этом не образуется.

Деламинация. Расщепление единого клеточного пласта на два более или менее параллельных.

Гастрюляция у морского ежа

Можно выделить несколько стадий гастрюляции морского ежа (рис. 1.3).

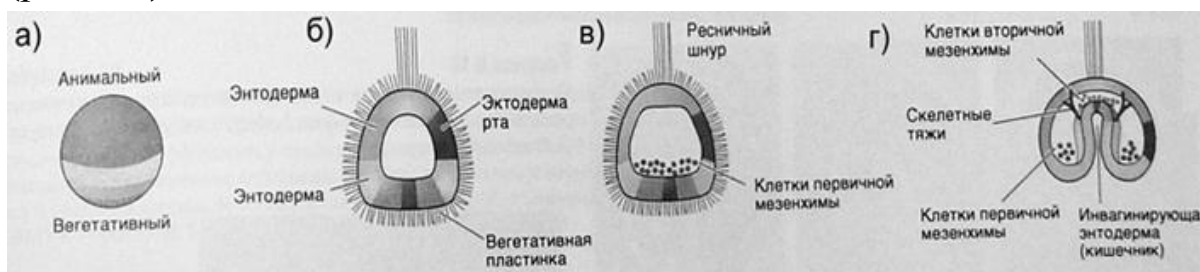


Рис. 1.3. Гастрюляция у морского ежа (Гилберт, 2010):

- а) карта презумптивных зачатков; б) поздняя бластула с уплощенной вегетативной пластинкой; в) бластула с первичной мезенхимой;
- г) гастрюла со вторичной мезенхимой.

1. *Выселение первичной мезенхимы (иммиграция).* Бластула у морского ежа образована одним слоем клеток, содержащим от 1000 до 2000 клеток. Примерно через 24 ч после вылупления бластулы из оболочки оплодотворения вегетативный участок стенки сферической бластулы начинает уплощаться. В центре этой плоской вегетативной пластинки находится скопление мелких клеток, на поверхности которых, обращенной в бластоцель, появляются длинные тонкие выросты, называемые филоподиями. Растягиваясь и сокращаясь, филоподии совершают пульсирующие движения. Затем клетки отделяются друг от друга и мигрируют в бластоцель. Они называются **первичной мезенхимой** и происходят из микромеров. С помощью филоподий они активно устанавливают связь со стенками бластоцеля. В конце концов, эти клетки локализуются в центральной области бластоцеля, затем клетки первичной мезенхимы сливаются в синцитиальные тяжи, которые образуют впоследствии оси известковых спикул личиночного скелета.

2. *Первая фаза инвагинации.* Пока в вегетативной области бластоцеля формируется кольцо клеток первичной мезенхимы, в клетках, которые остаются в вегетативной пластинке, происходят важные изменения. Эти клетки связаны между собой и с гиалиновым слоем яйца и движутся, заполняя пространства, образованные в результате иммиграции мезенхимы; поэтому пластинка продолжает уплощаться. Далее она изгибается и впячивается в бластоцель примерно на $1/4$ - $1/2$ своего пути. Затем инвагинация внезапно прекращается. Инвагинировавшая область называется **архентероном**, или **гастроцелем**, а отверстие архентерона в вегетативной области называется **бластопором**.

3. *Вторая фаза инвагинации.* После короткой паузы начинается вторая фаза формирования архентерона — происходит чрезвычайно резкое удлинение архентерона, его длина почти утраивается, и короткий широкий зачаток архентерона трансформируется в длинную тонкую трубку. Такое растяжение обусловлено перераспределением

его клеток посредством миграции одних клеток по другим и их уплощения. Филоподии этих клеток, простираясь через жидкость, содержащуюся в бластоцеле, устанавливают контакт с поверхностью его внутренней стенки. Они прикрепляются к стенке в промежутках между клетками бластодермы и затем укорачиваются.

4. Выселение вторичной мезенхимы. Когда передний край архентерона приближается к стенке бластоцеля в анимальной области, клетки вторичной мезенхимы рассеиваются в бластоцеле, где происходит их пролиферация, необходимая для формирования ими мезодермальных органов. На месте контакта архентерона со стенкой бластоцеля со временем формируется ротовое отверстие, которое, сливаясь с архентероном, образует непрерывную пищеварительную трубку. (Таким образом, бластопор, как это характерно для вторичноротых, маркирует положение ануса).

Гастрюляция у амфибий

На примере амфибий мы увидим, что гастрюляция в жизни животного не существует как независимый процесс. Подготовка к ней может быть прослежена еще до момента слияния спермия с яйцом. Неоплодотворенное яйцо обладает анимально-вегетативной полярностью. На анимальном полюсе пигментированная кортикальная цитоплазма располагается над светлой областью цитоплазмы, содержащей материал, который ранее находился в ядре ооцита. Вегетативная часть неоплодотворенного яйца содержит более крупные желточные пластинки и окружена светлой кортикальной цитоплазмой. Судьба этих областей может быть предсказана еще до оплодотворения. Поверхность анимального полушария станет клетками эктодермы (эктодермальный эпителий и нервная система), поверхность вегетативного полушария даст клетки энтодермы (кишечный эпителий и связанные с ним органы), а мезодермальные клетки будут формироваться из внутренней цитоплазмы, лежащей вокруг экватора. Следовательно, зародышевые листки могут быть в общих чертах картированы в неоплодотворенном яйце; но это еще

ничего не говорит нам о том, из какой части яйца образуется брюшная часть, а из какой — спинная.

Дорсовентральную и переднее-заднюю оси детерминирует смещение цитоплазмы зиготы при оплодотворении. При проникновении спермия в яйцо происходит поворот кортикального слоя цитоплазмы относительно внутренней цитоплазмы яйца у лягушки. (Внутренняя цитоплазма остается в прежнем положении из-за большого количества желтка в ней, тогда как кортикальный слой цитоплазмы активно смещается на 30° по отношению к своему первоначальному положению). Смещение цитоплазмы и кортикальных гранул вызывает появление «серого серпа» на поверхности яйца, отстоящего на 180° от места проникновения спермия. Эта область цитоплазмы активизируется и приобретает способность инициировать гастрюляцию. Сторона, на которой спермий проникает в яйцо, станет брюшной поверхностью зародыша; противоположная сторона, где начинается гастрюляция, будет спинной поверхностью зародыша.

Основные стадии гастрюляции у амфибий

1. *Инвагинация энтодермальных клеток с образованием бластопора.* Гастрюляция начинается с погружения группы краевых энтодермальных клеток, лежащих на спинной поверхности, внутрь зародыша. Это движение клеток внутрь осуществляется в результате изменения их адгезивных свойств, сходных с изменениями, которые были описаны ранее для клеток вегетативной пластинки у морских ежей. Форма этих клеток чрезвычайно резко изменяется. Основная часть тела каждой клетки смещается внутрь зародыша, сохраняя в то же время контакт с наружной поверхностью посредством узкого цитоплазматического тяжа. Такие клетки называются колбовидными.

2. *Инволюция клеток краевой зоны.* Достигнув губы бластопора, мигрирующие клетки краевой зоны вворачиваются внутрь и перемещаются по внутренней поверхности клеток наружного пласта. Таким образом, клетки, образующие губу бластопора, постепенно

меняются. Первыми клетками в составе спинной губы бластопора являются энтодермальные (материал прехордальной пластинки), которые, инвагинируя, образуют ведущий край архентерона. Эти клетки позже становятся клетками глоточного отдела передней (головной) кишки. После них идут клетки, дающие начало мезодерме головы. Следующие клетки, вворачивающиеся через спинную губу бластопора, называются клетками хордомезодермы. Эти клетки будут формировать хорду — временный мезодермальный «позвоночник», который имеет существенное значение для инициации дифференцировки нервной системы. Инволюирующие клетки-предшественники мезодермы мигрируют к анимальному полюсу по фибронектиновой сети, секретируемой клетками крыши бластоцеля.

3. Эпиболия клеток анимального полюса. Клетки анимальной области в это время распространяются посредством эпиболии, смещаясь к бластопору. Основной механизм эпиболии заключается в увеличении числа клеток (посредством делений) и в одновременной интеграции нескольких слоев глубоких клеток в один. По мере перехода новых клеток внутрь зародыша бластопор смещается в вегетативную область и расширяется по мере того, как все больше клеток анимального полушария сходится к губе бластопора и приобретает форму кольца. К этому моменту все предшественники энтодермы оказываются внутри зародыша, эктодерма окружает ее поверхность, а мезодерма располагается между ними.

Гастрюляция у птиц

У зародышей птиц дробление приводит к образованию бластодиска, лежащего над желтком. Эта инертная масса желтка под бластодиском накладывает некоторые ограничения на движения клеток. Поэтому гастрюляция у птиц на первый взгляд кажется сильно отличающейся от гастрюляции у морского ежа или лягушки. Однако на самом деле имеется огромное сходство между ними в этом отношении.

Центральные клетки бластодиска отделены от желтка

подзародышевой полостью и кажутся светлыми, поэтому центр бластодиска называется *area pelucida* (светлое поле). Напротив, клетки, лежащие на периферии бластодиска, кажутся темными из-за их контакта с желтком. Они образуют *area opaca*, или темное поле. Большая часть клеток бластодермы остается на поверхности, формируя эпибласт, но некоторые клетки мигрируют по отдельности в подзародышевую полость и формируют там слой, называемый гипобластом. Эти два слоя бластодермы (эпибласт и гипобласт) соединяются лишь у края *area opaca*, а пространство между ними представляет собой бластоцель. Карта презумптивных зачатков у зародыша птиц ограничивается эпибластом. Клетки гипобласта не принимают участия в построении тела развивающегося зародыша, но его ориентация влияет на ориентацию осевых структур у зародыша. Кроме того, гипобласт индуцирует формирование первичной полосы. Удаление гипобласта останавливало все последующее развитие до тех пор, пока оставшийся эпибласт не регенерировал новый нижний слой.

1. *Инвагинация.* Основной структурой, характерной для процесса гастрюляции у птиц, рептилий и млекопитающих, является **первичная полоска** (рис. 1.4). Впервые она обнаруживается как центрально расположенное утолщение клеточного пласта на заднем крае светлого поля. Это утолщение образуется в результате миграции клеток из латеральной области заднего отдела эпибласта к центру.

Оно постепенно сужается, продвигаясь вперед и превращаясь в узкую дефинитивную первичную полоску. Эта полоска простирается впереди от заднего края светлого поля на 60-75 % всей его длины и маркирует переднезаднюю ось зародыша. По мере того как клетки сходятся, образуя первичную полоску, в ней возникает углубление, называемое **первичной бороздкой**, через которую мигрирующие клетки попадают в бластоцель. На переднем конце первичной полосы имеется утолщение, называемое первичной ямкой, или **гензеновским узелком**. В центре его находится воронкообразное

углубление, через которое клетки могут проходить в бластоцель. Гензеновский узелок является функциональным эквивалентом спинной губы бластопора амфибий.

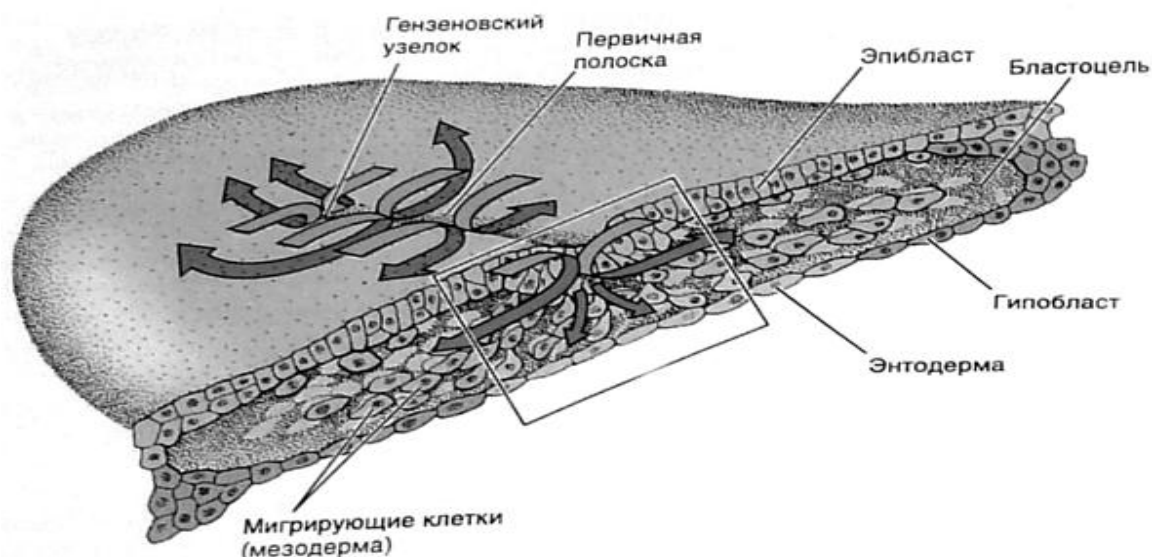


Рис. 1.4. Куриный зародыш в процессе гастрюляции (Гилберт, 2010).

2. Иммиграция мезенхимы. Как только сформировалась первичная полоска, клетки бластодермы начинают мигрировать через губы первичной полоски и далее в бластоцель. Подобно бластопору амфибий, первичная полоска представляет собой непрерывно меняющуюся популяцию клеток. Те клетки, которые мигрируют через гензеновский узелок, проходят в бластоцель и движутся в нем кпереди, формируя головную мезодерму и хорду; клетки, проходящие внутрь через боковые участки первичной полоски, дают начало большей части энтодермальных и мезодермальных органов. В отличие от клеток амфибий, которые мигрируют в бластоцель целыми пластами, клетки зародыша птиц вступают в первичную полоску индивидуально. Вместо того чтобы соединиться в пласт тесно связанных между собой клеток, мигрирующие клетки образуют в бластоцеле рыхлое скопление мезенхимы. В этой миграции важную роль играют внеклеточные сложные полисахариды, такие как

гиалуроновая кислота (линейный полимер глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина). Это вещество продуцируется эктодермальными клетками и накапливается в бластоцеле, где оно сплошным слоем покрывает поверхность вступающих в бластоцель клеток, тем самым поддерживает мигрирующие клетки в диспергированном состоянии. Направление движения клеток, скорее всего, скоррелированы с присутствием фибронектиновой сети во внеклеточной базальной мембране клеток эпибласта.

3. Эпиволия эктодермы. По мере того как презумптивные мезодермальные и энтодермальные клетки движутся внутрь, клетки-предшественники эктодермы окружают желток посредством эпиволии. Этот процесс включает в себя непрерывное образование нового клеточного материала за счет запасов желтка, а также миграцию презумптивных эктодермальных клеток по нижней поверхности желточной оболочки.

Гастрюляция у млекопитающих

Вместо того чтобы развиваться самостоятельно, большинство млекопитающих разработали замечательную стратегию развития внутри своей матери. Зародыш млекопитающих получает питательные вещества непосредственно от матери, а не пользуется накопленным желтком. Эта эволюция повлекла за собой резкие перемены в материнской анатомии (такие, как расширение нижнего отдела яйцевода, образующее матку), а также развитие у плода органа, способного к усвоению материнской пищи — плаценты.

Первое разделение клеток в пределах внутренней клеточной массы заключается в формировании слоя гипобласта. Эти клетки, отделяясь от внутренней клеточной массы, вселяются в полость бластоцисты, где из них образуется энтодерма желточного мешка. Эпибласт затем расщепляется посредством мелких трещин, которые, в конце концов, сливаются, отделяя зародышевый эпибласт от других клеток эпибласта, образующих выстилку амниона. После образования выстилки амнион наполняется секретом, называемым амниотической

жидкостью, которая предотвращает высыхание развивающегося зародыша. Эмбриональный эпибласт содержит все клетки, необходимые для образования самого зародыша. На заднем крае эпибласта образуется локальное утолщение, в итоге дающее начало первичной полоске, через которую мигрируют клетки-предшественники энтодермы и мезодермы. Как и у зародыша птиц, клетки, мигрирующие между слоями гипобласта и эпибласта, покрыты гиалуроновой кислотой.

В то время как в зародышевом эпибласте наблюдаются движения клеток, напоминающие движения клеток при гастрюляции у рептилий и птиц, из клеток трофобласта образуются органы, характерные только для млекопитающих и обеспечивающие выживание плода в матке. Часть клеток трофобласта — нормально делящиеся клетки — составляет слой, называемый цитотрофобластом, другая часть образует популяцию, в которой деления ядер не сопровождаются цитокинезом, в результате чего формируется синцитиальный трофобласт. На его поверхности образуются многочисленные ворсинки. Они внедряются в слизистую оболочку матки, закрепляя в ней зародыша. Матка в свою очередь посылает в эту область кровеносные сосуды, где они затем контактируют с синцитиальным трофобластом. Вскоре после этого мезодермальная ткань простирается кнаружи от гастрюлирующего зародыша, мигрирует через первичную полоску, но становится внезародышевой, а не зародышевой мезодермой, и входит в ворсинки трофобласта. Из нее формируются кровеносные сосуды, несущие питательные вещества от матери к зародышу. Узкий соединительный стебелек из внезародышевой мезодермы соединяет зародыш с трофобластом, а затем формирует сосуды пупочного канатика. Полностью развитый орган, состоящий из ткани трофобласта и содержащий внезародышевые кровеносные сосуды (мезодермального происхождения), называется хорионом; сливаясь со стенкой матки, хорион образует плаценту.

Формирование внезародышевых оболочек

Зародышевое развитие у рептилий, птиц и млекопитающих в процессе эволюции приняло новое направление. У рептилий возник механизм откладки яиц на суше, позволивший им использовать ниши, расположенные далеко от воды. Для этого у зародыша появились четыре внезародышевые оболочки, служащие посредниками между ним и средой обитания (рис. 1.5).

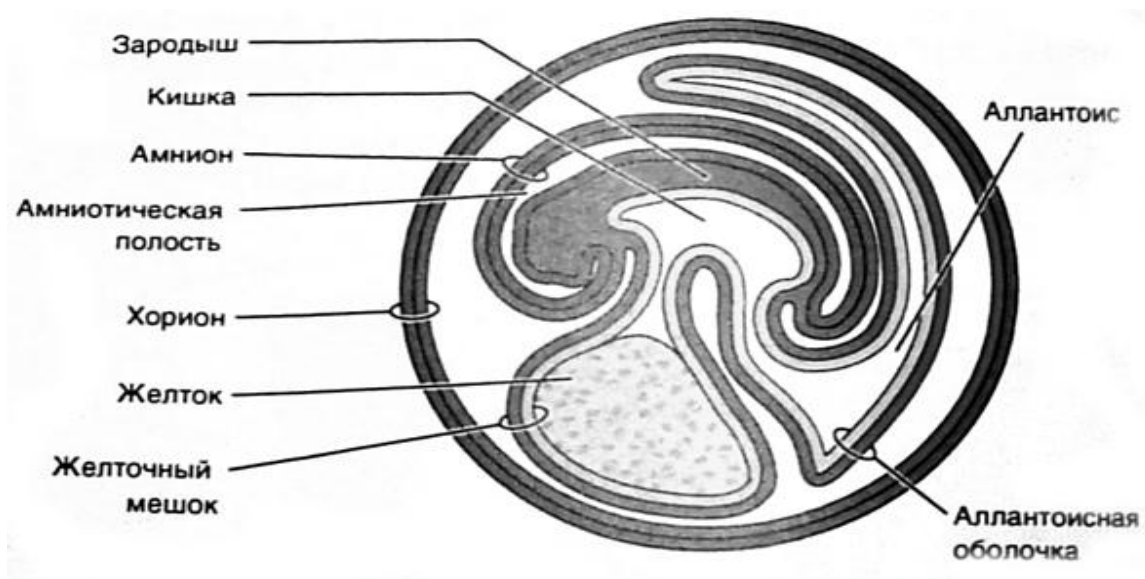


Рис. 1.5. Внезародышевые оболочки 9-дневного куриного зародыша (Гилберт, 2010).

И хотя у большинства млекопитающих вместо скорлупы сформировалась плацента, у них сохранились те же самые внезародышевые оболочки. У зародышей рептилий, птиц и млекопитающих на ранней стадии развития четких различий между зародышевыми и внезародышевыми областями обнаружить не удастся. Однако по мере формирования тела зародыша расположенные на периферии бластодермы эпителиальные ткани образуют ряд туловищных складок, окружающих развивающийся зародыш и тем самым изолирующих его от желтка; они очерчивают контуры собственно зародышевых областей.

Внезародышевые оболочки образуются посредством разрастания эктодермального и энтодермального эпителиев, подостланных мезодермой. При комбинации эктодермы с мезодермой формируются амнион и хорион; комбинация энтодермы и мезодермы дает начало желточному мешку и аллантоису. Клетки энтодермальной или эктодермальной ткани действуют как функционирующие эпителиальные клетки, а мезодерма дает обширную сеть кровеносных сосудов, несущих кровь от зародыша к эпителию и от эпителия к зародышу.

Первая проблема, возникающая при развитии яйца на суше, - это высыхание. Эмбриональные клетки, оказавшись вне водной среды, должны были бы очень быстро высохнуть. Эту водную среду обеспечивает **амнион**. Клетки амниона секретируют амниотическую жидкость, и таким образом эмбриогенез по-прежнему осуществляется как бы в воде. Это эволюционное новшество оказалось столь значительным и специфическим, что рептилий, птиц и млекопитающих объединили в одну группу амниот. Вторая проблема для развития яйца, отложенного на суше, — газообмен. Он осуществляется с помощью **хориона** — самой наружной внезародышевой оболочки. У птиц и рептилий она плотно прилегает к скорлупе и тем самым делает возможным обмен газами между яйцом и наружной средой. У млекопитающих, как мы видели, хорион включается в плаценту, которая кроме дыхательной осуществляет много других функций.

Аллантоис накапливает конечные продукты азотистого обмена и участвует в обмене газов. У рептилий и птиц аллантоис представляет собой большой мешок, поскольку другого пути накопления токсических побочных продуктов метаболизма, образующихся у развивающегося зародыша, нет. Мезодермальный слой аллантоиса часто сближается и сливается с мезодермальным слоем хориона, образуя хориоаллантонскую оболочку. Эта чрезвычайно сильно васкуляризованная оболочка имеет очень важное

значение для развития куриного зародыша — она ответственна за необходимый для образования костей транспорт кальция из скорлуповой оболочки к зародышу. Размеры аллантоиса у млекопитающих зависят от того, насколько хорошо справляется хорионическая плацента с удалением конечных продуктов азотистого обмена из зародыша. У человека аллантоис представляет собой рудиментарный мешок, тогда как у свиньи это большой и важный орган.

Желточный мешок у птиц и рептилий формируется раньше других внезародышевых оболочек, так как он обеспечивает питание зародышей. Он образуется из энтодермальных клеток, которые обрастают желток. Желточный мешок соединяется со средней кишкой трубкой, открытой на обоих концах, — желточным протоком. В результате стенки желточного мешка и стенки кишки переходят друг в друга. Кровеносные сосуды в мезодерме спланхноплевры желточного мешка переносят питательные вещества из желтка в тело зародыша; непосредственно через желточный проток желток не поступает в тело зародыша. Сначала энтодермальные клетки переваривают белки желтка до растворимых аминокислот, которые затем переходят в кровеносные сосуды, окружающие желточный мешок.

Таким образом, четыре внезародышевые оболочки делают возможным развитие зародыша на суше.

1.2.5. Раннее развитие позвоночных: производные эктодермы

Итак, мы приступаем к изучению новой фазы развития — **органогенеза**, т. е. образования специфических тканей и органов. У позвоночных в результате гаструляции образуется зародыш, состоящий из энтодермального, мезодермального и эктодермального листков. Непосредственно под дорсальным участком эктодермы располагается материал хордомезодермы. Взаимодействие этого материала с лежащей над ним эктодермой является одним из

наиболее важных во всем развитии; оно побуждает эктодерму формировать нервную трубку, которая даст начало головному и спинному мозгу. Действие, посредством которого хордомезодерма инициирует развитие нервной трубки из эктодермы, называется **первичной эмбриональной индукцией**, а клеточный ответ на индукцию, приводящий к трансформации плоского слоя эктодермальных клеток в полую нервную трубку, называется **нейруляцией**. Зародыш, претерпевающий эти изменения, называется **нейрулой**. В эктодерме образуются клетки трех типов: 1) клетки нервной трубки, 2) клетки эпидермиса кожи и 3) клетки нервного гребня, мигрирующие из области, которая соединяет нервную трубку с эпидермисом. Механизмы образования нервной трубки у амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих (всех позвоночных) сходны.

Первым указанием на то, что данный участок эктодермы предназначен стать нервной тканью, является изменение формы клеток. Эктодермальные клетки, расположенные в центре дорсальной области, становятся удлинёнными, тогда как клетки, предназначенные для образования эпидермиса, уплощаются (рис. 1.6).



Рис. 1.6. Нейруляция у куриного зародыша (Гилберт, 2010).

Удлинение дорсальных эктодермальных клеток приводит к тому, что эти перспективные нейральные области приподнимаются над окружающей их эктодермой, образуя нервную пластинку. Она занимает не менее 50 % площади всей эктодермы. Вскоре после образования нервной пластинки ее края утолщаются и движутся вверх, образуя нервные валики, а в центре нервной пластинки возникает U-образный нервный желобок, разделяющий зародыша на будущие правую и левую половины. Нервные валики, приподнимаясь, движутся навстречу друг другу и, в конечном счете, сливаются по среднеспинной линии зародыша. В результате нервная пластинка превращается в лежащую под эктодермальным эпителием нервную трубку. Клетки в области, соединяющей этот эпителий с нервной трубкой, являются клетками нервного гребня. Позднее эти клетки мигрируют по всему зародышу, давая начало нескольким клеточным популяциям, в том числе пигментным клеткам и клеткам периферической нервной системы.

Формирование нервной трубки происходит не одновременно во всей эктодерме. Нейруляция в головной области продвинулась уже далеко, тогда как в хвостовом отделе еще продолжается гастрюляция. Два открытых конца нервной трубки называются соответственно передним и задним *нейропором*.

Важнейшими этапами формирования мозга в эмбриогенезе являются — дифференцировка части клеток эктодермы в нейроэктодерму, размножение клеток эктодермы и их дифференцировка в нейробласты (предшественники нейронов) и глиобласты, миграция клеток в зоны окончательного нахождения, образование из этих клеток различных типов нейронов и глиальных клеток, установление синаптических связей между нейронами, запрограммированная гибель части клеток.

Формирование отделов головного мозга

Анатомический уровень. Ранние стадии развития головного мозга у большинства позвоночных очень сходны. У раннего

зародыша млекопитающих нервная трубка на всем ее протяжении прямая. Позже самая передняя ее часть претерпевает чрезвычайно резкие изменения — она раздувается, подразделяясь на три первичных мозговых пузыря: первичный передний мозг (*prosencephalon*), средний мозг (*mesencephalon*) и первичный задний мозг (*rhombencephalon*). К тому времени, когда замкнется задний конец нервной трубки, по бокам развивающегося переднего мозга образуются вторичные расширения — глазные пузыри. Кроме того, будущий головной мозг изгибается таким образом, что места изгиба отмечают границы полостей мозга. Два основных изгиба называются головным и затылочным (шейным).

Процесс образования мозговых пузырей у раннего зародыша характеризуется чрезвычайно высокой скоростью и, кроме того, тем, что эти огромные вздутия образуются в основном за счет увеличения размеров полостей, а не за счет утолщения их стенок. У куриного зародыша объем головного мозга между третьими и пятыми сутками развития увеличивается в 30 раз. Полагают, что такое быстрое увеличение размеров вызвано давлением на стенки нервной трубки заключенной в ней жидкостью. Было показано, что в нервной трубке куриного зародыша на определенной стадии возникает сужение, отделяющее будущий головной мозг от спинного — именно оно делает возможным расширение мозга, потом перегороденный участок нервной трубки снова открывается.

Первичный передний мозг затем подразделяется на передний конечный мозг (*telencephalon*) и промежуточный мозг (*diencephalon*). Конечный мозг впоследствии формирует большие полушария головного мозга, промежуточный — таламическую и гипоталамическую области; средний мозг на отделы не подразделяется, а его полость становится третьим желудочком, или силвиевым водопроводом. Первичный задний мозг подразделяется на будущий продолговатый мозг (*myelencephalon*) и лежащий впереди него собственно задний мозг (*telencephalon*). Будущий продолговатый

мозг, в конечном счете, становится продолговатым мозгом (*medulla oblongata*), нейроны которого формируют нервы, регулирующие деятельность дыхательной, желудочно-кишечной и сердечнососудистой систем. А задний мозг формирует мозжечок (*cerebellum*) — отдел мозга, ответственный за координацию движений, поддержание позы и чувство равновесия.

Тканевой уровень. Исходно нервная трубка образована слоем **герминативного нейрального эпителия** толщиной в одну клетку (нейробласты). Этот слой представляет собой быстро делящуюся клеточную популяцию. Однако вскоре некоторые клетки перестают делиться, они мигрируют к периферии нервной трубки, где происходит их дальнейшая дифференцировка. Она зависит от положения, которые займут эти нейробласты, оказавшись вне области делящихся клеток.

В то время как клетки, лежащие у просвета нервной трубки, продолжают делиться, мигрирующие клетки образуют второй слой вокруг исходного слоя клеток нервной трубки. Этот второй слой постепенно утолщается по мере того, как все большее число клеток добавляется к нему из герминативного нейрального эпителия; этот слой называют **плащевым**, а герминативный эпителий теперь носит название **эпендимного** слоя. Дифференцировка клеток плащевого слоя приводит к образованию, как нейронов, так и глиальных клеток. Нейроны устанавливают между собой связи и посылают в направлении от просвета аксоны, образуя бедный клетками краевой слой. Со временем глиальные клетки заключают аксоны этого слоя в миелиновые футляры, придающие им беловатую окраску. Поэтому плащевой слой, содержащий тела нейронов, часто называют серым веществом, а содержащий их аксоны краевой слой — белым веществом (краевой слой).

В спинном и продолговатом мозге основная трехкомпонентная структура — эпендимный, плащевой и краевой слои — сохраняется в течение всего развития. Серое вещество (плащ, или мантия)

постепенно принимает форму бабочки, окруженной белым веществом, и оба они заключены в соединительнотканый чехол. По мере дифференцировки нервной трубки в ней образуется продольная борозда (*sulcus limitans*), делящая ее на дорсальную и вентральную половины. Дорсальная половина получает информацию от чувствительных (сенсорных) нейронов, вентральная участвует в осуществлении различных двигательных (моторных) функций.

В головном мозге, однако, миграция клеток, дифференциальный рост и селективная гибель клеток (апоптоз) вызывают модификацию трехзонной структуры. Например, в мозжечке некоторые нейробласты серого вещества мигрируют по наружной поверхности развивающегося мозжечка, образуя новый герминативный слой вблизи наружной границы нервной трубки. Нейробласты, происходящие из клеток этого слоя, мигрируют обратно в развивающееся белое вещество мозжечка, в котором формируют зернистый слой. Из исходного эпендимного слоя возникают разнообразные нейроны и глиальные клетки, включая отличающиеся от других нейронов крупные клетки Пуркинье. Каждый нейрон Пуркинье имеет огромный дендритный аппарат, который подобен опахалу над луковичеобразным телом клетки. Типичная клетка Пуркинье может образовывать до 100000 синапсов с другими нейронами — больше, чем любой другой из изученных нейронов. У каждого нейрона Пуркинье имеется тонкий аксон, соединяющий его с другими клетками в глубоких ядрах мозжечка. Поэтому правильное функционирование и развитие мозжечка зависит во многом от его пространственной организации.

Трехзонная структура мозга в больших полушариях головного мозга также претерпевает существенные изменения. Некоторые нейробласты из плащевого слоя мигрируют через белое вещество и образуют вторую зону нейронов, называемую новой корой (неопаллиумом, или неокортексом). Эта новая кора мозга затем подразделяется на шесть слоев, содержащих тела нейронов.

Дифференцировка этих слоев продолжается после рождения ребенка в течение первой половины детства.

Нервный гребень и его производные

Нервный гребень (НГ) происходит из эктодермы, но его значение для развития зародыша столь велико, что иногда нервный гребень называют четвертым зародышевым листком. Клетки нервного гребня активно мигрируют на большие расстояния и являются родоначальниками громадного числа типов клеток, включая 1) нейроны и 2) вспомогательные глиальные клетки сенсорной, симпатической и парасимпатической нервной системы; 3) клетки надпочечника, синтезирующие адреналин; 4) меланоциты — содержащие пигмент клетки эпидермиса и 5) скелетные и соединительнотканые компоненты головы. Судьба клеток нервного гребня зависит от того, куда они мигрируют и где поселяются.

Пути миграции клеток нервного гребня. Нервный гребень представляет собой временную структуру, клетки которой распространяются по телу вскоре после смыкания нервной трубки. Ученые установили три главных пути, по которым эти клетки мигрируют в разные области. Первый путь простирается в вентральном направлении через передний отдел сомита. Некоторые из этих клеток достигают спинной аорты, где из них формируются симпатические ганглии. Ганглии представляют собой скопления нейронов, которые после стимуляции их нейронами спинного мозга передают полученные импульсы клеткам-мишеням. В особых областях тела клетки нервного гребня, мигрирующие тем же путем, образуют скопления и формируют секретирующие адреналин клетки мозгового вещества надпочечников.

Второй путь миграции — путь клеток, лежащих напротив задних отделов сомитов. Такие клетки нервного гребня перемешаются вдоль нервной трубки вперед или назад и затем вступают в передние отделы своих собственных или прилежащих к ним сомитов. Такие клетки объединяются с некоторыми из клеток

нервного гребня, исходно расположенных напротив переднего отдела сомита и вместе с ними формируют ганглии дорсальных корешков — скопления нейронов, переключающих сенсорную информацию на спинной мозг.

Третий основной путь миграции клеток нервного гребня проходит в дорсовентральном направлении под покровным эпителием зародыша. Некоторые из клеток, мигрирующих по этому пути, дифференцируются в пигментные клетки кожи (у млекопитающих - меланоциты).

Механизмы миграции клеток нервного гребня. Начало миграции клеток НГ связано с их мезенхимальной трансформацией — выделением из пласта нейроэпителия и приобретением признаков мезенхимальных клеток. Это происходит за счет потери клеточных контактов, изменением набора молекул клеточной адгезии (их количество сильно снижается). Также миграция осуществляется путем взаимодействия с внеклеточным матриксом (фибронектин, ламинин, гиалуроновая кислота и др.). Передние отдела склеротома вырабатывают тенасцин, задние — Т-кадгерин. Хорда ингибирует миграцию.

Скорее всего, миграция клеток контролируется субстратом, по которому они продвигаются. Возможно, клетки нервного гребня узнают правильный путь потому, что он маркирован белком фибронектином. Было обнаружено, что мигрирующие клетки нервного гребня, прикрепляясь к этому белку, движутся по нему. Клетки нервного гребня обнаруживают также сродство к ламинину, другому белку, секретируемому клетками и участвующему в образовании внеклеточного матрикса. Кроме фибронектина и ламинина, в детерминации миграционных путей клеток нервного гребня могут играть важную роль и другие вещества. Одним из таких веществ является гиалуроновая кислота. Для миграции клеток нервного гребня необходимо пространство, в котором они могут двигаться. Полагают, что гиалуроновая кислота вызывает

образование свободного от клеток пространства, в которое затем внедряются клетки нервного гребня.

Факторы, определяющие детерминацию клеток НГ:

1) растворимые факторы внеклеточного матрикса (ВКМ) (различные биологически активные вещества), 2) компоненты ВКМ, 3) время выделения из нейроэпителия (меланоциты — последние), 4) морфогены: BDNF (нейротрофический фактор) — чувствительные нейроны спинномозговых ганглиев, холинэргический фактор дифференцировки, цилиарный нейротрофический фактор — холинэргические нейроны, ФРФ, ФРН, глюкокортикоиды — адренэргические нейроны.

Развитие глаза

Развитие органа зрения начинается по бокам развивающегося переднего мозга в стенке будущего промежуточного мозга. У человека это происходит на 22-й день развития, когда в стенке нервной трубки образуются латеральные выпячивания. Дифференциальный рост выпячиваний приводит к образованию глазных пузырей, связанных с промежуточным мозгом глазными стебельками. Глазные пузыри приходят в контакт с эктодермальным покровным эпителием зародыша и индуцируют образование в нем хрусталиковых плакод (плакоды — зачатки некоторых органов, закладывающиеся в виде утолщений эктодерм эпителия). Сформировавшись, хрусталиковая плакода в свою очередь вызывает изменения в глазном пузыре, передняя стенка которого инвагинирует и пузырь превращается в двустенную глазную чашу.

По мере продолжения инвагинации глазной стебелек, соединяющий глазную чашу и головной мозг, сужается, и связь между ними редуцируется до узкой щели. Одновременно с этим два слоя глазной чаши начинают дифференцироваться в разных направлениях. Клетки наружного слоя продуцируют пигмент и, в конце концов, образуют пигментированный слой, называемый

пигментной сетчаткой. Число клеток внутреннего слоя быстро увеличивается, и эти клетки дают начало множеству светочувствительных (фоторецепторных) нейронов, глиальных клеток, промежуточных нейронов и ганглиозных клеток. Все эти клетки в совокупности составляют нейральную ретину, или сетчатку. Аксоны ганглиозных клеток нейральной сетчатки встречаются у основания глаза и далее проходят по главному стебельку, который после этого начинают называть зрительным нервом. Хрусталиковая плакода по мере своей дифференцировки в definitivo хрусталик округляется и приходит в контакт с вновь образованным над ней покровным эпителием — она индуцирует образование в нем прозрачной роговицы. Непосредственно перед хрусталиком лежит радужка, придающая индивидууму характерный для него цвет глаз и содержащая мышцы, которые контролируют размер зрачка. Из трех основных типов нейронов сетчатки (ганглиозные, биполярные и фоторецепторные) фоторецепторные палочки и колбочки завершают свою дифференцировку последними (поэтому новорожденные дети плохо различают цвета — сначала красный и т. д.). По мере развития этих наружных нейронов тело каждого из них образует вырост, содержащий некоторые специализированные органеллы, мембраны этих клеток складываются, образуя мешки, в которых размещаются зрительные пигменты.

Эпидермис и его производные

Клетки, покрывающие зародыш после завершения нейруляции, представляют собой презумптивный эпидермис. Первоначально эта ткань образует слой толщиной в одну клетку, однако у большинства позвоночных она вскоре становится двухслойной структурой. Наружный слой дает начало перидерме — временному покрову, который затем будет замещен, как только лежащий под ним слой дифференцируется в истинный эпидермис. Этот внутренний слой, называемый *базальным слоем*, дает начало всем клеткам эпидермиса.

Сначала клетки базального слоя делятся, образуя другую,

наружную популяцию клеток — *шиповатый слой*. Вместе эти два слоя обозначают термином *ростковый слой*. Клетки росткового слоя делятся, образуя *зернистый*, или *гранулярный слой*, названный так потому, что его клетки содержат гранулы белка кератина. В отличие от клеток предыдущего слоя, клетки зернистого слоя не делятся. Они превращаются в кератиноциты. Клетки этого слоя заполняются кератином по мере того, как они стареют и мигрируют наружу. Здесь они формируют *роговой слой*, превращаясь в плоские мешки с кератином. Ядра оттесняются к одной стороне клетки. Вскоре после рождения ребенка клетки рогового слоя слущиваются и замещаются новыми клетками, поступающими из зернистого слоя. В течение всей жизни мертвые кератинизированные клетки рогового слоя слущиваются (человек теряет примерно 1,5 г мертвых клеток ежедневно) и замещаются новыми клетками, источником которых служат делящиеся клетки росткового слоя.

Пигментные клетки нервного гребня (*меланоциты*) также поселяются в ростковом слое, где они передают свои пигментные мешочки (меланосомы) развивающимся кератиноцитам. Клетке, образовавшейся в ростковом слое взрослого человека, требуется примерно две недели, чтобы достичь рогового слоя. У больных псориазом, характеризующимся слущиванием огромных количеств эпидермальных клеток, для этого требуется всего два дня.

Однако один эпидермис не образует кожи. Подстилающая его мезодерма дает начало собственно коже, называемой также дермой или кориумом. Взаимодействуя в определенных местах, дерма и эпидермис образуют *производные кожи*: волосы, чешуи или перья (в зависимости от вида животного), потовые и сальные железы.

1.2.6. Раннее развитие позвоночных: производные мезодермы

Периоды внутриутробного развития человека

Большинство эмбриологов делят весь период внутриутробного

развития человека на: 1) эмбриональный, или зародышевый, 2) фетальный, или плодный. Границей между ними служит конец 2-го месяца зародышевой жизни. Эмбриональный период характеризуется процессами органогенеза. К концу 2-го месяца формируются и занимают свое постоянное положение зачатки всех органов. В течение плодного периода происходят рост и функциональное созревание органов и тканей плода.

В течение сомитного периода происходит сегментация и дальнейшая дифференцировка мезодермы. Тело зародыша обособляется от внезародышевых частей. По краю зародышевого эпибласта появляется туловищная складка, которая отделяет зародыш от стенки амниона. По мере углубления этой складки тело зародыша поднимается над дном амниотического пузырька, а крыша желточного пузырька втягивается в тело зародыша, давая начало кишечной энтодерме, из которой образуется стенка первичной кишки. Остальная желточная энтодерма идет на образование стенки желточного мешка. Одновременно с этим в теле зародыша происходит превращение нервной пластинки в нервную трубку. По мере замыкания нервной пластинки образуется ганглиозная пластинка, которая затем сегментируется и дает начало зачаткам спинальных ганглиев.

С образованием нервного желобка увеличивается пространство между экто- и энтодермой. Это создает условия для роста мезодермы. Участки мезодермы, прилегающие к хорде и нервной трубке, подвергаются сегментации — распадаются на метамерно расположенные участки, отделенные друг от друга перетяжками, — сомиты. Сегментация мезодермы происходит постепенно, начинаясь на головном конце тела. В среднем, каждые сутки образуется 2-3 сомита, так что по их количеству можно судить о возрасте зародыша. К концу периода сегментации (35 сут.) их насчитывается 43-44 пары.

Боковые участки мезодермы остаются несегментированными и

дают начало спланхнотомам, или боковым пластинкам. В них потом появляется полость, и они расслаиваются на два листка — париетальный (прилегающий к кожной эктодерме) и висцеральный (соприкасающийся с энтодермой). Полость между ними образует вторичную полость тела, или целом. В дальнейшем она подразделяется на плевральную, перикардальную и перитонеальную полости.

Дифференцировка сомитов

Одной из главных задач гастрюляции является перемещение энтодермы глубоко внутрь зародыша и мезодермальных клеток между слоями эктодермы и энтодермы. Мезодермальные и энтодермальные органы формируются одновременно с образованием нервной трубки. У куриного зародыша мезодермальные клетки, не участвующие в формировании хорды, мигрируют латерально, образуя толстые полосы, идущие продольно вдоль каждой стороны хорды и нервной трубки. Когда первичная полоска претерпевает регрессию, а нервные валики в центральной части зародыша начинают сближаться, эта мезодерма постепенно разделяется на треугольные блоки клеток, называемые сомитами. Первые сомиты появляются в переднем отделе зародыша, новые сомиты формируются позади них через равные интервалы времени.

Под воздействием факторов базальной мембраны вентральные клетки сомита (т. е. те, которые находятся дальше других от спинной стороны зародыша — внутренние) начинают митотически делиться, теряют признаки, характерные для округлых эпителиальных клеток, и снова становятся мезенхимными клетками. Часть сомита, в которой образуются эти клетки, называют склеротомом; мезенхимные клетки, в конечном счете, становятся хондроцитами и образуют осевой скелет (позвонки, ребра и т. д.). Хондроциты ответственны за секрецию специфических типов коллагенов и гликозаминогликанов (таких, как хондроитинсульфат), характерных для хряща. Оставшиеся эпителиальные клетки сомита (совокупность которых называется

дермамиотомом) формируют двуслойную плотную трубку. Наружный слой ее называется дерматомом; он дает начало мезенхимной соединительной ткани кожи — дерме, или кориуму. Внутренний слой называется миотомом; эти клетки образуют поперечнополосатые мышцы стенки тела и конечностей.

В мезодерме зародыша на стадии нейрулы можно различить 5 областей.

1) Хордомезодерма. Дает начало хорде, провизорному органу, основные функции которого состоят в индукции нервной трубки и в установлении оси тела. Несегментированная скелетная ось у хордовых животных. Сохраняется в течение всей жизни у некоторых рыб, ланцетника, круглоротых. У остальных — только у эмбрионов. Ее остатки входят в состав позвонков, межпозвонковых дисков у млекопитающих, у птиц полностью исчезает.

2) Дорсальная (параксиальная) мезодерма. Из этой мезодермы, локализованной по обе стороны нервной трубки и хорды, будут образовываться многие ткани тела — кости, хрящ, дерма и поперечнополосатая мускулатура.

3) Промежуточная мезодерма (материал сегментных ножек). Из нее формируются органы выделения и протоки половых желез.

4) Несегментированная мезодерма боковых пластинок. Из нее развиваются сердце, кровеносные сосуды, клетки крови, гладкая мускулатура, выстилка полости тела (целома) и все мезодермальные компоненты конечностей, кроме поперечнополосатой мускулатуры. Боковые пластинки принимают также участие в формировании внезародышевых оболочек.

5) Мезенхима головы.

Дорсальная мезодерма

Источником образования хрящевой и костной ткани является мезенхима. На ранней стадии развития весь скелет зародыша состоит из мезенхимных зачатков, которые лишь по форме отдаленно напоминают очертания будущих костей. В дальнейшем эта мезенхима

или непосредственно превращается в костную ткань, или предварительно замещается гиалиновым хрящом, на месте которого впоследствии развивается кость. В последнем случае хрящ разрушается и замещается костной тканью.

Хондрогенез (развитие хряща)

Мезенхимные клетки склеротома становятся хондроцитами и образуют осевой скелет (позвонки, ребра и т. д.). Хондроциты ответственны за секрецию специфических типов коллагенов и гликозаминогликанов (таких, как хондроитинсульфат), характерных для хряща. Хондробласты начинают синтез и секрецию веществ для построения хрящевого матрикса (протеогликаны). Протеогликаны тормозят адгезию клеток, что в свою очередь стимулирует дифференцировку хондроцитов.

Можно выделить следующие этапы хондрогенеза:

- предхрящевая ткань;
- первичная хрящевая ткань (появление межклеточного вещества);
- малодифференцированный хрящ (новые белки);
- высокодифференцированный хрящ;
- асбестовая дистрофия центральных частей межклеточного вещества, приводящая к их отмиранию и врастанию кровеносных сосудов (может приводить к зарастанию костной тканью).

Существует несколько типов хрящей. Гиалиновый (большая часть скелета у зародыша, у взрослых — суставные, реберные хрящи, носовой перегородки и др.), эластический, волокнистый.

Остеогенез (развитие кости)

Существуют два способа формирования костей, и оба включают в себя трансформацию предсуществующей мезенхимной (соединительной) ткани в костную ткань. Процесс образования кости непосредственно из мезенхимы называется прямым окостенением (интрамембранным), а образование кости на месте внутри разрушающегося хряща — непрямым, или эндохондральным

остеогенезом. По первому типу (непосредственно из мезенхимы) развиваются плоские кости крыши черепа, большинство лицевых костей, нижняя и верхняя челюсти. Кости основания черепа, а также кости осевого скелета (позвоночник) и скелета конечностей проходят предварительно хрящевую стадию.

Прямое (интрамембранное) окостенение. Образование плоских костей, например, костей черепа, осуществляется посредством интрамембранного окостенения. Рыхло расположенные мезенхимные клетки пролиферируют и образуют плотные скопления. Некоторые из этих клеток дают начало капиллярам, а другие изменяют свою форму и становятся остеобластами — клетками, способными секретировать костный матрикс. Синтезируемый ими (коллагено-гликозаминогликановый) матрикс обладает способностью связывать соли кальция, приносимые капиллярами в область окостенения. Таким образом, матрикс становится кальцифицированным (обызвествленным). Время от времени остеобласты захватываются костным матриксом, и тогда они становятся остеоцитами — костными клетками. По мере обызвествления костные спикеры распространяются радиально от центра, где началось окостенение. Кроме того, целая область обызвествленных спикеров окружается плотно лежащими над ней мезенхимными клетками, формирующими периост, или надкостницу. Клетки на внутренней поверхности надкостницы также становятся остеобластами и секретируют костный матрикс параллельно с матриксом уже образовавшихся спикеров. Таким образом формируется много слоев кости.

Эндохондральное окостенение заключается в замещении хрящевой ткани костной. В данном случае хрящ служит моделью для последующего формирования кости. Сначала образуется хрящевой зачаток будущих костей позвоночного столба, таза и конечностей, а позже хрящ замещается костной тканью. У зародыша человека в возрасте 7 недель «длинные кости» образованы только хрящем, окруженным оболочкой из плотной мезенхимы. Эта оболочка

становится надкостницей. Затем капилляры из надкостницы проникают в центр хрящевого зачатка, ранее лишенного кровеносных сосудов. Хрящ реагирует на это формированием зон интенсивной клеточной пролиферации, гипертрофии клеток (увеличения их размеров) и клеточной гибели. Если клетка находится в зоне пролиферации, то она лежит вблизи несущего кислород кровеносного сосуда и хорошо снабжается гликогеном — источником энергии. Однако в зоне гипертрофии снабжение клеток кислородом ухудшается. Дыхание клеток становится анаэробным, и митохондрии переключаются с образования АТФ на накопление кальция. Снабжение клеток гликогеном полностью прекращается, и митохондрии более не могут накапливать кальций (его накопление — активный энергоемкий процесс). В результате отмирающие хондроциты высвобождают кальций, и за его счет формируется провизорный обызвествленный (кальцифицированный) матрикс. Osteoblastы выстраиваются в ряд вдоль обызвествленных полос матрикса и начинают откладывать на них кость. В конечном счете, эти полосы исчезают, и остается лишь кость, сформированная остеобластами. Таким образом, кость оказывается там, где ранее находился хрящ.

Остеогенез в длинных костях начинается в диафизе и постепенно распространяется к концам хрящевого зачатка. У новорожденного младенца диафизы длинных костей обызвествлены, тогда как их концы (называемые эпифизами) все еще образованы хрящом. Вскоре после рождения в хрящевых эпифизах (по мере того как в них проникают кровеносные сосуды) возникают вторичные центры окостенения. Между кальцинированной тканью в эпифизах и диафизом продолжает сохраняться хрящевая пластинка. Эта пластинка играет важную роль в росте ребенка после рождения, так как она отвечает пролиферацией на поступающий в нее гормон роста. Гормоны также ответственны и за прекращение роста: высокие концентрации эстрогена или тестостерона вызывают слияние центров

окастения в эпифизах и диафизе, что приводит к утрате хрящевой пластинки. Такое эпифизарное слияние происходит в юношеском возрасте, причем у девушек на два года раньше, чем у юношей.

По мере увеличения костного матрикса на периферии кости в ее внутренней части образуются полости, и формируется костный мозг. Эта деструкция костной ткани осуществляется остеокластами — многоядерными клетками, поступающими в кость по кровеносным сосудам (моноциты, мононуклеарные фагоциты). Остеокласты способны растворять как неорганические, так и белковые компоненты костного матрикса. Кровеносные сосуды поставляют в костный мозг также кроветворные клетки, которые остаются в нем на всю жизнь. Остеокласты (костедробители) — крупные симпласты, содержащие до сотни ядер и большое количество цитоплазмы, богатой гидролизующими ферментами (кислая фосфатаза). Поверхность, обращенная к разрушаемой ткани, имеет вид «щетковидной» каемки, состоящей из множества складок плазмалеммы с пузырьками и кристаллами минеральных солей. Остеокласты разъедают хрящ, продвигаясь вместе с сосудами, оставляют за собой каналы. Туда поступают остеобласты и формируют костное вещество.

Миогенез

Выделяют различные типы мышечной ткани:

- 1) скелетные (источник — миотомы и мезенхима);
- 2) сердечные (источник — висцеральный листок мезодермы);
- 3) гладкие (мезенхима);
- 4) мышечная ткань нейрального происхождения — сфинктер и дилататор зрачка, цилиарная мышца глаза;
- 5) миоэпидермальные клетки слюнных, потовых и молочных желез (кожная эктодерма и прехордальная пластинка).

Дифференцировка скелетной мышцы

Источником развития скелетной мышечной ткани являются миотомы, откуда выселяются и мигрируют в места закладки

конкретных мышц клетки миотомов (премиобласты). До того, как они превращаются в пролиферирующие миобласты, они проходят стадию бипотенциальных премиобластов (способны развиваться как в миобласты, так и в фибробласты). Претерпев ряд делений, основная часть миобластов выходит из митотического цикла. Последний митоз — «квантальный» — критическое событие, после которого одна или обе дочерние клетки переходят в удлинённый период G_1 и приобретают способность к слиянию. На этой стадии часть миобластов обособляется в виде клеток-саттелитов, которые сохраняют способность к миогенной дифференцировке в течение всей своей жизни. Далее из миобластов образуются мышечные трубочки, способные к синтезу сократительных белков и формированию саркомеров. Слияние миобластов, приводящее к образованию мышечных трубочек, четко разделяется на два отдельных процесса. На первой стадии наблюдаются миграция клеток, узнавание и выстраивание их в ряд. Вторая стадия миогенеза — это процесс слияния миобластов. Как только миобласты выстраиваются в цепочку и прекращают делиться, они начинают синтезировать тропомиозин, тяжелую цепь миозина и специфичные для мышц изоформы актина и креатинкиназы. Однако для того, чтобы мышечное волокно созрело окончательно и приобрело функцию сокращения, необходимо участие клеток мезенхимы. В области закладки мышц уже присутствуют клетки мезенхимы. Эти клетки далее будут образовывать соединительнотканые структуры мышцы, сюда прорастут кровеносные капилляры, а также аксоны двигательных и чувствительных нейронов.

Мезодерма боковых пластинок

Несегментированная мезодерма боковых пластинок расщепляется продольно на соматическую (или париетальную) мезодерму, которая подстилает покровный эпителий, и спланхническую (висцеральную) мезодерму, лежащую над энтодермой. Между этими двумя слоями образуется вторичная

полость тела — целом, который простирается от будущего шейного отдела до заднего конца тела. На более поздних стадиях развития соматическая мезодерма образует складки, разделяющие целом на отдельные полости. У млекопитающих целом подразделен на плевральную, перикардальную и перитонеальную полости.

Формирование сердца. У зародышей позвоночных сердце исходно развивается в переднем отделе, в области спланхнической мезодермы; лишь позже оно перемещается в область груди. Презумптивные клетки сердца птиц и млекопитающих начинают мигрировать из боковых участков висцеральной мезодермы на уровне гензеновского узелка, когда зародыш достигнет возраста всего 6-7 сут. К этому времени зародыш еще относительно просто устроен, он состоит только из трех зародышевых листков. Клетки будущего сердца двигаются между эктодермой и энтодермой к середине зародыша. Когда же они достигают передней области зародыша, где находится кишка, их миграция прекращается. Два формирующих сердце зачатка независимо друг от друга претерпевают четко выраженную дифференцировку. У птиц и млекопитающих каждый из них превращается в трубку с двойными стенками: внутренней — эндокардом и наружной — эпимиокардом. Эндокард будет формировать внутреннюю выстилку сердца, а эпимиокард — мышцу сердца, которая в течение всей жизни организма будет служить насосом, перекачивающим кровь.

Пока зародыш проходит период нейруляции, выпячивание складки спланхнической мезодермы приводит к обособлению передней кишки. В результате две трубки сердца сближаются и, в конце концов, сливаются вместе, соединяя эпимиокард в одну трубку. Два эндокарда в течение короткого времени находятся в общей камере, но они также сольются. К этому времени исходно парные целомические камеры объединяются, образуя полость тела, в которой располагается сердце. Неслившиеся задние участки эндокарда становятся отверстиями желточных вен в сердце. Эти вены будут

нести питательные вещества из желточного мешка в венозный синус.

Пульсация сердца начинается еще во время слияния парных зачатков. Водителем ритма (пейсмейкером) сердечных сокращений является венозный синус. Здесь начинается сокращение, а затем волна сокращений распространяется по трубчатому сердцу. Таким образом, сердце начинает перекачивать кровь еще до того, как завершится образование сложной системы клапанов. Клетки сердечной мышцы обладают собственной внутренне присущей им способностью к сокращению: изолированные мышечные клетки 7-дневного зародыша крысы или куриного зародыша, помещенные в чашку Петри, продолжают сокращаться. У зародыша эти сокращения начинают регулироваться электрическими стимулами, поступающими из мозжечка.

Кардиомиогенез. Кардиомиогенез отличается от миогенеза скелетных мышц. На самых ранних стадиях развития зачатка сердца из спланхномезодермы все клетки последней быстро приобретают минимальный уровень дифференцировки, необходимый для начала первых сокращений сердца. Почти с самого начала в клетках присутствуют миофибриллы. Дифференцировка миоцитов заключается в увеличении числа и установлении ориентации миофибрилл, митохондрий, десмосом и щелевых контактов. Возрастает плотность взаимного расположения миоцитов. Появляются отличия предсердных миоцитов от желудочковых — развитие аппарата Гольджи, миофибриллы развиты слабее. Миоциты проводящей системы дифференцируются в направлении приобретения особых свойств их мембраной для обеспечения проведения импульсов. Существенным отличием кардиомиоцитов от скелетных мышц является относительная однородность уровня дифференцировки и отсутствие на всех стадиях резерва потенциальных миобластов. В то же время число эндотелиальных клеток и фибробластов возрастает в связи с прогрессирующей васкуляризацией сердца.

Формирование кровеносных сосудов. Потребности развивающегося зародыша отличаются от потребностей взрослого организма, и эти различия отражает его система кровообращения. Во-первых, пища поступает в зародыш не через кишечник, а либо из желтка, либо из плаценты. Во-вторых, процесс дыхания осуществляется не в жабрах или легких, а во внезародышевых оболочках — хорионе или аллантоисе. Таким образом, главные кровеносные сосуды зародыша формируются для обслуживания этих внезародышевых оболочек.

Конструкция кровеносных сосудов диктуется также эволюцией вида. У млекопитающих кровеносные сосуды зародыша будут распространяться по желточному мешку, даже если он не содержит желтка. Кроме того, сосуд, по которому кровь покидает сердце, образует над передней кишкой петли, входящие в спинную аорту. Эти шесть петель — артериальные дуги образуют арки над глоткой. У примитивных рыб эти дуги сохраняются и обеспечивают кровообращение в жабрах, где кровь насыщается кислородом. У взрослых птиц и млекопитающих, у которых этот процесс осуществляется в легких, такая система имеет мало смысла. И хотя у зародышей млекопитающих и птиц формируются все шесть пар артериальных дуг, затем система их упрощается, редуцируясь до единственной дуги.

Главными кровеносными сосудами зародыша являются сосуды, получающие питательные вещества и приносящие их к телу зародыша, а также сосуды, транспортирующие кислород к органам, в которых происходит газообмен, и уносящие от них диоксид углерода. У позвоночных с большим количеством желтка в яйце желточные вены формируются посредством агрегации мезенхимных клеток в ангиогенных скоплениях (кровяных островках), расположенных в стенке желточного мешка. Вскоре тяжи мезенхимных клеток изгибаются, образуя двустенные трубки, подобные двойной трубке сердца. Клетки внутренней стенки становятся плоскими

эндотелиальными клетками, выстилающими сосуды, а клетки наружной — гладкомышечными клетками. Между слоями эндотелиальных и гладкомышечных клеток располагается базальная мембрана, содержащая коллаген, специфичный для кровеносных сосудов. Центральные клетки кровяных островков дифференцируются в зародышевые клетки крови. Кровяные островки по мере их роста сливаются и образуют сеть капилляров, впадающих в две желточные вены, приносящие питательные вещества и клетки крови к формирующемуся сердцу.

Зародыши млекопитающих получают пищу и кислород из плаценты. Таким образом, хотя зародыш млекопитающих имеет сосуды, аналогичные желточным венам, пища и кислород поступают в него преимущественно через пупочную вену, которая соединяет зародыш с плацентой, а пупочная артерия несет кровь с конечными продуктами обмена в плаценту. Однако, когда плод уже не получает кислорода от матери, как перестраивается его кровообращение, для того чтобы он смог получить кислород из своих легких? Во время развития плода отверстие (артериальный проток) направляет ток крови из легочной артерии в аорту (и, следовательно, в плаценту). Поскольку кровь из легочной вены не возвращается в плод, развивающийся плод млекопитающих должен иметь какой-то иной способ получения крови, которую следует перекачать в левый желудочек. Это осуществляется с помощью овального отверстия в перегородке, разделяющей левое и правое предсердия. Кровь может поступить в правое предсердие, пройти через овальное отверстие в левое предсердие, а затем перейти в левый желудочек. После первого вдоха новорожденного кислород в крови вызывает сокращение мышц, которые окружают артериальный проток; в результате это отверстие закрывается. Как только возрастает давление крови в левой половине сердца, оно заставляет захлопнуться створку над овальным отверстием, и тем самым происходит разделение двух потоков крови: легочного и общего. Так, когда начинается дыхание, осуществляется

переключение потока крови с плаценты на легкие.

Миогенез гладкомышечной ткани (лейомиогенез). Источником гладкомышечной ткани является мезенхима (спланхомезодерма). В местах закладки гладкой мускулатуры клетки мезенхимы дифференцируются в миобласты, а затем в зрелые гладкомышечные клетки (ГМК), приобретающие вытянутую форму. Довольно скоро в них образуются микрофиламенты. ГМК вклиниваются между соседними клетками и образуют мышечные пучки, в свою очередь формирующие слои гладкой мускулатуры.

ГМК в составе гладких мышц формируют мышечную стенку полых и трубчатых органов, контролируя их моторику и величину просвета. Висцеральные ГМК (в пищеварительной, дыхательной и выделительной системах) развиваются из мезенхимальной спланхоплевры, ГМК кровеносных сосудов — из мезенхимы кровяных островков (в ангиогенных скоплениях), ГМК радужной оболочки имеют нейроэктодермальное происхождение. В ГМК отсутствует поперечная исчерченность, так как миофиламенты (актиновые и миозиновые нити) не образуют миофибрилл.

Развитие клеток крови. У взрослых особей большинства млекопитающих главным источником клеток крови является костный мозг. Однако результаты многочисленных опытов показывают, что кроветворные стволовые клетки не образуются ни в костном мозге, ни в селезенке. В настоящее время считается, что исходная полипотентная стволовая клетка образуется в пределах желточного мешка и мигрирует из него сначала в печень, а затем в кроветворные органы взрослой особи.

Начальные этапы кроветворения (до 12-ой недели развития эмбриона человека) происходят в желточном мешке. В течение 3-ей недели развития во внезародышевой мезодерме формируются скопления мезенхимных клеток — кровяные островки. Клетки по периферии каждого островка формируют эндотелий первичных кровеносных сосудов, клетки центральной части островка образуют

первичные эритробласты (содержат ядро и эмбриональный гемоглобин). В течение 2-го месяца стволовые клетки крови заселяют печень, селезенку, тимус, и в этих органах образуются разные типы клеток. Так, в печени на 5-6 неделе развития формируются гранулоциты, тромбоциты, дефинитивные эритробласты и эритроциты. Эти процессы уменьшаются к концу 5-го месяца развития и сохраняются еще несколько недель после рождения. В селезенке с 4 по 8 месяц образуются те же группы клеток. Перед рождением в ней начинают формироваться лимфоциты. В тимусе образуются лимфоциты (главным образом, различные Т-клетки). Костномозговое кроветворение начинается в течение 5-го месяца развития. Образуются все типы клеток, но кроветворение также продолжается дополнительно и в других лимфоидных органах (тимусе, лимфатических узлах, селезенке). Кроветворные стволовые клетки млекопитающих мигрируют в костный мозг, где сохраняются в течение всей жизни животного. У млекопитающих и птиц имеется, по-видимому, общая полипотентная кроветворная клетка, которая может дать начало эритроцитам, гранулоцитам, макрофагам, тромбоцитам и иммунокомпетентным клеткам — лимфоцитам.

1.2.7. Раннее развитие позвоночных: производные энтодермы

Из энтодермы развиваются органы пищеварения и связанные с ними железы, а также органы дыхания.

По мере того как концы энтодермы загибаются в вентральном направлении и перемещаются к центру зародыша, формируются передняя кишка и задняя кишка, представляющие собой части будущей пищеварительной трубки. На месте будущего ротового отверстия образуется эктодермальное углубление — стомодеум, которое потом приходит в контакт со стенкой передней кишки. Область их объединения называется ротовой пластинкой. Эта пластинка позднее (у эмбриона человека в возрасте около 22 суток) разрывается, а стомодеум превращается в ротовую полость.

Эктодермальный эпителий крыши ротовой полости образует выступ (карман Ратке), который растет навстречу нейральному выросту дна зачатка промежуточного мозга — воронке, или инфундибулюму. Эти два эктодермальных зачатка взаимодействуют друг с другом и вместе образуют гипофиз. Из кармана Ратке развивается железистая часть гипофиза, а из воронки — его нервная часть. Таким образом, гипофиз имеет двойное происхождение, и эта двойственная природа гипофиза отражается на его функции во взрослом организме.

Энтодермальная часть пищеварительной трубки начинается в глотке. Здесь у зародыша млекопитающих образуются четыре глоточных кармана. Борозды между этими карманами иногда называют жаберными щелями, потому что они напоминают такие же структуры у зародышей рыб. Однако вместо того, чтобы дать начало жабрам, развитие глоточных карманов у млекопитающих изменилось в соответствии с наземной средой обитания. 1-ая пара глоточных карманов преобразуется в слуховые полости среднего уха и связанные с ними евстахиевы трубы. Из 2-ой пары карманов развиваются стенки миндалин. Тимус образуется из 3-ей пары глоточных карманов. На более поздних стадиях развития эта железа будет обеспечивать дифференцировку лимфоцитов. Из этой же пары глоточных карманов происходит одна пара паращитовидных желез, а вторая их пара возникает из 4-ой пары глоточных карманов. В дополнение к этим парным карманам между глоточными карманами 2-ой пары на дне глотки формируется маленький центрально расположенный вырост (дивертикул). Он отпочковывается от глотки и мигрирует в область шеи, где дифференцируется в щитовидную железу.

Пищеварительная трубка и ее производные. Позади глотки пищеварительная трубка сужается, переходя в пищевод, за которым следуют желудок, тонкий кишечник и толстый кишечник. Энтодермальные клетки образуют только выстилку пищеварительной

трубки и ее желез, тогда как мезодермальные мезенхимные клетки, которые окружают эту трубку, дифференцируются в мышцы, обеспечивающие перистальтику. Желудок развивается подобно глотке, как расширенный участок трубки. Каудальнее формируется кишечник, и связь между ним и желточным мешком, в конечном счете, прерывается. На каудальном конце кишечника возникает углубление, в котором энтодерма встречается с лежащим над ней покровным эпителием. Тонкая клоакальная мембрана разделяет эти две ткани. Впоследствии она разрывается, и образуется отверстие, которое станет анальным.

Каудальнее желудка образуются еще три органа — печень, поджелудочная железа и желчный пузырь. Печеночный дивертикул представляет собой энтодермальную трубку, которая простирается от передней кишки в окружающую мезенхиму. Мезенхима индуцирует энтодерму, которая в ответ на ее воздействие пролиферирует, ветвится и формирует железистый эпителий печени. Часть печеночного дивертикула продолжает функционировать как дренажный проток печени, а из ответвления от этого протока образуется желчный пузырь. Поджелудочная железа развивается в результате слияния четко выраженных дорсального и вентрального дивертикулов. У взрослого человека сохраняется только вентральный проток, несущий пищеварительные ферменты в кишечник.

Дыхательная трубка. Легкие также являются производными пищеварительной трубки, хотя они совсем не участвуют в пищеварении. В центре задней области глотки между четвертой парой глоточных карманов появляется ларинготрахеальная борозда. Эта борозда затем раздваивается на две главные ветви, которые образуют легкие. Ларинготрахеальная энтодерма становится выстилкой трахеи, двух бронхов и воздушных мешков (альвеол) легких. Как мы увидим в одной из последующих глав, ветвление этой энтодермальной трубки зависит от взаимодействий между разными типами мезодермальных клеток на ее пути.

Легкие являются эволюционным новшеством, и они последними из органов млекопитающих завершают свою дифференцировку. Легкие должны быть способны к поглощению кислорода с первым вдохом ребенка. Чтобы это осуществить, альвеолярные клетки секретируют в жидкость, омывающую легкие, поверхностноактивное вещество — сурфактант. Этот сурфактант, состоящий из фосфолипидов, таких, как сфингомиелин и лецитин, секретируется на поздних стадиях беременности, и необходимый физиологически полезный уровень их содержания достигается у человека обычно на 34-й неделе беременности. Эти вещества дают альвеолярным клеткам возможность соприкасаться не слипаясь. Дети, родившиеся преждевременно, часто испытывают затруднения в дыхании, и их приходится держать в респираторных камерах (где длительное время поддерживается искусственное дыхание) до тех пор, пока не созревают клетки, секретирующие сурфактант.

1.3. ДЕТЕРМИНАЦИЯ СУДЬБЫ КЛЕТОК И ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА

Каждый многоклеточный организм представляет собой сложный набор специализированных клеточных типов. Процесс развития специализированных клеточных типов из одного оплодотворенного яйца называется **дифференцировкой**. Дифференцировке предшествует процесс, называемый детерминацией, в течение которого определяется судьба клеток.

Детерминация — процесс возникновения качественных различий между частями развивающегося организма на стадиях, предшествующих появлению морфологически различимых закладок органов и тканей. Детерминация может осуществляться двумя разными способами. Первый (автономная детерминация) заключается в цитоплазматической сегрегации детерминирующих молекул в период дробления, в результате чего качественно различные области

цитоплазмы зиготы попадают в разные дочерние клетки. Вторым способом детерминации (зависимая, или эмбриональная индукция) заключается во взаимодействии клеток или тканей, определяющем судьбу одного или обоих участников этого взаимодействия. Как будет показано ниже, в развитии любого организма в разной степени участвуют оба механизма.

1.3.1. Автономная детерминация, мозаичный тип развития

Хорошим объектом для изучения нарушений на ранних стадиях развития оказались зародыши оболочников (асцидий). У некоторых видов оболочников цитоплазма яйца сразу после его оплодотворения сегрегируется на ряд по-разному окрашенных областей. Отделяя скальпелем определенные бластомеры у дробящегося зародыша, исследователи обнаружили, что каждый бластомер ответствен за образование специфического набора тканей личинки. Если удалить какие-либо бластомеры, то у личинки будут отсутствовать как раз те структуры, которые в норме из них формируются. Проследив судьбу каждого бластомера асцидии, исследователи пришли к поразительному заключению, что каждая окрашенная область имеет свою особую судьбу. Желтый серп цитоплазмы дает начало мышечным клеткам, из серого экваториального серпа образуются хорда и нервная трубка; прозрачная анимальная цитоплазма становится эпидермисом личинки; из содержащей желток серой вегетативной области яйца возникает кишка личинки. Также было обнаружено, что если изолировать определенные группы клеток зародыша, то из них формируются характерные структуры без связи с другими клетками. Следовательно, каждая из клеток у оболочников развивается, по-видимому, автономно.

Такой способ развития называют мозаичным, потому что зародыш представляет собой как бы мозаику самодифференцирующихся частей (мозаичный тип развития). Т. е. считается, что, по мере того, как зародыш делится, в различные клетки включаются разные участки цитоплазмы. Эти разные участки

содержат морфогенетические детерминанты, контролирующие детерминацию данной клетки к образованию клеток определенного типа. Мозаичный тип развития широко распространен в животном царстве, особенно у таких организмов, как гребневики, кольчатые и круглые черви и моллюски.

Однако развитие нейральных структур у оболочников является исключением. Клетки, образующие нервную систему, происходят из двух передних квадрантов — анимального и вегетативного, но ни один из них по отдельности не дает начало нервным клеткам. Если эти передние пары вновь соединяют вместе, то возникают ткани мозга и пальпы (прикрепительные сосочки). Другими словами, даже в таком строго детерминированном зародыше, как зародыш оболочников, осуществляются некоторые индукционные взаимодействия между бластомерами.

1.3.2. Зависимая детерминация: регуляционный тип развития

Мы узнали, что детерминацию обуславливает распределение специфических цитоплазматических веществ между бластомерами в период дробления, однако действием цитоплазматических детерминантов невозможно объяснить все детерминационные события в эмбриогенезе. В некоторых случаях для формирования определенного типа ткани необходимо взаимодействие между двумя бластомерами. Такой способ детерминации имеет чрезвычайно важное значение, особенно для развития вторичноротых, таких, как морские ежи и позвоночные.

Опыты Г. Дриша. Впервые эксперименты, в которых было показано развитие другого типа, были проделаны Хансом Дришем (1892). Он отделял друг от друга бластомеры морского ежа энергичным встряхиванием. К удивлению Дриша, каждый из бластомеров двухклеточного зародыша развивался в полную личинку. Точно также, если Дриш разделял бластомеры 4- и 8-клеточных зародышей, то некоторые из клеток образовывали целые личинки,

называемые плутеусами. Этот результат поразительно отличался от того, что было показано ранее. Вместо самодифференцировки в будущую часть зародыша каждый бластомер мог регулировать свое развитие и давать начало целому организму. Это явление было названо регуляционным развитием.

Аллофенные мыши. Другими экспериментаторами было показано, что изолированные бластомеры лягушки ведут себя точно так же, как и бластомеры морского ежа. Ранние бластомеры млекопитающих также обладают регуляционным типом развития. Каждый изолированный бластомер внутренней клеточной массы у мыши способен генерировать целую фертильную мышь. Ярким примером регуляционного развития являются опыты по созданию аллофенных мышей. Если ранних 8-клеточных зародышей генетически различных линий мышей (в данном случае линий с различной окраской шерсти) извлечь из яйцеводов и привести в контакт, предварительно удалив прозрачную оболочку, то клетки способны образовать одну химерную бластоцисту, которую можно имплантировать в матку самки-реципиента и получить потомство. Было показано, что три 4-клеточных зародыша могут слиться и образовать общую компактную морулу. Из такой морулы может развиться мышь, покровы которой имеют участки, окрашенные в цвета трех разных линий.

Организатор. Однако наиболее эффектные опыты по трансплантации были проведены Хансом Шпеманом и Гильдой Мангольд в 1924 г. Эти исследования перевернули представления современных эмбриологов и были оценены Нобелевской премией. Они показали, что единственной самодифференцирующейся областью на стадии ранней гаструлы является область спинной губы бластопора и что она действительно инициирует гаструляцию и эмбриогенез в окружающей ткани. В этих опытах Шпеман и Мангольд использовали зародышей двух по-разному пигментированных видов тритона: сильно

пигментированного обыкновенного тритона и непигментированного (светлого) гребенчатого тритона. Спинную губу бластопора (материал дорсальной краевой зоны), взятую от зародышей гребенчатого тритона на стадии ранней гаструлы, пересаживали зародышу обыкновенного тритона, находящемуся на той же стадии, в область, предназначенную стать брюшным эпидермисом. В отличие от других тканей гаструлы, которые развивались согласно своему новому положению, губа бластопора донора не стала брюшным эпидермисом. Она инвагинировала, как делала бы это на своем обычном месте (обнаруживая тем самым свою детерминированность), и исчезала под клетками вегетативного полушария. Светлоокрашенные ткани донора затем продолжали дифференцироваться в хордомезодерму и другие мезодермальные структуры, образование которых соответствовало собственной судьбе материала спинной губы бластопора. После того как сформировались эти вторичные осевые структуры, клетки хозяина начали также принимать участие в образовании нового зародыша, давая начало органам, которыми они никогда не должны были стать. Например, сомиты содержали как бесцветную (донорскую), так и пигментированную (хозяйскую) ткань. Но наиболее поразительным оказалось то, что хордомезодерма была способна, взаимодействуя с лежащими над ней эктодермальными клетками, индуцировать образование всей нервной пластинки. В некоторых случаях «лицом к лицу» с зародышем-хозяином формировался вторичный зародыш.

Индукция. Процесс, посредством которого одна область зародыша, взаимодействуя с другой, побуждает эту область развиваться в направлении ином, чем она развивалась бы без этого воздействия, называют *индукцией*. В эмбриогенезе происходят самые разнообразные многочисленные индукционные взаимодействия, но ключевое взаимодействие, в котором дорсальная мезодерма индуцирует эктодерму к дифференцировке в нейральные структуры, получило название первичной эмбриональной индукции. Этот классический термин стал источником путаницы, поскольку

индукция нервной трубки хордой больше не считается первым индукционным влиянием у зародыша. Как было показано в опытах Шпемана, единственной самодифференцирующейся областью зародыша на стадии ранней гаструлы является область спинной губы бластопора и что она инициирует гаструляцию и эмбриогенез в окружающей ткани. Если эту область пересаживали другому такому же зародышу в область, которая должна стать брюшным эпидермисом, в результате формировался вторичный зародыш, соединенный с зародышем-хозяином. Область спинной губы бластопора Шпеман назвал организатором. Теперь известно (главным образом благодаря Шпеману и его ученикам), что взаимодействия между хордомезодермой и эктодермой недостаточно, чтобы «организовать» целого зародыша. Точнее, это взаимодействие инициирует серию индукционных процессов. Мы также знаем теперь, что спинная губа бластопора сходным образом «организует» вторичного зародыша у ланцетника, круглоротых и различных видов амфибий. Передняя часть первичной полосы (т. е. гензеновский узелок — область, в которой начинается гаструляция у птиц и млекопитающих) действует сходным образом, инициируя образование вторичных зародышей у этих классов позвоночных.

Каждая система эмбриональной индукции состоит, по меньшей мере, из трех компонентов: из ткани, способной синтезировать индуцирующие стимулы — индуктора, ткани, способной воспринимать эти стимулы и реагировать на них — компетентной ткани и взаимодействия индуктора и компетентной ткани.

Индуктор (более старое название — организатор) — тканевая закладка, воздействующая на компетентную ткань. Характеризуется рядом особенностей: образованием индуцирующих агентов, созреванием способности к индукции, автономностью созревания. Эффект эмбриональной индукции обусловлен индуцирующими агентами. В исследованиях лабораторий Х. Тидемана, С. Тойвонена, Т. Ямады было показано, что это низкомолекулярные белки, которые

выделяются индуцирующей тканью и воспринимаются компетентной тканью, вызывая формообразовательный эффект. Предполагалось существование двух индуцирующих агентов — нейрализующего и мезодермализующего, от соотношения которых зависит региональная специфичность индуцирующего эффекта.

Двухградиентная гипотеза эмбриональной индукции. (Саксен, Тойвонен, 1961). Согласно этой гипотезе, в развивающемся яйце существует два типа эмбриональных индукторов — мезодермальный и нейральный. Первый индуцирует нейральные структуры, второй — мезодермальные производные. Региональная специфичность зависит от количественного соотношения концентраций этих индуцирующих агентов в соответствующей области зародыша. Нейральный агент в чистом виде должен индуцировать только переднеголовые структуры, добавление мезодермального агента ведет к сдвигу индукции в сторону заднеголовных структур, мезодермальных производных в зависимости от количества мезодермального агента.

В действительности механизм влияния индуцирующих агентов более сложен. Они образуются еще в период оогенеза и распределяются по объему развивающегося яйца неравномерно, формируя градиенты распределения, важные для нормального процесса эмбрионального развития. Х. Тидеман обнаружил, что индуктор находится в связанном с белком-ингибитором инактивированном состоянии, так что акт индукции сопровождается высвобождением индуктора из этой связи. Таким образом, поступающие в компетентную ткань молекулы индуктора являются как бы триггерным сигналом к началу цепной реакции — удалению ингибитора и высвобождению собственных белков-индукторов.

Регионализация — постепенном приобретении каждой частью индуцирующей ткани способности индуцировать определенный набор структур.

Вторичная индукция. Итак, эктодермальный эпителий поздней нейрулы более не компетентен реагировать на воздействие

хордомезодермы, однако он становится компетентным к реакции на новые индукторы. Например, на контакт с глазным пузырем он отвечает образованием хрусталика.

Будет полезно рассмотреть здесь одну из схем этих вторичных индукций. Формирование хрусталика, как уже упоминалось, начинается, когда выпячивание переднего мозга (глазной пузырь) на стадиях от средней до поздней нейрулы вступает в контакт с лежащим над ним эпителием. В результате такого контакта передняя стенка глазного пузыря инвагинирует, образуя двуслойную нейральную структуру — глазную чашу. Глазной пузырь ответствен за индукцию хрусталиковой плагоды в лежащем над ним эпителии. Глазная чаша дифференцируется на пигментную и нейральную части сетчатки (ретины). Хрусталиковый пузырек представляет собой и индуцирующую, и реагирующую ткань. Он индуцирует в новом лежащем над ним эпителии образование роговицы, и вместе с тем он отвечает на индуцирующие стимулы нейральной сетчатки, дифференцируясь в дефинитивный хрусталик.

Среди наиболее хорошо изученных случаев вторичной индукции основное место занимают взаимодействия эпителиальных слоев с прилежащими мезенхимными клетками. Они называются *эпителиально-мезенхимными взаимодействиями*. Эпителий может происходить из любого зародышевого листка, тогда как мезенхима обычно происходит от рыхлой мезодермальной ткани. На примере индукций такого типа были продемонстрированы такие характеристики индукции как региональная и генетическая специфичность. При совмещении клеток различных участков дермы с эпидермисом у цыпленка формирование структур происходило в соответствии с первоначальным положением мезодермы. Таким образом, мезодермальные факторы включают разные наборы генов отвечающих клеток. Но и отвечающая эктодерма может подчиниться этой информации лишь постольку, поскольку позволяет ее геном. Например, при комбинировании кожи цыпленка и мыши —

(презюмтивная эктодерма роговицы цыпленка и мышьяная кожная мезодерма) — появляются участки зачатков перьев, т. е. формируются покровные структуры птиц, несмотря на видовые барьеры. Следовательно, органоспецифичность контролируется мезодермой, видовая специфичность — эпителием.

Таким образом, и при первичных, и при вторичных индукциях происходит прогрессивное ограничение потенций эктодермальных клеток. При первичных индукционных взаимодействиях изменения происходят в период гаструляции; при вторичных индукционных взаимодействиях детерминация наступает позже. И в этих случаях мы снова видим, что детерминация зависит от взаимодействия между группами клеток.

Молекулярная природа индукторов. К первому морфогенетическому взаимодействию в ходе развития амфибий относят (открытое Ньюкопом) взаимодействие между анимальной и вегетативной частями зародыша на стадии морулы. К этому моменту (64-клеточный зародыш) клетки вегетативного полюса способны оказывать выраженное мезодермализующее влияние на анимальную половину зародыша. В результате этого воздействия в экваториальной зоне зародыша возникает зачаток мезодермы, а остальные клетки анимальной половины детерминируются в эктодермальном направлении. Разные зоны вегетативного полюса индуцируют в эктодерме мезодермальные территории (дорсальную, вентральную) с различной судьбой. Источником последующих индукционных влияний является зачаток мезодермы. В процессе развития он разделяется на две зоны — дорсальную и вентральную. В период гаструляции-нейруляции различные участки мезодермы приходят в контакт с другими тканями зародыша и оказывают на них индуцирующее влияние. В результате к концу нейруляции в пределах каждого из трех зародышевых листков (эктодерма, мезодерма, энтодерма) имеются определенные компартменты, содержащие клетки-предшественники соответствующих линий дифференцировки.

Следовательно, к этому моменту развития дефинитивный план тела уже достигнут и стабилизирован. Отсюда можно сделать вывод, что морфогены, ответственные за «построение» данного плана, действуют главным образом на стадии бластулы-нейрулы.

Мезодермальная индукция. Предполагается, что в индукции мезодермы участвуют три фактора (или три комплекса факторов). Два фактора (исходящие из дорсальных вегетативных клеток и из вентральных вегетативных клеток) индуцируют формирование кольца мезодермы, содержащего область организатора. Организатор затем синтезирует третий фактор, регионально индуцирующий специфические мезодермальные структуры (такие, как хорда и сомиты, лежащие на дорсальной стороне, и клетки крови, локализирующиеся на периферии).

Результаты исследований показывают, что многие факторы являются идентичными или очень сходными с факторами роста, которые известны как регуляторы пролиферации клеток у млекопитающих.

1) Факторы, исходящие из дорсальных вегетативных клеток.

Vg 1 – член суперсемейства ТФР- β (трансформирующий фактор роста), локализован в вегетативной области ооцитов и эмбрионов Ксенопуса на стадии дробления. Индуцирует дорсальную мезодерму (хорда, осевая мускулатура) и организует полную дорсальную ось.

2) Факторы, исходящие из вентральных вегетативных клеток.

Bone morphogenic protein (BMP-4) индуцирует вентральную мезодерму, (включая кровь), кроме того, экспрессия в анимальном полюсе модифицирует индукцию активинном, вызывая супрессию формирования переднедорсальных структур.

Фактор роста фибробластов (ФРФ) – это первый очищенный фактор, демонстрировавший способность индуцировать образование мезодермы в клетках анимального полюса. Транскрипты и белок для нескольких форм ФРФ экспрессируются по материнскому типу. ФРФ-белок индуцирует вентро-латеральную мезодерму, включая

мезенхиму и небольшое количество мышц (туловищная, задняя мезодерма, включая нотохорду и мышцы), но не способен индуцировать дорсальную мезодерму и дефинитивную вентральную ткань, кровь.

3) Факторы, исходящие из области организатора.

Wnt1 – семейство генов, родственных гену сегментарной полярности дрозофилы wingless. Может действовать как модификатор компетенции, изменяя ответ клетки на воздействие индуктора и усиливая формирование дорсальных мезодермальных структур. Его активность на стадии гаструлы определяется в вентральной мезодерме. В связи с этим предполагается, что его продукт способствует трансформации дорсальной ткани в вентральную. У мыши экспрессируется в первичной полоске.

Noggin – экспрессируется в ооцитах и эмбрионах Ксенопуса. Его транскрипты локализуются в дорсальной губе бластопора (область Организатора) и позднее – в нотохорде. Сам он не индуцирует мезодерму, но помогает формированию дорсальной мезодермы. Его относят к дорсализующим модификаторам мезодермального паттерна.

Мезодермальная индукция включает следующие компоненты:

- индукторы мезодермы - Vg 1 Активин ФРФ,
- модификаторы мезодермального паттерна - Wnt1 Noggin
- ингибиторы - BMP-4.

Нейральная индукция. ЦНС позвоночных возникает в процессе гаструляции в результате взаимодействия дорсальной эктодермы и подстилающей ее дорсальной мезодермы (показано в опытах Шпемана и Мангольд по трансплантации ткани организатора). Предполагалось, что при этом функционируют два рода сигналов: 1) хордомезодерма (презумптивная нотохорда) посылает вертикальный сигнал вышележащей эктодерме и 2) мезодермальные организующие (эктодерму) сигналы распространяются горизонтально внутри эктодермы.

Хордомезодерма (презумптивная нотохорда) посылает вертикальный сигнал вышележащей эктодерме. В настоящее время лучшим кандидатом на эту роль у позвоночных является гомолог гена *Hedgehog*.

Hedgehog выполняет у дрозофилы функции гена сегментарной полярности и синтезирует секретируемый фактор, контролирующий паттерн распределения клеток в ходе сегментации и развития имажинальных дисков. Его гомолог у позвоночных был изолирован и изучен. Оказалось, что его экспрессия происходит в нескольких тканях, оказывая регулирующее влияние на формирование клеточного паттерна в нотохорде, основании нервной трубки (вентральная область) и почках задних конечностей.

Был выявлен целый ряд секретируемых факторов, способных индуцировать паттерн нервной ткани (2-ой тип сигналов).

Noggin — основной нейроиндуцирующий фактор. Мы уже знаем о его способности дорсализовать мезодерму. Транскрипты выявляются в ткани организатора на стадии гастрюлы и на более поздних стадиях в нотохорде, вызывая в обоих случаях нейроиндуцирующий эффект. Предполагается, что ноггин является начальным передним индуктором, он непосредственно индуцирует передние нейральные структуры, являясь, возможно, независимым индуктором переднеголовных структур.

Notch — кодирует трансмембранный белок, участвующий в определении судьбы клеток нейроэктодермы, выборе ими нейрального или эпидермального пути развития (выявлен у дрозофилы). Его гомолог — *Xotch*, обнаруженный у Ксенопуса, локализуется в дорсальной эктодерме нейрулы и в области презумптивной нервной пластинки, и ненейральной эктодермы. Мутация по этому гену вызывала гипертрофию нервной трубки и отсутствие передних эктодермальных структур. Эктодермальная ткань была способна отвечать на действие нейрального индуктора и утратила способность дифференцироваться в эпидермальном

направлении. Это значит, что этот ген действует как фактор, регулирующий пропорцию клеток, способных отвечать на воздействие нейрального индуктора.

Wnt — функционирует как регулятор клеточной пролиферации и обуславливает развитие определенных паттернов в ЦНС. У нормальных мышей ген *Wnt1* экспрессируется в области среднего и заднего мозга. В случае его мутации наблюдается утрата среднего мозга и мозжечка. Гиперэкспрессия этого гена приводит к увеличению клеточной пролиферации и вызывает сильные расстройства в морфогенезе нервной трубки.

Dorsalin — член семейства ТФР- β . Транскрипты этого гена впервые выявляются при замыкании нервной пластинки в трубку и далее обнаруживаются только в нервной трубке. *Dorsalin1* индуцирует дифференцировку производных нервного гребня (дорсальная ткань) и в то же время тормозит дифференцировку мотонейронов (вентро-латеральная ткань).

Клеточная дифференцировка вдоль дорсо-вентральной оси контролируется соотношением локальной концентрации двух диффундирующих сигналов — один из них продуцируется нервной трубкой (*Dorsalin*), второй — лежащей под ней нотохордой. При этом первоначально вся нервная трубка компетентна к экспрессии гена *Dorsalin1*, но эта способность впоследствии ограничивается дорсальной третью нервной трубки. Ингибирование происходит из области хорды, что одновременно индуцирует дифференцировку мотонейронов.

Следовательно, подобно мезодермальной индукции, нейральная индукция включает:

- индукторы нервной ткани *Noggin*;
- модификаторы нейрального паттерна *Wnt* *Xotch*, *Dorsalin*, *Hedgehog*;
- ингибиторы BMP-4.

Трансдетерминация. Клетки, занявшие определенное

положение в системе развивающегося зародыша, получают некую, как принято говорить, *позиционную информацию*. Как выяснилось в последнее время, это есть не что иное, как соотношение различных белковых продуктов, неравномерно распределенных вдоль развивающегося зародыша и как бы «обозначавших судьбу» соответствующих его частей. Специфические градиенты распределения этих продуктов активируют в разных клетках различные наборы генов, так что эти клетки под влиянием поступающих в них сигналов приступают к «выполнению программы» детерминации и дифференцировки.

Детерминация — возникновение качественных различий между частями развивающегося организма на стадиях, предшествующих появлению морфологически различных закладок органов и тканей. Внешним выражением детерминации является тканевая и клеточная дифференцировка, которая проявляется в синтезе специфических РНК, белков, формировании морфологических признаков специализации клеток. Обычно клетки детерминированы к определенному типу дифференцировки. Однако это бывает не всегда.

Трансдетерминация — изменение детерминации клетки, которая еще не имеет признаков дифференцировки.

Дифференцировка. Дифференцировка клетки является реализацией той программы, которая была намечена в ходе детерминации.

1. *Преддифференцировка.* Перекрывается с последней стадией детерминации. В этот период клетка еще сохраняет способность к митотическому делению, специфических синтезов не обнаруживается, но зато активно строится неспецифическая система синтезов белков — эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, митохондрии.

2. *Протодифференцировка.* Способности клетки к делению ограничиваются, в ней обнаруживаются следовые количества

специфического продукта. Т. е. эта фаза знаменует начало специфических синтезов, химически характеризующих принадлежность данной клетки к определенному типу.

3. *Собственно дифференцировка.* Полностью утрачивается способность к пролиферации и резко возрастает концентрация специфического продукта. Завершается весь процесс.

4. *Терминальная дифференцировка.* Характеризуется выходом на пик синтеза специфического продукта и «обретением» всех признаков, свойственных фенотипу данной клетки.

Трансдифференцировка. *Трансдифференцировкой* называют превращение одного типа дифференцированных клеток в другой.

Длительное время это явление рассматривалось как уникальное явление, свойственное только низшим позвоночным животным. Наиболее известными моделями трансдифференцировки являются — регенерация хрусталика из дифференцированных клеток радужки и регенерация сетчатки из дифференцированных клеток пигментного эпителия у тритонов. В последние годы появились данные о трансдифференцировке клеток поджелудочной железы в клетки печени, клеток цилиарных складок и пигментного эпителия глаза млекопитающих в клетки сетчатки и др.

Эксперименты по регенерации глаза у тритонов. Удаление сетчатки у тритона стимулирует ее регенерацию из пигментного эпителия, а новый хрусталик может сформироваться из клеток дорсальной радужки. Оказывается, после удаления хрусталика происходит ряд событий, в результате которых радужка образует новый хрусталик:

1. Меняется форма ядер клеток радужки.
2. В клетках дорсальной части радужки образуется огромное количество рибосом.
3. ДНК этих клеток реплицируется, и вскоре клетки начинают делиться.
4. Происходит дедифференцировка этих клеток. Они

выбрасывают меланосомы (продукты дифференцировки, придающие глазу его характерный цвет), которые перевариваются макрофагами, проникающими в рану.

5. Клетки дорсальной части радужки продолжают делиться, формируя дедифференцированную ткань в области удаленного хрусталика.

6. В дедифференцированных клетках радужки начинается синтез специфических для клеток хрусталика продуктов белков кристаллинов. Эти белки синтезируются в такой же последовательности, как и при развитии нормального хрусталика.

7. Как только сформировался новый хрусталик, деления клеток дорсальной части радужки прекращаются.

Перечисленные события нельзя считать нормальным путем образования хрусталика. Вспомним, что в эмбриогенезе хрусталик образуется из слоя эпителиальных клеток, индуцированных клетками передней стенки глазного пузыря.

1.4. ФОРМИРОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Формирование пространственной организации — это результат функциональной активности эмбриональных клеток, посредством которой осуществляется упорядоченное расположение дифференцированных тканей. Формирование пространственной организации включает реализацию выбора одного из возможных путей развития. Каким образом происходит так, что клетка, потенциально способная стать хрящевой или мышечной, становится мышечной, если располагается в одном месте, и хрящевой, если оказывается в другом?

1.4.1. Градиентные модели позиционной информации

Каким образом клетки получают информацию относительно своего положения в зародыше и как они используют эту информацию для дифференцировки в соответствующий клеточный тип? Чтобы

объяснить это, были предложены различные гипотезы. В основе одной из них лежит представление о градиентах морфогенетических веществ (Бовери, 1901; Чайлд, 1941; Волперт, 1971). Предполагается, что растворимое вещество (морфоген) диффундирует от «источника» (где оно продуцируется) к «стоку» (где оно разрушается), образуя в области диффузии постепенный спад концентрации. Согласно теоретическим расчетам, такие градиенты могут проявлять свое действие на относительно небольших расстояниях (менее 100 клеточных диаметров).

Волперт иллюстрировал возможное действие отдельного градиента, представив плоскую ткань в виде *французского флага*. Предположим, что источник морфогена располагается на левой границе синей полосы, а на другом конце флага на правой границе красной полосы — находится место выведения морфогена. Таким образом, перед нами — градиент концентрации, причем на одном конце флага / ткани концентрация самая высокая, а на другом — самая низкая. Все клетки полипотентны, т. е. каждая может стать либо синей, либо белой, либо красной, и эта спецификация коррелирована с концентрацией морфогена. Клетки, получившие наибольшее количество морфогена, становятся синими. Однако существует порог концентрации морфогена, ниже которого клетки становятся белыми. При падении концентрации ниже следующего порога клетки становятся красными.

Саксеном и Тойвоненом была предложена *двухградиентная гипотеза эмбриональной индукции* (1961). Согласно этой гипотезе, в развивающемся яйце существуют два типа эмбриональных индукторов — мезодермальный и нейральный. Первый индуцирует нейральные структуры, второй — мезодермальные. Региональная специфичность зависит от количественного соотношения концентраций этих индукторов в соответствующей области зародыша.

Как мы увидим, в действительности механизм индукции более

сложен. Индукторы (морфогены) образуются еще в период оогенеза и распределяются по объему яйца неравномерно, формируя градиенты распределения, важные для нормального процесса эмбрионального развития. Кроме того, индуктор обычно находится в связанном с белком-ингибитором инактивированном состоянии, так что акт индукции сопровождается высвобождением индуктора из этой связи.

Клетки, занявшие определенное положение в развивающемся зародыше, получают некую, как принято говорить, **позиционную информацию**. Как выяснилось в последнее время, позиционная информация есть не что иное, как соотношение различных белковых молекул (морфогенов, индукторов), неравномерно распределенных вдоль развивающегося зародыша и обозначающих судьбу соответствующих его частей. Специфические градиенты распределения этих продуктов активируют в разных клетках различные наборы генов, вследствие чего эти клетки под влиянием поступающих в них сигналов приступают к выполнению программы детерминации и дифференцировки.

1.4.2. Генетика формирования пространственной организации у дрозофилы

Из всех эукариот генетика именно дрозофилы была изучена наиболее полно. Анализ путей, посредством которых мутации оказывают влияние на пространственную организацию, стал ключом к пониманию механизмов морфогенеза.

Краткий обзор развития дрозофилы. В процессе дробления яйцеклетки половые клетки-предшественники (полярные клетки) выделяются очень рано, после того, как ядра, дающие начало зародышевому пути, попадают в область полярной плазмы. Каждая такая клетка претерпевает 4 деления, так что возникает 16 клеток, одна из которых будет половой. Она исходно имеет метку в цитоплазме в виде специфической области, названной спектросомой. Остальные клетки становятся питающими (трофическими,

трофоцитами) и соединены с яйцеклеткой цитоплазматическими мостиками, по которым в нее поступают различные вещества, принимающие участие в формировании градиентов. Из материнской мезодермы образуется около 1000 мелких фолликулярных клеток, окружающих дифференцирующийся ооцит с трофическими клетками.

В ранних зародышах дрозофилы происходят быстрые деления ядер, в результате чего формируется синцитиальная бластодерма. Во время 9-ого цикла 5 ядер мигрируют в цитоплазму заднего полюса яйца, окружаются мембраной и становятся полярными клетками. Остальные клетки располагаются на периферии яйца, где 4 раза делятся. После 13-го деления клеточные мембраны окружают каждое ядро, формируют клеточную бластодерму. С 14-го деления в ядрах бластодермы резко возрастает уровень транскрипционной активности. Клетки становятся подвижными и подвергаются гастрюляции.

Гастрюляция у дрозофилы. Около 1000 клеток вдоль вентральной срединной линии формируют вентральную борозду, края которой сходятся, и она замыкается в трубку. Эта трубка уплощается и образует под вентральной эктодермой мезодерму. Инвагинирующие массы клеток в начале и конце вентральной борозды дают начало энтодерме насекомого. Гастрюляционные перемещения клеток энтодермы увлекают за собой полярные клетки, и они попадают внутрь зародыша. В это время в передней части зародыша образуется головная (цефалическая) складка, а на дорсальной стороне передние и задние поперечные складки. Оставшиеся на поверхности зародыша клетки, мигрируя в тангентальном направлении, подтягиваются к вентральной срединной линии. Образовавшееся скопление клеток носит название зародышевой полосы. Эта полоска начинает перемещаться к заднему полюсу, огибает его и продолжает движение на дорсальной стороне в направлении переднего полюса. В результате презумптивные структуры задних отделов личинки на дорсальной стороне зародыша располагаются в непосредственной близости от

перспективных головных структур. На этой стадии развития у зародышей дрозофилы начинают формироваться сегменты, и происходит топографическое разделение эктодермального и мезодермального зародышевых листков. В результате следующие формируются сегменты: мандибулярный (нижнечелюстной), максиллярный (верхнечелюстной), лабиальный (нижнегубной), торакальные (грудные), абдоминальные (брюшные).

Общая схема формирования сегментарной полярности у дрозофилы. Яйцо, зародыш, личинка и имаго дрозофилы характеризуются переднезадней полярностью. Ооцит развивается так, что один его конец (будущий передний) непосредственно соединяется с цитоплазмой фолликулярных питающих клеток, которые снабжают яйцо белками, рибосомами и мРНК. На противоположном конце яйца накапливается полярная плазма, дающая начало первичным половым клеткам взрослого насекомого. У зародыша, личинки и взрослого насекомого можно легко различить головной отдел и хвостовой конец, между которыми располагаются повторяющиеся единицы — сегменты. 3 сегмента образуют грудь, а оставшиеся 8 — брюшко. Каждый сегмент взрослой мухи характеризуется своими особыми чертами. Первый грудной сегмент, например, несет только ноги; второй грудной сегмент имеет и ноги, и крылья. Третий грудной сегмент несет ноги и жужжальца (балансёры). Грудные и брюшные сегменты различаются также по строению кутикулы.

В реализации плана строения организма ключевое значение имеет его сегментация, разделение на головной, грудной, брюшной отделы и их производные. Этот процесс является универсальным в животном мире и характеризуется двумя основными признаками — количеством сегментов и их качеством. Соответственно различают две группы генов, ответственных за развитие этих признаков: *сегрегационные* и *гомеозисные*.

Сегрегационные гены

Сегрегационных генов, детерминирующих число сегментов у

дрозофилы, известно более двух десятков. Их мутации нарушают становление передне-задней (анимально-вегетативной) полярности сегментов, в результате чего происходит их слияние, уменьшается количество и образуются нежизнеспособные уроды. Различают несколько групп сегрегационных генов. Это — гены материнского эффекта, которые контролируют формирование градиентов в ходе оогенеза, GAP-гены, pair-rule-гены, гены сегментарной полярности, последовательно осуществляющие сегментацию зародыша и подготавливающие почву для функционирования гомеостатических генов. Сегрегационные гены последовательно активируются в процессе индивидуального развития.

За последние полтора десятилетия были собраны данные, на основе которых была предложена модель возникновения такой полярности. Полагают, что, во-первых, материнская мРНК, депонируемая в разных областях яйца, кодирует регулирующие транскрипцию и трансляцию белки, которые диффундируют на стадии синцитиальной бластодермы и активируют (либо репрессируют) определенные гены зиготы. Во-вторых, гены зиготы, регулируемые факторами материнского происхождения, экспрессируются в широких (около трех сегментов) доменах, которые перекрываются друг с другом. Эти гены названы gap-генами (потому что у мутантов по ним отсутствует несколько сегментов). Именно эти гены первыми активируются в развивающемся зародыше. В-третьих, разные концентрации белковых продуктов генов gap-группы активируют гены группы pair-rule, которые транскрибируются в клетках презумптивных зачатков каждого второго сегмента. Транскрипционный паттерн каждого из генов этой группы характеризуется тигровым рисунком и состоит из семи вертикальных полос клеток по всей длине зародыша. Продукты транскрипции генов этой группы активируют транскрипцию генов группы segment-polarity. мРНК и соответствующие ей белки генов этой группы формируют 14 полос, которые разделяют зародыш на сегменты. В это

же время продукты генов групп *gap*, *pair-rule* и *segment-polarity* взаимодействуют друг с другом и активируют гомеозисные гены.

Гены материнского эффекта. Эти гены контролируют формирование градиентов в ходе оогенеза. Анимально-вегетативный, дорсо-вентральный и терминальные структуры формируются несколькими независимыми генными системами. Можно выделить две основные системы генов, особенно важных для **формирования анимально-вегетативного градиента** (передне-заднего). Результаты эмбриологических экспериментов свидетельствуют о существовании в яйцах насекомых, по крайней мере, двух организующих центров: переднего и заднего. Именно эти области формируют два градиента: в передней и задней частях зародыша.

Среди генов первой группы главным является *bicoid*. У его мутантов вместо передних структур формируется дополнительный тельсон. Этот ген транскрибируется в клетках овариолы яичника и можно проследить транспорт этих клеток в анимальный полюс ооцита. Поэтому его мРНК обнаруживается исключительно в передней части ооцита. Но при ее трансляции белковый продукт гена формирует градиент с наибольшей концентрацией в передней части яйца и фоновой концентрацией — в задней. Для поддержания стабильности этого продукта в переднем полюсе зародыша необходима активность еще двух генов *exuperantia* и *swallow*. При их мутациях градиент белка *bicoid* становится размытым и зародыши не формируют передних структур.

С другой стороны, фолликулярные клетки поставляют в ооцит мРНК, синтезированную геном *nanos* и концентрирующуюся на заднем конце зародыша. У мутантов по этому гену нарушается развитие заднего конца зародыша. Для его активации необходимы 5 генов с материнским эффектом. Белок образуется в области заднего полюса и затем транспортируется в область брюшных сегментов.

В формировании плана строения на самых ранних этапах созревания ооцита принимает участие еще один важный ген —

hunchback. Он активируется геном *bicoid*, поэтому его продукт тоже накапливается в передней половине зародыша. Этот ген репрессирует гены, активные в брюшных сегментах, так что в зоне его распределения формируются головные и грудные структуры. Оказывается, белок гена *bicoid* обнаруживается в ядрах и содержит гомеодомен, с помощью которого он может связываться с ДНК и регулировать таким образом экспрессию генов. Было показано, что белок гена *bicoid* способен присоединяться к 5 сайтам, расположенным выше промотора гена *hunchback* и все эти участки имели общую последовательность. В норме белок *nanos* способен блокировать трансляцию мРНК *hunchback*, вероятно, в этом и заключается его основная функция, и в результате формируются задние структуры зародыша.

Вторая система генов контролирует **формирование дорсо-вентрального градиента**. Гены посылают сигнал к рецептору, кодируемому геном *torpedo*, который функционирует в фолликулярных клетках. Белок *torpedo* частично гомологичен рецептору фактора роста (EGF-рецептору) позвоночных и имеет экстрацеллюлярную часть, способную связывать лиганд из ооцита. Затем гены *pipe*, *nudel*, *windbeutel*, функционирующие в фолликулярных клетках, посылают сигнал в вентральную область ооцита. После оплодотворения гены *snake*, *easter*, кодирующие протеазы, активируют ген *spatzle*, так что сигнал возвращается в ооцит. Продукт *spatzle* активирует рецептор *toll* на вентральной стороне яйца. Продукт этого последнего активирует продуцируемую геном *pelle* киназу. Она в свою очередь фосфорилирует продукт гена *sactus*. В результате этого процесса высвобождается белковый продукт гена *dorsal*, поступающий в ядра клеток. Активация *toll*-рецептора ведет к высвобождению белка *dorsal* из комплекса *dorsal-sactus*, так что создается градиент распределения белка *dorsal*, действующего как транскрипционный фактор.

Существует третья система генов, контролирующих

формирование градиентов в оогенезе. Эта группа генов контролирует **формирование терминальных структур**, т. е. акрона (несегментированного головного конца) и тельсона (несегментированного хвостового конца). Ключевую роль в этом процессе играет ген *torso*. При отсутствии его продукта ни акрон, ни тельсон не развиваются, так что эмбрион оказывается полностью сегментированным. Активация белка *torso* осуществляется, как на переднем, так и на заднем концах зародыша продуктом гена *torsoless*, функционирующим в фолликулярных клетках.

Итак, гетерогенизация цитоплазмы созревающего ооцита и формирование полярных градиентов, химически преформирующих план строения будущего организма, реализуется на основе взаимодействия трех систем генов и при участии питающих клеток материнского организма, окружающих ооцит.

гар-гены. Сегрегационные гены последовательно активируются в процессе индивидуального развития. В первую очередь активируются гар-гены (от англ. *gar* — брешь, пролом, щель). Их транскрипция стимулируется продуктами генов материнского эффекта, формирующими градиенты в ходе оогенеза. Они начинают функционировать на синцитиальной стадии развития, когда к 10-11-му циклу клеточного деления ядра мигрируют к периферии развивающегося эмбриона и «прочитывают» позиционную информацию, возникшую благодаря активности генов материнского организма, формируя на поверхности яйца синцитий. В результате этого процесса зародыш подразделяется на несколько пространственных доменов. Мутации гар-генов вызывают выпадения групп сегментов, характер их экспрессии изменяется во времени, но зоны экспрессии не перекрываются.

pair-rule-гены. На фоне специфического распределения продуктов гар-генов под их влиянием активируются, pair-rule-гены, которые "дробят" зародыш на повторяющиеся домены шириной по два парасегмента, в одном из которых этот ген активен, в другом —

нет. Благодаря функционированию этих генов зародыш подразделяется на отдельные сегменты. Нарушение их функционирования ведет к выпадению отдельных (чередующихся) сегментов.

Гены сегментарной полярности. Различные сочетания белковых продуктов pair-rule генов активируют гены сегментарной полярности. Гены сегментарной полярности детерминируют границы конкретных сегментов. Мутации, нарушающие их функционирование, влекут за собой нарушения в развитии отдельных сегментов — четных или нечетных, в зависимости от того, какой из генов сегментарной полярности мутировал. Известно около 15 генов сегментарной полярности, которые фактически создают пространственную дифференцировку внутри каждого сегмента, поскольку области их экспрессии совпадают с границами парасегментов, подразделяющих сегменты на переднюю и заднюю половины.

Кроме того, все сегрегационные гены, последовательно активируемые в ходе развития эмбриона дрозофилы, оказывают друг на друга взаимные влияния через кодируемые ими продукты. Экспрессия сегрегационных генов подготавливает почву для функционирования ключевой системы генов, обеспечивающих качественную спецификацию сегментов — системы гомеозисных генов.

Гомеозисные гены

Название этой группы генов происходит от термина "гомеозис", который ввел в 1894 г. один из классиков генетики У. Бэтсон. Под гомеозисом он понимал превращение одной части тела в другую. Гомеозисные гены являются частью специфической системы генов, контролирующей сегментацию тела насекомых, в частности дрозофилы и других организмов. Примером гомеозисных мутаций является превращение антенны в ногу или аристы в ногу.

Гомеозисные гены, которых у дрозофилы описано около

полусотни, как уже отмечалось, контролируют качественные особенности сегментов и в свою очередь подразделяются на два комплекса: Antennapedia-Complex (ANT-C) и Bithorax-Complex (BX-C). Гены, принадлежащие к ANT-C, контролируют развитие головных сегментов, в том числе интеркалярного, максиллярного, мандибулярного, лабиального, а также грудных сегментов. При утрате функции гена *Antp* область тела, включающая заднюю часть первого грудного сегмента T1, весь второй грудной сегмент T2 и переднюю часть T3, приобретают свойства головных сегментов, что проявляется в образовании головных структур в грудной области. Можно сказать, что ген *Antp* участвует в выборе программы развития сегмента в направлении головы или груди. Гены комплекса BX-C ответственны за спецификацию грудных и брюшных сегментов. При мутации гена *bithoraxoid* первый брюшной сегмент развивается как заднегрудь, в результате формируется 6 крыльев и 8 ног; при мутации гена *bithorax-postbithorax* — 4 крыла. Мутации обычно бывают вызваны мобильными элементами. Предполагается, что активация генов комплекса BX-C осуществляется последовательно — 2-ой торакальный сегмент является базисным, в каждом последующем активируется дополнительный ген, в последнем (8-ом) — все гены.

Характеристика экспрессии гомеозисных генов. Время первого появления транскриптов BX-C очень раннее — уже на 2-4-м часах после оплодотворения яйца, т. е. на стадии бластодермы, когда происходит процесс первичной детерминации тканевых закладок. Таким образом, гены морфогенеза функционируют как бы с опережением, задолго до осуществления контролируемых ими формообразовательных событий.

Экспрессия гомеозисных генов тканеспецифична. Так, ген *Ubx* транскрибируется в эктодерме и ее производных. В мышцах посегментная экспрессия менее выражена, в энтодермальных производных ее нет. При гибридизации на срезах ножные имагинальные диски в этом случае мечены, крыловые — нет. По всей

вероятности, сегментоподобное распределение некоторых изоферментов в органах и тканях дрозофилы связано с функцией генов сегментации, в том числе и гомеозисных генов.

Гомеобокс и гомеодомен. Особенно важным открытием было обнаружение в экзонах всех проклонированных гомеозисных генов (и большинства генов сегментации) высоконсервативной области ДНК из 180 пар оснований. Эту короткую последовательность В.Геринг назвал *гомеобоксом*. Соответствующая последовательность из 60 аминокислот в кодируемых этими генами белках, обогащенная аргинином и лизином, была обозначена термином *гомеодомен*. Гомеодомены являются составной частью белков-регуляторов транскрипции и принадлежат, следовательно, к числу активирующих транскрипцию факторов. Они характеризуются специфической структурой типа «спираль-поворот-спираль». Аминокислотные последовательности гомеодомена образуют три альфа-спирали, при этом первая и вторая расположены антипараллельно, а третья почти под прямым углом к ним. Эта спираль взаимодействует с молекулой ДНК и располагается в ее большой бороздке. Аминокислотные остатки N-терминального конца гомеодомена «укладываются» в малой бороздке ДНК.

Гомеодомены могут быть включены в состав генов, как собранных в кластер, так и диспергированных по геному. Показано, что гомеодомены имеют специфическое сродство к определенным участкам ДНК, которые очень часто характеризуются наличием последовательности ТААТ. Отмечено, что гомеодомены одного и того же типа могут взаимодействовать с разными сайтами связывания ДНК и, наоборот, разные гомеодомены могут взаимодействовать с одним и тем же сайтом связывания ДНК. Гомеобоксодержащие гены (с повсеместным сохранением принципа коллинеарности) были найдены практически у всех живых организмов (губок, гидры, пиявок, нематод и др.). Эти гены богато представлены и у млекопитающих. Гомеобоксодержащие гены, которые собраны у

представителей этого класса животных в кластер, принято в настоящее время называть НОХ-генами. Они особенно хорошо изучены у мыши и человека. В геноме млекопитающих обнаружено 38 НОХ-генов, собранных в 4 кластера. Кластеры занимают область примерно по 120 кб каждый и расположены в четырех разных хромосомах: у мыши — II, VI, XI, XV, у человека — II, VII, XII, XVII. Расположение генов в кластере в основном соответствует расположению гомологичных генов в хромосомах дрозофилы. У млекопитающих в отличие от дрозофилы регионализация тех или иных структур обеспечивается скорее не специфической активностью отдельных гомеозисных генов, а перекрытием зон активности наборов этих генов, так что каждая обособленная область той или иной структуры обязана своим происхождением функционированию специфического, свойственного именно этой области набора гомеозисных генов.

Гены, контролирующие функционирование гомеозисных генов. Обнаружены две группы генов, контролирующих активность гомеозисных генов: Polycomb (PC) и группа trithorax (trx). PC репрессируют гомеозисные гены (нарушают их способность связываться с хроматином) или создают гетерохроматиновые структуры. Trx — активируют транскрипцию — формируют взаимодействующие с хроматином комплексы и модифицируют структуру хроматина. Гомеозисные гены содержат регуляторные элементы Pre (polycomb responsible elements), которые держат энхансеры в неактивном состоянии. У генов PC и trx идет конкуренция за один и тот же участок связывания.

1.5. РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ

Генетика развития изучает проблему реализации наследственных потенций оплодотворенного яйца в течение жизни организма. Когда мы наблюдаем развитие зародыша, становится очевидным, что в клетках разных типов экспрессируются разные

гены. Гемоглобин, например, характерен для эритроцитов, тогда как кристаллик обнаруживается только в клетках хрусталика глаза. Клетки сетчатки способны передавать электрические импульсы на большие расстояния, а прилежащие к ним клетки пигментного эпителия черны от гранул меланина и лишены способности проводить электричество. Клетки каждого из типов образуются в результате многократных делений одного и того же оплодотворенного яйца. Возникает вопрос — что происходит далее с генетической информацией, меняется ли она в процессе развития, чем вызвана экспрессия разных генов в разных клетках — изменениями в структуре ДНК или другими механизмами. Такие процессы как трансдетерминация и трансдифференцировка показывают, что даже дифференцированные клетки взрослого организма могут сохранять потенции к образованию клеток других типов. Окончательно решить вопрос о том, является ли сужение функций ядра дифференцированной клетки необратимым, было бы можно, проверив способность этого ядра индуцировать образование дифференцированных клеток любого другого типа. Для этого следует имплантировать ядро какой-либо дифференцированной клетки в яйцо, собственное ядро которого предварительно было удалено. Если любое пересаженное ядро идентично ядру зиготы, то оно должно обеспечить полное развитие организма. В 1952 г. Бриггс и Кинг показали, что ядра, взятые у зародыша на стадии бластулы, будучи перенесенными в цитоплазму яйцеклетки, обеспечивают развитие полностью сформированного головастика. Джон Гёрдон и его коллеги, используя несколько измененную методику пересадки ядер, получили результаты, показывающие, что многие из ядер дифференцированных клеток остаются тотипотентными.

В настоящее время принята *гипотеза дифференциальной экспрессии генов*, которая заключается в том, что дифференцировка клеток происходит без генетических изменений. Другими словами, предполагается, что в любом организме все соматические клетки

содержат одинаковый набор генов. Развитие, таким образом, осуществляется посредством избирательного включения специфических генов в соответствующем месте и в соответствующее время. Следовательно, разные типы дифференцированных клеток должны использовать разные гены из этого общего для всех клеток наследственного материала.

1.5.1. Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции

На сегодняшний день известно, что регуляция экспрессии генов осуществляется разнообразными путями и что контроль может происходить на уровнях транскрипции, процессинга РНК, трансляции и модификации белка. Большинство регуляторных событий происходит способом дифференциальной транскрипции.

Гетерохроматин. Различают два основных типа хроматина в зависимости от степени его конденсации в интерфазном ядре. Большая часть хромосомного материала во время интерфазы находится в деконденсированном состоянии — такой слабоконденсированный материал называют *эухроматином*. Однако некоторые хромосомные области не подвергаются деконденсации, а сохраняют свою плотную упаковку и способность к окрашиванию на протяжении всей интерфазы. Этот материал называют *гетерохроматином*. Гетерохроматин обнаруживается у всех представителей животных и растений и помимо сродства к красителям обладает рядом других свойств, которые отличают его от эухроматина. Во-первых, гетерохроматин относительно, если не полностью, неактивен в синтезе РНК. Во-вторых, гетерохроматин представляет собой фракцию ДНК, которая реплицируется последней в ходе клеточного цикла. И, в-третьих, гетерохроматин подавляет кроссинговер между хроматидами в ходе мейоза.

Существуют два типа гетерохроматина: конститутивный и факультативный. **Конститутивный** гетерохроматин располагается всегда в одних и тех же положениях на обеих хромосомах из пары гомологов. Обычно его обнаруживают в центромерах, и он часто

состоит из высокоповторяющихся последовательностей ДНК. **Факультативный** гетерохроматин формируется при конденсации хроматина на определенных стадиях жизненного цикла организма и обычно присутствует лишь в одной хромосоме из пары гомологов. Иными словами, на каком-либо этапе развития определенные области ДНК становятся неактивными в транскрипции благодаря их конденсации в гетерохроматин. Было показано, что образование факультативного гетерохроматина отражает широкораспространенный механизм регуляции генов.

У млекопитающих факультативный гетерохроматин проявляется в *феномене инактивации X-хромосомы*. В 1949 г. ученые Барр и Бертрам обнаружили в ядрах нейронов кошки интенсивно окрашенные тельца, расположенные вблизи ядерной оболочки. Позже эти тельца, названные тельцами Барра, были обнаружены у самок многих млекопитающих, в том числе и у человека; было показано, что они представляют собой неактивную X-хромосому. Это означает, что, хотя в клетках самок содержатся две X-хромосомы, а в клетках самцов — только одна, у самок транскрипционно активна может быть лишь одна X-хромосома. Этот феномен называют компенсацией дозы гена. Этот пример демонстрирует, что один из механизмов регуляции генов на уровне транскрипции заключается в переводе большого числа генов в гетерохроматин и, следовательно, в транскрипционно инертное состояние.

Селективная транскрипция генов. Большинство генов не используют избирательную амплификацию в качестве механизма для обеспечения крупномасштабной экспрессии. Например, в развивающихся эритроцитах, в которых гемоглобин составляет 98 % всего синтезируемого белка, не наблюдается избирательной амплификации глобиновых генов. Это значит, что определенные гены могут транскрибироваться избирательно.

Одним из хорошо документированных случаев регуляции дифференцировки на уровне транскрипции является активация

глобинового гена в дифференцирующихся эритроцитах. У куриных зародышей и зародышей человека в процессе развития наблюдаются изменения в синтезе гемоглобина. На примере куриных эритробластов можно проследить за наиболее ранней транскрипцией гемоглобина.

В выделенной из куриного зародыша в возрасте от 20 до 23 ч задней части темного поля наблюдаются кровяные островки, содержащие предшественники эритроцитов. Зонды комплементарной ДНК к глобиновым мРНК показывают, что эти клетки-предшественники еще не транскрибируют глобиновые гены. Однако после двух последующих клеточных делений (35 ч развития) клетки (теперь называемые эритробластами) активно синтезируют гемоглобин. В течение этого периода происходит включение глобиновых генов; каким образом включаются эти гены, остается, правда, пока неясным.

Другой тип регуляции на уровне транскрипции осуществляется на более поздних стадиях развития. У многих видов, включая курицу и человека, эмбриональный и фетальный гемоглобины отличаются от гемоглобина взрослых особей. Эмбриональный гемоглобин человека состоит в основном из двух ζ (дзета)-цепей глобина, двух ϵ (эпсилон)-цепей и четырех молекул гема. В течение второго месяца беременности синтез ζ - и ϵ -цепей внезапно прекращается, тогда как синтез α (альфа) и γ (гамма)-цепей глобина усиливается. Объединение двух γ -цепей с двумя α -цепями образует фетальный гемоглобин. На третьем месяце беременности активируются гены β (бета)- и δ (дельта)-цепей глобина, концентрация этих продуктов медленно возрастает, тогда как концентрация γ -цепей постепенно снижается. Это переключение существенно ускоряется после рождения, и фетальный гемоглобин заменяется на гемоглобин взрослых, $\alpha_2\beta_2$. Гемоглобин взрослых людей в норме состоит на 97 % из $\alpha_2\beta_2$, на 2-3 % из $\alpha_2\delta_2$ и на 1 % из $\alpha_2\gamma_2$.

У человека гены ζ - и α -цепей глобина расположены в хромосоме

16, а гены ϵ -, γ -, δ - и β -цепей сцеплены вместе в соответствии с порядком их активации на хромосоме 11. Таким образом, представляется вероятным, что существует некий механизм, управляющий последовательным переключением генов на хромосоме 11 от генов эмбриональных глобинов к фетальным и, далее, к взрослым.

Дифференциальная экспрессия генов может регулироваться на уровне транскрипции несколькими способами. Например, при гетерохроматизации значительные по размерам части хромосом могут стать генетически инертными; в случае глобиновых генов конкретный ген может быть активирован в клетке определенного типа и в определенное время. В некоторых случаях, когда требуются большие количества обычного продукта того или иного гена (как для рибосомных генов ооцитов амфибий), гены могут быть амплифицированы (для 40S-РНК) и могут синтезироваться позитивные транскрипционные факторы (TFIIIA для 5S-рРНК). Регуляция на уровне транскрипции может также определять судьбу клеток. Транскрипция таких «генов — переключателей путей дифференцировки дочерних клеток» играет существенную роль в детерминации клеток.

Механизмы дифференциальной транскрипции генов. Для осуществления правильной транскрипции необходимы регуляторные элементы двух типов. Регуляторные элементы первого типа называют *цис-регуляторами*. Они представляют собой специфические последовательности ДНК на данной хромосоме. Цис-регуляторы оказывают действие только на ближние гены. Второй тип называют *транс-регуляторами*. Это растворимые молекулы (включая белки и РНК), которые продуцируются одним геном, а взаимодействуют с другими генами на той же хромосоме или на других хромосомах.

В эукариотических генах, кодирующих мРНК, обнаружены два типа цис-регуляторных последовательностей ДНК — промоторы и энхансеры («усилители»). Известны энхансерные

последовательности, которые регулируют или время экспрессии генов, или специфичность экспрессии, или то и другое одновременно. Одно из наиболее резких по времени переключений генной активности наблюдается при переходе к средней бластуле у зародышей лягушки. Было обнаружено, что определенные гены содержат энхансер, который в это время специфично активируется. Обнаружены также тканеспецифические энхансеры, подобные энхансеру гена тяжелой цепи иммуноглобулина. Существуют также энхансеры, реагирующие на гормоны. В ходе развития нередко приходится наблюдать координированную регуляцию экспрессии генов. Это явление имеет место, когда в клетках одного типа одновременно синтезируются несколько специфичных для них белков или когда какой-либо гормон индуцирует экспрессию нескольких генов в клетках различного типа. Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что, по крайней мере, в некоторых случаях координированная регуляция генов осуществляется, когда различные структурные гены присоединены к одинаковым или похожим энхансерам. В поджелудочной железе энхансеры для десяти эндокринных белков имеют консенсусную последовательность из 20 пар оснований.

Метилирование ДНК. Метилирование ДНК может менять структуру гена и благодаря этому регулировать его активность. В развивающихся спермиях не наблюдается ни одно из распределений гипометилирования, характерных для соматических клеток. Все специфические для клеток гены (глобинов, овальбумина, иммуноглобулинов и т. д.) являются высокометилированными. Большая часть гипометилированных сайтов, обнаруженных до сих пор в сперматогониях (предшественниках спермиев), оказываются метилированными в зрелых спермиях. По разнице в метилировании генов спермия и яйца можно определить, получен ли ген от отца или от матери. Если ядра первичных половых клеток и у самцов, и у самок резко гипометилированы, то гены спермия и яйца интенсивно

метилованы. Кроме того, характер метилирования данного гена в яйце и спермии может различаться. Этот материнский и отцовский импринтинг добавляет информацию к наследуемым геномам — информацию, которая может регулировать активность генов и поведение хромосом в пространстве и во времени.

1.5.2. Регуляция экспрессии генов на уровне процессинга РНК

Первым этапом этого уровня регуляции является созревание мРНК, ее процессинг, осуществляемый посредством сплайсинга. В процессинге, помимо про-мРНК участвуют соответствующие ферменты (рестриктазы, метилазы, ферменты полиаденилирования и «кэпирования»), а также так называемые информоферные белки, образующие ядерные рибонуклеопротеидные (РНП) комплексы (ядерные информосомы), описанные Г.П. Георгиевым и О.П. Самариной. Белковый состав информофер достаточно сложен; более 60 % составляют белки, характеризующиеся высоким содержанием глицина и аналога аргинина. От этих белков зависит упаковка РНП-частиц.

На втором этапе «зрелая» мРНК стабилизируется. Избирательная стабилизация такой мРНК, выход ее из пула гетерогенной ядерной РНК включает присоединение поли-А-фрагментов (полиаденилирование). От длины полиаденилового «хвоста» зависит продолжительность жизни мРНК и ее трансляции в цитоплазме. Дифференциальная стабильность мРНК может быть одним из механизмов дифференцировки, поскольку различия в стабильности молекул мРНК отражаются на интенсивности синтеза соответствующих белков.

На третьем этапе мРНК транспортируется из ядра в цитоплазму. Регуляция синтеза белка на данном этапе может проявляться в большей или меньшей задержке выхода всех видов мРНК из ядра в цитоплазму, в дифференциальной задержке выхода отдельных видов мРНК и, наконец, в селекции РНК, т.е. выходе одних видов мРНК и

деградации других видов в ядре. В частности, гистоновая мРНК обнаруживается в цитоплазме очень быстро по сравнению с другими фракциями.

мРНК не является первичным продуктом транскрипции. Существует ядерная РНК (яРНК), которая по размерам намного больше, чем мРНК, и которая характеризуется существенно более коротким временем полужизни, чем цитоплазматические мРНК. Из-за большого разнообразия в размерах эти молекулы были названы гетерогенной ядерной РНК (гяРНК). Молекулы гяРНК имеют длину приблизительно $5-19 \cdot 10^3$ нуклеотидов, тогда как размеры мРНК составляют обычно $2 \cdot 10^3$ оснований, и распадаются с периодом полужизни, измеряемым минутами вместо часов.

Дифференциальный процессинг РНК оказался чрезвычайно важным для образования ряда специфических белков. Наиболее хорошо изученные случаи относятся к образованию различных иммуноглобулинов (антител) в ходе дифференцировки В-лимфоцитов. Дифференциальный процессинг РНК изучали наиболее интенсивно на примере экспрессии иммуноглобулиновых генов, однако было установлено, что он контролирует альтернативные формы экспрессии более чем 50 различных белков. В ряде случаев сплайсинг РНК может создавать в разных клетках различные белки. Процессинг определенного предшественника мРНК в некоторых клетках щитовидной железы поставляет мРНК для гормона кальцитонина. Однако в нервных клетках тот же предшественник мРНК проходит процессинг в мРНК для нейропептида CGRP. Это явление интересно само по себе, а также потому, что другой транскрипт после альтернативного сплайсинга генерирует в нейронах образование субстанции Р, а в тех клетках щитовидной железы, в которых синтезируется кальцитонин, — субстанции К. Полагают, что существуют специфичные для нейронов регулирующие сплайсинг факторы, которые функционируют на целом наборе предшественников, способных к альтернативному сплайсингу.

Полагают также, что сходным образом пять различных фибронектинов человека генерируются одним вариантом гена фибронектина. Альтернативный сплайсинг предшественников мРНК генерирует, очевидно, различные формы молекул адгезии нервных клеток N-МКА, а также фетальные и взрослые формы миозинов. Таким образом, альтернативный сплайсинг РНК может создавать семейство белков, кодируемых одним геном.

1.5.3. Регуляция экспрессии генов на уровне трансляции

После транскрипции, процессинга и выхода мРНК из ядра необходима ее трансляция, чтобы получить белок, закодированный в геноме. Регуляция на уровне трансляции представляет собой исключительно важный механизм контроля экспрессии генов. В данном случае мРНК уже образована, но она может транслироваться или не транслироваться в зависимости от определенных условий в клетке. Таким образом, контроль экспрессии генов на уровне трансляции может использоваться, когда нужен немедленный всплеск синтеза белка (как мы увидим, это происходит сразу после оплодотворения яйца) или в качестве механизма тонкой регуляции, обеспечивающей синтез строго определенного количества белка на имеющемся запасе мРНК (например, при синтезе гемоглобина). Мы узнаем также, что контроль на уровне трансляции осуществляется несколькими путями и в различных клетках используются разные пути.

Контроль на уровне трансляции при координированном синтезе белка: продукция гемоглобина. Одной из основных проблем генетической регуляции является координированный синтез нескольких продуктов с разных участков генома. Когда развивающийся эритроцит синтезирует гемоглобин, необходимо, чтобы альфа-глобиновые цепи, бета-глобиновые цепи и молекулы гема производились соответственно в соотношении 2:2:4. Любое существенное отклонение от этого соотношения приводит к тяжелым

заболеваниям. Результаты недавних исследований показали, что пропорциональный синтез компонентов гемоглобина регулирует молекула гема. Достигается это двояким образом. Во-первых, избыток гема будет выключать свой собственный синтез. Осуществляется выключение синтеза посредством инактивации 8-аминолеву-линатсинтазы (DALA-синтазы), первого фермента на пути продукции гема. Таким образом, когда количество гема превосходит количество молекул, способных присоединить его, дальнейшая продукция гема прекращается. Во-вторых, избыток гема стимулирует синтез глобинов. Итак, синтез гемоглобина подвержен регуляции на уровнях транскрипции и процессинга РНК, однако итоговая молекула формируется при тонкой координации на уровне трансляции.

1.5.4. Посттрансляционная регуляция экспрессии генов

После того как белок синтезирован, он встраивается в структуры более высокого уровня организации. Он может стать частью цитоскелета или включиться в один из множества ферментативных путей синтеза и распада клеточных метаболитов. В любом случае индивидуальный белок является теперь частью сложной «экосистемы», которая интегрирует его во взаимоотношения с многочисленными другими белками. Поэтому нам не уйти от проблемы регуляции экспрессии генов и после того, как белок синтезирован, ввиду некоторых изменений, которые могут еще произойти.

Во-первых, некоторые новосинтезированные белки не активны без последующих модификаций. Эти модификации могут заключаться в отщеплении определенных ингибиторных доменов белка или в присоединении небольших компонентов для увеличения активности белка.

Во-вторых, некоторые белки могут избирательно инактивироваться. Иногда инактивация может осуществляться с помощью присоединения ингибиторного лиганда.

В-третьих, некоторые белки должны быть «адресованы» в свои специфические внутриклеточные компартменты. Клетка не просто мешок с ферментами; обычно белки локализуются в определенных областях, таких, как мембраны, лизосомы или митохондрии.

В-четвертых, некоторым белкам необходимо объединиться с другими белками, чтобы образовать функциональное целое. Гемоглобин, микротрубочки и рибосомы — все это примеры объединения многочисленных белков, чтобы сформировать функциональный комплекс. Следовательно, на экспрессию генетической информации можно влиять также и на посттрансляционном уровне.

Коллаген: конспект посттрансляционной регуляции. При рассмотрении синтеза коллагена, одного из главнейших структурных белков тела, мы можем показать важность и разнообразие механизмов посттрансляционного контроля.

Во-первых, последовательность мРНК коллагена транслируется в пептид проколлагена. Аминоконец проколлагена содержит сигнальную последовательность, которая позволяет ему войти в полость гранулярного эндоплазматического ретикулума. Этот сигнальный пептид отщепляется от остальной части молекулы коллагена. Внутри эндоплазматического ретикулума молекулы коллагена встречаются также с тремя ферментами, которые его гидроксилируют. Два из этих ферментов гидроксилируют остатки пролина в 3-гидроксипролин и 4-гидроксипролин; третий — превращает лизины в оксидилизованные остатки. Эти ферменты узнают остатки пролина и лизина только в определенных положениях.

Когда цепи коллагена становятся гидроксилированными, к оксидилизам могут быть добавлены остатки сахаров. Первый фермент-галактозилтрансфераза — добавляет к оксидилизину галактозу; второй фермент — глюкозилтрансфераза — добавляет к оксидилизигалактозе глюкозу. Участок около карбоксильного конца модифицируется глюкозамином и маннозой.

Следующий этап включает образование внутрицепочечных дисульфидных связей и организацию трех коллагеновых полипептидов в тройную спираль. Дисульфидные связи образуются на карбоксильных концах между прилежащими молекулами коллагена, создавая тем самым условия для формирования тройной спирали. Если пролины были гидроксिलированы правильно, то три цепи скручиваются одна вокруг другой, образуя протяженный участок тройной спирали, ограниченный с обеих сторон глобулярными областями.

В таком виде молекула коллагена выделяется во внеклеточное пространство. Процессинг продолжается даже там. Сначала протеолитические ферменты удаляют глобулярные домены на аминоконце и карбоксильном конце. В результате этого отрезания образуется фрагмент совершенной тройной спирали. На следующем этапе эти фрагменты самопроизвольно собираются в фибриллы. Однако эти фибриллы не обладают достаточной механической прочностью, чтобы функционировать в качестве структурных белков до тех пор, пока различные тройные спирали не будут ковалентно связаны друг с другом с помощью дополнительных поперечных сшивок. Это связывание осуществляется путем ферментативной модификации лизилов в оксилизидиловых остатках и присоединения их друг к другу. Таким образом, существует значительное число необходимых этапов модификации белка после трансляции.

1.6. КЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В РАЗВИТИИ

Организм — это не просто собрание случайно расположенных клеток различных типов, и развитие заключается не только в дифференцировке клеток, но и в их пространственной организации в многоклеточные структуры (ткани и органы), называемой морфогенезом. Обсуждение морфогенеза можно ограничить пятью основными вопросами. Как из клеток формируются ткани? Как ткани объединяются в органы? Почему органы возникают в строго

определенном, соответствующем для них месте? Каким образом мигрирующие клетки достигают конечного пункта своей миграции? Как происходит рост органов и составляющих их клеток; как скоординирован этот рост в процессе развития? Все эти вопросы касаются аспектов поведения клеток. В самом деле, принято считать, что морфогенез происходит благодаря осуществлению относительно ограниченного набора процессов, происходящих на клеточном уровне: 1) направления и числа клеточных делений; 2) изменения формы клеток; 3) миграции клеток; 4) их роста; 5) гибели и, наконец, 6) изменений в составе клеточной мембраны и внеклеточного матрикса.

Существуют, по-видимому, два основных способа, посредством которых клетки, взаимодействуя друг с другом, влияют на морфогенез. В основе первого *лежит секреция клетками одного типа способных к диффузии веществ*, изменяющих поведение клеток других типов. Эти вещества представлены гормонами, факторами роста и морфогенами. Их молекулы координируют морфогенетическую активность всего организма. В основе второго способа, ответственного, прежде всего, за создание специфических тканей и органов, *лежит взаимодействие между клеточными поверхностями соседних клеток*. В процессе органогенеза отдельные клетки или группы клеток меняют свое относительное положение и вступают во взаимодействие с клетками других типов. Избирательное взаимодействие между соседствующими клетками приводит к тому, что клетки разных типов располагаются строго упорядоченным образом, формируя различные ткани и органы.

Начало современному анализу морфогенеза было положено *экспериментами Таунса и Гольтфретера* в 1955 г. Используя способность тканей зародышей амфибий диссоциировать на отдельные клетки в щелочной среде, эти исследователи приготовили суспензии одиночных клеток каждого из трех зародышевых листков и тканей нейрулы. Две или более таких суспензий можно

комбинировать в разных сочетаниях; после нормализации pH клетки прилипают друг к другу, формируя агрегаты на агаре, покрывающем дно чашки Петри. Результаты экспериментов оказались поразительными. Во-первых, исследователи обнаружили, что диссоциированные клетки способны к пространственной сегрегации. Иными словами, происходит рассортировка смешанных клеток, и клетки каждого типа занимают соответствующую область. Так, в агрегате, образованном эпидермальными и мезодермальными клетками, эпидермальные клетки оказываются на периферии агрегата, а мезодермальные внутри. Во-вторых, Таунс и Гольтфретер обнаружили, что окончательное положение реагрегировавших клеток отражает их положение в зародыше. Презумптивные эпидермальные клетки мигрируют на периферию, а клетки нервной пластинки перемещаются внутрь, образуя структуру, напоминающую нервную трубку. Т. е. клетки способны сортироваться в соответствии со своим истинным положением в зародыше. Третий вывод заключался в том, что в процессе развития избирательное сродство меняется. Этого следовало ожидать, поскольку связь между соседними клетками зародыша не остается постоянной. Для нормального развития необходимо, чтобы в определенные периоды времени осуществлялось дифференциальное взаимодействие клеток одной популяции с клетками другой.

Разнообразные события в развитии и особенно события, связанные с направленными перемещениями клеток, объясняют изменением сродства клеточных поверхностей. Так, в начале гаструляции морского ежа клетки-предшественники первичной мезенхимы утрачивают сродство к соседним клеткам и внеклеточному гиалиновому слою и одновременно приобретают сродство к волокнам фибронектина, выстилающим бластоцель. На более поздних этапах гаструляции эти клетки приобретают способность мигрировать к определенной части стенки бластоцеля. Кроме того, будучи «антисоциальными» по отношению друг к другу

со времени ингрессии в бластоцель, теперь они начинают объединяться в синцитий и формировать мезодермальное кольцо вокруг инвагинирующей энтодермы. Эти изменения адгезионных свойств характеризуются временной специфичностью и специфичностью в отношении клеток первичной мезенхимы.

1.6.1. Способы клеточной миграции

Подвижная клетка едва ли в течение какого-то времени покинет свое исходное местоположение и удалится от него на значительное расстояние, если условия существования не вынудят ее перемещаться в определенном направлении. Каков же механизм, позволяющий клеткам мигрировать в те или иные области зародыша? Дальние миграции могут быть обусловлены хемотаксисом, гаптотаксисом, гальванотаксисом и контактным ориентированием. Ближние взаимодействия (ответственные, например, за взаимодействие клеток при формировании органов) могут быть обусловлены контактным ингибированием и термодинамическими взаимодействиями на клеточных поверхностях.

Хемотаксисом называют движение клеток в направлении градиента концентрации какого-либо химического фактора, содержащегося в растворе. ***Гаптотаксис*** – движение по градиенту молекул, обуславливающих адгезию во внеклеточном матриксе. При ***гальванотаксисе*** источником полярных градиентов в зародыше являются заряженные ионы. ***Контактное ориентирование*** играет роль, когда в процессе миграции участвуют физические факторы. На клетку влияют физические свойства субстрата, по которому она перемещается; эти особенности заставляют ее выбирать преимущественное направление своего перемещения путем контактного ориентирования. ***Контактное ингибирование движения.*** Рассмотренные выше механизмы миграции клеток на относительно дальние расстояния следует дополнить локальными явлениями. Клетки движутся посредством вытягивания тонкого отростка - ламеллоподии. Когда ламеллоподия одной мигрирующей

клетки контактирует с поверхностью другой клетки, наблюдается паралич этой ламеллоподии и ее исчезновение. Такое явление называется контактным ингибированием движения. В данном случае, новая ламеллоподобия образуется где-либо в другом месте клетки, уводя ее от соседней. В итоге происходит миграция подвижных клеток от центральной массы.

Термодинамическая модель клеточных взаимодействий. Приведенные выше модели объясняют ряд существенных черт морфогенеза, но они не позволяют объяснить явление рассортировки, обнаруженное Таунсом и Гольцфретером. М. Стейнберг предложил модель, объясняющую направления клеточной рассортировки на основе принципов термодинамики. В опытах на клетках трипсинизированных эмбриональных тканей Стейнберг показал, что клетки определенных типов в комбинациях с одними клетками всегда мигрируют к центру, а с другими — к периферии. Иными словами, в результате клеточной перестройки достигается наиболее стабильная в термодинамическом отношении организация. Все, что необходимо для рассортировки клеток, — это разная сила их адгезии. В простейшем случае на поверхности всех клеток может быть один и тот же сорт «клея». Количество этого продукта клеточной поверхности или клеточная архитектура, обуславливающая различную концентрацию этого вещества, может стать достаточным условием для установления разного количества устойчивых контактов между клетками разных типов. Вместе с тем причиной термодинамических различий могут быть разные типы адгезионных молекул. Эта термодинамическая модель названа *гипотезой дифференциальной адгезии*. В соответствии с этой гипотезой считается, что ранний зародыш находится в состоянии равновесия, пока какое-либо изменение активности генов не приведет к изменению поверхностных молекул. Тогда происходят перемещения клеток с целью поиска и установления новой равновесной конфигурации.

1.6.2. Изменения в строении клеточной поверхности

Клеточная мембрана содержит белки, способные взаимодействовать с внешней средой. Некоторые белки имеют активные участки, направленные наружу, к другим клеткам. Наиболее известные белки этого типа — транспортные белки, облегчающие движение ионов и питательных веществ в клетку, и рецепторные белки, связывающие гормоны и лекарственные препараты. Кроме того, есть еще три класса молекул клеточной мембраны (обычно это белки), специально участвующие в обеспечении специфических взаимодействий с другими клетками

1. Молекулы клеточной адгезии. Эти белки участвуют в адгезии клетка-клетка. Они могут объединять клетки в эпителиальные слои и конденсировать мезенхимные клетки.

2. Молекулы адгезии клеток к субстрату. Эти молекулы участвуют в связывании клеток с их внеклеточными субстратами. К их числу относятся компоненты внеклеточного матрикса и рецепторы для этих молекул на поверхности клеток. Молекулы адгезии к субстрату обуславливают движение мезенхимных клеток и пространственное разделение эпителиальных слоев.

3. Молекулы клеточных контактов. Эти молекулы обеспечивают пути, посредством которых цитоплазма соседних клеток может сообщаться (т. е. их коммуникацию), а также обеспечивают непроницаемость и сообщают механическую прочность эпителиальным слоям. Предполагается, что экспрессия этих молекул клеточной поверхности опосредует связь между одномерным генетическим кодом и трехмерным организмом. Модулируя появление этих молекул, геном таким образом детерминирует процесс морфогенеза.

1.6.3. Молекулы клеточной адгезии

Молекулы клеточной адгезии (МКА) можно подразделить на три группы:

1) кадгерины, адгезионные свойства которых зависят от ионов кальция;

2) иммуноглобулиновое сверхсемейство МКА, у которых домены, связывающие клетки, сходны с доменами молекул антител;

3) сахаридные МКА, у которых МКА-белки узнают углеводные остатки на соседних клетках.

Кадгерины представляют собой кальций-зависимые МКА, которые отвечают за пространственную сегрегацию клеток и организацию формы тела животного. Идентифицированы три класса кадгеринов.

Е-кадгерин экспрессируется всеми эмбриональными клетками млекопитающих, начиная с одноклеточной стадии. Позже распространение Е-кадгерина ограничивается эпителиальными тканями зародышей и взрослых.

Р-кадгерин первоначально экспрессируется на внезародышевых клетках и клетках стенки матки. Возможно, что Р-кадгерин облегчает связь трофобласта с маткой, во всяком случае, у зародышей мыши наблюдается контакт Р-кадгерина клеток матки с Р-кадгерином клеток трофобласта.

Н-кадгерин впервые обнаруживается на мезодермальных клетках зародыша во время гаструляции по мере утраты ими экспрессии Е-кадгерина. Появление и исчезновение Н-кадгерина часто наблюдается в местах активных клеточных перестроек, например при разъединении сомита: когда склеро-том и дерматом начинают отделяться от эпителиальных структур сомита, они теряют свой Н-кадгерин

Дифференциальной экспрессией кадгеринов можно объяснить данные по гомотипической сегрегации, представленные выше. Подтвердилось это в экспериментах по трансфекции различных кадгериновых генов в фибробласты мыши, которым вообще не свойственна экспрессия каких бы то ни было кадгеринов. В результате этих трансфекций была выявлена дифференциальная

экспрессия фибробластов: те из них, что экспрессировали В-кадгерин, прилипали к фибробластам, несущим Е-кадгерин, а фибробласты, экспрессирующие Р-кадгерин, прилипали к другим, несущим Р-кадгерин. Кроме того, при рекомбинации диссоциированной ткани эмбрионального легкого в присутствии нормальных фибробластов и фибробластов, несущих Е-кадгерин, было обнаружено, что последние включаются в состав эпителиальных легочных трубочек (которые в норме экспрессируют Е-кадгерин), тогда как нормальные, нетрансфицированные фибробласты ассоциируются с клетками мезенхимы (не экспрессирующими каких-либо кадгеринов). Следовательно, можно полагать, что кадгеринам принадлежит ведущая роль при объединении клеток в ткани.

Молекулы кадгеринов имеют три главных домена: внеклеточный домен, который обуславливает адгезию, трансмембранный домен, пронизывающий мембрану клетки, и цитоплазматический домен. Для функционирования кадгерина критическое значение имеет цитоплазматический домен - эта область связывает кадгерин с цитоскелетом, указывая на механизм, с помощью которого внеклеточное связывание может влиять на форму клетки и ее поведение.

Иммуноглобулиновое сверхсемейство МКА. Многие молекулы клеточной адгезии, не нуждающиеся для своего функционирования в ионах кальция, имеют очень сходную структуру. Эта структура с ее внеклеточными глобулярными доменами удерживается дисульфидными мостиками и напоминает структуру молекул иммуноглобулинов, что послужило основанием для предположения о происхождении иммуноглобулинов от этой группы молекул клеточной адгезии. Поэтому такие гликопротеины и называют «иммуноглобулиновым сверхсемейством».

Полагают, что N-МКА соседних клеток взаимодействуют друг с другом, образуя мостики между клетками. N-МКА могут выполнять различные функции в зависимости от содержания в них остатков

сиаловой кислоты. Сиаловые кислоты способны резко уменьшить адгезивность клеток в отношении друг друга. По мере развития зародыша большая часть белков N-МКА из форм с высоким содержанием сиаловой кислоты превращается в формы с ее низким содержанием.

Клеточная адгезия, обусловленная сахарадами. Накапливается все больше данных о том, что гликозилтрансферазы опосредуют перемещение клеток, характерное для гастрюляции и морфогенеза. В ходе этих процессов клетки мигрируют по углеводным субстратам, в частности по гликозаминогликанам.

Мигрирующих клеток гастрюлирующего куриного зародыша, мигрирующие клетки первичной полосы и клетки нервного гребня включают в состав своей поверхности некоторые сахара от сахарсодержащих нуклеотидов. Было показано, что мигрирующие клетки используют свои гликозилтрансферазы в качестве рецепторов для олигосахаридов субстрата. Адгезия в таком случае, вероятнее всего, осуществляется путем специфических взаимодействий типа ключ-замок между субстратом и гликозилтрансферазой. По мере продвижения клетки эти мостики разрушаются в результате каталитического включения нового углеводного остатка.

Таким образом, клеточная мембрана располагает несколькими механизмами, позволяющими ей прикрепляться к мембранам других клеток. Она может использовать кальций-независимые молекулы клеточной адгезии, кальций-зависимые молекулы клеточной адгезии, адгезионные молекулы ограниченного действия и гликозилтрансферазы. И этим число механизмов не исчерпывается. Как уже кратко упоминалось выше, клетки могут специфически связываться с особыми компонентами внеклеточного матрикса.

1.6.4. Морфогенез путем взаимодействия между клеткой и субстратом

Внеклеточный матрикс. Помимо всего прочего, клетки

синтезируют макромолекулы, которые выделяются во внеклеточные пространства и обуславливают взаимодействия между клетками и их окружением. Такие молекулы называют адгезионными молекулами субстрата; они формируют внеклеточный матрикс. Роль различных видов матрикса в развитии многообразна. В одних случаях матрикс разделяет две соседние группы клеток и препятствует любым взаимодействиям между ними. В других случаях внеклеточный матрикс может служить субстратом, по которому клетки мигрируют, или даже индуцировать дифференцировку клеток некоторых типов.

В состав внеклеточного матрикса входят три основных компонента: коллаген, протеогликаны и гликопротеины.

Коллаген — это семейство гликопротеинов, содержащих в большом количестве остатки глицина и пролина. Выше мы уже говорили о том, что многие пролиновые и лизиновые группы подвергаются посттрансляционной модификации с образованием гидроксипролина и гидроксизина. Являясь главной структурной опорой почти любого органа животных, коллаген составляет примерно половину общего белка тела. Большая часть коллагена (до 90 %) обнаруживается во внеклеточном матриксе кожи, сухожилий и костей; этот коллаген относят к типу I. Существуют многочисленные иные типы коллагена, которые выполняют особые функции.

Протеогликаны — особый тип гликопротеинов, у которых: масса углеводных остатков значительно превосходит массу белка и углеводы представлены линейными цепями повторяющихся дисахаридов. Обычно один из сахаров дисахарида имеет аминогруппу, поэтому повторяющуюся единицу называют гликозаминогликаном. Взаимосвязанные белок и углевод формируют напоминающий паутину матрикс, и во многих случаях протеогликаны, окружая подвижные клетки, препятствуют их сближению. Консистенция внеклеточного матрикса зависит от соотношения коллагена и протеогликана. Хрящ, характеризующийся

высоким содержанием протеогликанов, мягок, тогда как связки, в которых преобладают коллагеновые волокна, достаточно жестки. В базальных пластинках доминируют протеогликаны; образуя структурную опору, они выполняют здесь еще и роль молекулярного сита.

Внеклеточные гликопротеины. Внеклеточный матрикс содержит и много других специализированных молекул, таких, как фибронектин, ламинин и энтактин. Эти крупные гликопротеины, по всей вероятности, обеспечивают организацию коллагена, протеогликана и клеток в упорядоченную структуру.

Фибронектин — это очень крупный (молекулярная масса — 460 000 дальтон) гликопротеиновый димер, синтезируемый фибробластами, хондроцитами, эндотелиальными клетками, макрофагами и некоторыми эпителиальными клетками, в частности гепатоцитами и амниоцитами. Одна из функций фибронектина состоит в том, что он служит общей адгезивной молекулой, связывая клетки с различными субстратами, такими, как коллаген и протеогликаны. Помимо этого, фибронектин организует внеклеточный матрикс при помощи нескольких особых сайтов связывания, взаимодействие которых с определенными молекулами обуславливает объединение клеток со своим внеклеточным матриксом.

Как уже упоминалось в предыдущих главах, фибронектин играет важную роль в миграции клеток, выстилая путь, по которому клетки мигрируют. У многих видов мезодермальные клетки в процессе гаструляции мигрируют по фибронектиновым поверхностям и при локальном удалении фибронектина движение их прекращается.

Ламинин является основным компонентом базальных пластинок. Он образован тремя пептидными цепями и, как фибронектин, может связываться с коллагеном, гликозаминогликанами и клетками. Известно, что, как и фибронектин, ламинин играет роль в организации внеклеточного

матрикса, способствует адгезии и росту клеток, изменяет форму клеток и позволяет клеткам мигрировать.

Интегрины — рецепторы клеток к фибронектину и ламинину. Способность клеток связываться с перечисленными выше гликопротеинами зависит от экспрессии на поверхности клеток рецепторов клеточной мембраны для «сайта связывания клетки» этих крупных молекул. Было обнаружено, что рецепторный комплекс к фибронектину не только связывает фибронектин на наружной поверхности клетки, но одновременно и связывает белки цитоскелета изнутри. Таким образом, фибронектиновый рецепторный комплекс пронизывает клеточную мембрану, соединяя два типа матрикса. На внутренней поверхности клеточной мембраны он служит местом закрепления актиновых микрофиламентов, обуславливающих движение клетки, а на внешней ее поверхности он связывается с фибронектином внеклеточного матрикса. Это семейство рецепторных белков было названо интегринами, поскольку они интегрируют внутриклеточные и внеклеточные конструкции, позволяя им работать вместе.

1.6.5. Контактные модификации и морфогенез

Наличие внеклеточного матрикса может приводить либо к разъединению клеток, либо к их объединению. Если связь клеток осуществляется посредством внеклеточного матрикса, то базальная пластинка обычно формируется только на одной стороне. Такое расположение позволяет прилежащим клеткам контактировать и взаимодействовать посредством своих боковых поверхностей. Существуют три основных типа специализированных клеточных контактов: плотные контакты, десмосомы и щелевые контакты.

Плотные контакты обеспечивают наиболее тесные клеточные взаимодействия; они используются для разделения внеклеточного пространства на функциональные области (отдельные отсеки), или компартменты. Эту способность формировать компартменты мы уже

отмечали ранее, когда речь шла о плотных контактах, образуемых наружными клетками бластоцисты млекопитающих.

Десмосомы часто встречаются в тех случаях, когда клетки соединяются для формирования непроницаемой ткани. В цитоплазме прилежащих клеток обнаруживаются локальные утолщения, образованные фибриллярным белком. Ширина промежутка между клетками составляет 200-350 нм и заполнено гликопротеиновым цементом. Клетки, соединенные посредством десмосом, отделить друг от друга очень трудно.

Щелевые контакты можно обнаружить между прилежащими клетками многих типов, находящимися на расстоянии от 20 до 40 нм. Это пространство пересекают тончайшие отростки, которые служат не для разделения компартментов, а для коммуникации клеток друг с другом. Клетки, связанные коммуникационными каналами, называются «сопряженными»; они могут обмениваться друг с другом небольшими молекулами и ионами. У большинства зародышей, по крайней мере, ранние бластомеры связаны щелевыми контактами, в результате чего небольшие растворимые молекулы и ионы свободно проходят между ними. И снова мы можем обратиться к уже обсуждавшимся примерам: так, клетки внутренней клеточной массы зародышей млекопитающих сопряжены посредством щелевых контактов, а в ходе развития некоторых моллюсков щелевые контакты формируются в точно определенное время, когда возникает необходимость передачи информации от одного бластомера к другому.

1.7. ДЕТЕРМИНАЦИЯ ПОЛА И ЕЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ

Проблема, касающаяся механизма детерминации (определения) пола особи, со времен античности остается одной из важнейших проблем эмбриологии. Аристотель, собиравший и анатомировавший зародыши, утверждал, что пол определяется теплом мужского партнера при половом сношении. Чем горячее страсть, тем больше

вероятность появления мужского потомства. С тех пор очень долго детерминацию пола связывали с условиями среды, в частности с теплом и хорошим питанием. Доказательство существования половых хромосом в геноме животных стало поворотным пунктом в понимании процессов детерминации пола. Тем не менее, расшифровка конкретных механизмов определения пола оказалась непростой задачей. В настоящее время сравнительно полное представление об этих процессах получено лишь в отношении нескольких объектов (дрозофила, нематода, некоторые виды высших млекопитающих, в т. ч. человек, птицы). Эти исследования показали существование разнообразных генетических систем определения пола. Ранее в литературе часто противопоставляли генотипическую детерминацию пола, осуществляемую особыми генетическими системами, фенотипической, при которой обнаруживается зависимость развития половых признаков от факторов внешней среды. Необходимо помнить, что в обоих случаях детерминация пола происходит при непосредственном участии генома. При фенотипическом определении пола именно геном воспринимает некоторые факторы среды в качестве сигналов, которые инициируют активацию генетических программ, управляющих процессами детерминации пола.

1.7.1. Некоторые типы определения пола в животном мире

Выделяют несколько типов определения пола в зависимости от числа и состава половых хромосом.

Детерминация пола с помощью половых хромосом (генотипический). Например, у самца могут быть X- и Y-хромосомы, а у самки — только XX. К такому типу относятся млекопитающие, человек, дрозиды. Другой тип встречается у некоторых бабочек и червей и связан с наличием у самцов XO-хромосом, а у самок — двух X-хромосом. Еще один тип хромосомного определения пола найден у птиц, некоторых бабочек, земноводных и цветковых растений. У них гетерогаметным (т. е. с разными половыми хромосомами) полом

является женский. Половые хромосомы в эволюции возникали многократно и независимо в разных группах животных. Например, X-хромосома дрозофилы и X-хромосома мыши в генетическом плане ничего общего между собой не имеют. Равным образом негомологичные Z-хромосомы бабочек и птиц обозначаются одним и тем же символом потому, что в обоих случаях они обнаруживаются у гомогаметного мужского пола.

У млекопитающих все зрелые яйца самок обладают одной X-хромосомой (вместе с набором аутосом), а спермии самцов бывают двух родов: один — с X-хромосомой, другой — с Y-хромосомой. Оплодотворение яйца X-спермием приводит к образованию зиготы XX, которая развивается в самку, а оплодотворение яйца Y-спермием порождает зиготу XY, из которой развивается самец.

Фенотипический тип детерминации пола. Кроме того, у некоторых организмов встречается детерминация пола, зависящая от условий обитания. Например, пол большинства черепах и всех видов крокодилов определяют условия среды, в которых находился развивающийся зародыш после оплодотворения. У этих рептилий решающим фактором детерминации пола служит температура в определенный период развития яйца (стадия появления полового гребня). Обычно из яиц, инкубируемых при низких температурах (22-27 °C), вылупляются особи какого-то одного пола, а из яиц, инкубируемых при более высоких температурах (30 °C и выше), — особи другого пола. Лишь небольшой интервал температур позволяет вылупляться из одной и той же кладки яиц и самцам, и самкам. Это явление связано с тем, чувствительная к температуре стадия приходится на период, предшествующий половой дифференцировке гонад. Установлено, что феминизирующее действие температуры связано с активацией экспрессии гена ароматазы. Появление ароматазы способствует переключению биосинтеза на формирование женских половых гормонов. Таким образом, у рептилий механизм определения пола обусловлен дифференциальной активностью генов

исходно бисексуальных зародышей.

Кроме этих двух типов определения пола известны еще детерминация пола без участия половых хромосом (перепончатокрылые – пол зависит от пloidности) и прогамное определение пола (у особей с резким половым диморфизмом – археаннелиды, тли, — потомство различается по количеству хромосом).

1.7.2. Развитие гонад у млекопитающих

Развитие гонад представляет собой уникальное эмбриологическое явление. Все прочие зачатки органов в ходе нормального развития дифференцируются в орган лишь одного типа. Например, зачаток легкого может дать начало только легкому, а зачаток печени — только печени. Что же касается зачатка гонады, то он в норме обладает способностью развиваться в двух направлениях: в результате дифференцировки он может превратиться либо в семенник, либо в яичник. Тип дифференцировки, избранный зачатком, детерминирует будущее половое развитие организма. Прежде чем этот выбор будет сделан, гонада млекопитающих некоторое время находится в индифферентной стадии, когда у нее не выражены ни женские, ни мужские признаки. У человека зачаток гонады появляется в промежуточной мезодерме на четвертой неделе развития и сохраняет половую неопределенность до седьмой недели. В течение этой индифферентной стадии эпителий полового валика пролиферирует в лежащую над ним рыхлую соединительную мезенхимную ткань. Эти эпителиальные слои формируют первичные половые тяжи, которые будут окружать первичные половые клетки, мигрирующие в гонады на шестой неделе. И в XX-, и в XY-гонадах половые тяжи остаются связанными с поверхностным эпителием.

Если генотип плода - XY, то первичные половые тяжи продолжают пролиферировать в течение восьмой недели, глубоко внедряясь в соединительную ткань. Эти тяжи сливаются, образуя сеть

внутренних (медуллярных) половых тяжей, а на дистальном конце формируется более тонкая сеть семенника. Со временем тяжи семенника утрачивают связь с поверхностным эпителием и отделяются от него толстым внеклеточным матриксом — белочной оболочкой. Таким образом, половые клетки оказываются в тяжах внутри семенника. В течение плодной жизни и в детстве эти тяжи остаются плотными. Однако во время полового созревания в них появляется полость, и они превращаются в семенные канальцы, а первичные половые клетки приступают к сперматогенезу. Спермии транспортируются из семенника через сеть семенника в семявыносящие канальцы, которые, являясь остатками мезонефрической почки, связывают семенники с вольфовым каналом. Последний служит собирающим каналом мезонефроса. У самцов вольфов канал дифференцируется в *vas deferens* — проток, через который сперма проходит в уретру и выводится наружу. Тем временем в процессе развития плода интерстициальные мезенхимные клетки семенника дифференцируются в клетки Лейдига, продуцирующие тестостерон. Клетки тяжей семенника дифференцируются в клетки Сертоли, питающие сперматогенные клетки и секретирующие антимюллеровский гормон.

У самок половые клетки располагаются на наружной поверхности гонады. В отличие от мужских половых тяжей, сохраняющих пролиферативную активность, первичные половые тяжи XX-гонад дегенерируют. Однако эпителий вскоре продуцирует новый набор половых тяжей, которые в мезенхиму не проникают, а остаются на наружной поверхности (кортексе) органа. Поэтому они называются кортикальными половыми тяжами. Эти тяжи распадаются на кластеры, причем каждый кластер окружает одну или несколько первичных половых клеток. Первичная половая клетка станет яйцом, а окружающие ее эпителиальные половые тяжи дифференцируются в клетки гранулезы. Мезенхимные клетки яичника дифференцируются в клетки теки. Вместе клетки теки и клубочка образуют фолликулы,

которые одевают половые клетки и секретируют стероидные гормоны. Каждый фолликул содержит единственную половую клетку. У самок мюллеров канал сохраняется и дифференцируется в яйцеводы, матку, шейку матки и верхнюю часть влагалища; вольфов канал в отсутствие тестостерона дегенерирует.

1.7.3. Хромосомная детерминация пола у млекопитающих

Детерминация пола у млекопитающих является строго хромосомной и обычно не зависит от окружающих условий. В большинстве случаев в генотипе самок содержатся две Х-хромосомы, а в генотипе самцов — ХУ. У-хромосома служит решающим наследственным фактором, который определяет пол у млекопитающих. Даже в том случае, когда особь имеет пять Х-хромосом и одну У-хромосому, она будет мужской. Если же особь имеет одну единственную Х-хромосому без У-хромосомы, то она будет женской.

Мутации. В человеческой популяции имеются и мужчины ХХ (примерно один из 20000 мужчин) и женщины ХУ. Результаты экспериментов по гибридизации ДНК показали, что у мужчин ХХ У-специфическая ДНК из определенной области У-хромосомы транслоцирована в одну из их хромосом. Более того, у всех исследованных женщин ХУ этот участок У-хромосомы отсутствовал.

Правила Джоста. Когда Джост (1953) удалял еще недифференцированные гонады у плода кролика, то независимо от генотипа (ХХ или ХУ) развившаяся особь всегда оказывалась женской. Все подопытные кролики имели яйцеводы, матки, влагалища и были лишены мужских половых органов. В отсутствие гонад развитие идет по женскому пути. Следовательно, определение пола у млекопитающих зависит от какого-то продукта У-хромосомы или ею регулируется.

На основании этих опытов Джоста и последующих были сформулированы 2 правила детерминации пола млекопитающих:

1) специализация развивающихся гонад в семенник (тестис) или яичник определяет последующую половую дифференцировку эмбриона. Гонады самцов — семенники — секретируют эффе́ктор (тестостерон), ответственный за маскулинизацию плодов. На основе этих опытов было также предсказано наличие второго эффе́ктора — антимюллеровского гормона, непосредственно контролирующего такие анатомические преобразования.

2) Y-хромосома несет генетическую информацию, требуемую для детерминации пола у самцов.

Комбинацию этих двух правил часто называют принципом Джоста: хромосомное определение пола, связанное с присутствием или отсутствием Y-хромосомы, детерминирует дифференциацию эмбриональной гонады, которая в свою очередь контролирует фенотипический пол организма. Подобный механизм определения пола называют генетическим и противопоставляют таковому, основанному на контролирующей роли факторов внешней среды или на соотношении половых хромосом и аутосом.

Особенности строения Y-хромосомы. Половые X- и Y-хромосомы млекопитающих возникли из пары идентичных аутосом примерно 240-300 млн. лет тому назад, после обособления эволюционной ветви, ведущей к млекопитающим. Свидетельством общности являются 19 общих анцестральных генов. Позднее, 130-170 млн. лет назад, когда разошлись Первозвери и Настоящие звери, в Y-хромосоме возник ген SRY, который, как мы увидим, стал ключевым в детерминации пола у высших млекопитающих. Кроме того, Y-хромосома характеризуется целым рядом специфических черт, отличающих ее от других хромосом набора:

- обедненность генами;
- обогащенность повторяющимися блоками нуклеотидов и, в частности, многократно tandemно повторяющимися (сателлитная ДНК); присутствие значительных гетерохроматиновых районов;
- наличие области гомологии с X-хромосомой —

псевдоаутосомной области (PAR).

Y-хромосома, как правило, не велика: 2-3 % гаплоидного генома. Тем не менее, кодирующей способности ее ДНК у человека, например, достаточно, по крайней мере, для нескольких тысяч генов. Однако в действительности у человека в Y-хромосоме выявлено всего около 40 обогащенных СС-парами так называемых СрС-островков, фланкирующих обычно большинство генов. Реальный список связанных с этой хромосомой генетических функций вдвое меньше. Ее фенотипическое влияние ограничено у мышей весом семенников, уровнем тестостерона, серологического Н-Y-антигена, чувствительностью органов к андрогенам и сексуальным поведением. Обращает на себя внимание и тот факт, что большая часть генов этой хромосомы имеет X-хромосомные аналоги. Это касается и генов, непосредственно вовлекаемых в определение пола.

Фактор, детерминирующий семенники (testis determining factor, TDF), был идентифицирован как ген и получил название Sry (sex determining region of Y gene). Он кодирует белок, образующий «цинковые пальцы» и обладающий ДНК-связывающей активностью, а потому рассматриваемый как фактор регуляции транскрипции. Ген Sry расположен в детерминирующей пол области Y-хромосомы, и кодирует белок размером 79 аминокислотных остатков. Его активность была обнаружена накануне периода дифференцировки прогонады в семенник (от 10 до 12,5-го дня эмбрионального развития у мыши). Точковые мутации или деления в консервативном домене (HMG-боксе) этого гена могут приводить к инверсии пола. Перенос фрагмента ДНК размером 14 кб, содержащего этот ген с фланкирующими участками, в оплодотворенную яйцеклетку гомогаметной мыши с помощью микроинъекции приводит к появлению «самца» с XX-кариотипом. У последнего, однако, наблюдается дефектный сперматогенез.

На этой стадии происходит первичная детерминация пола, которая включает формирование либо семенников, либо яичников из

недифференцированной ткани гонады. Однако это еще не приводит к развитию полового фенотипа. Вторичная детерминация пола — это развитие женского или мужского фенотипов, обусловленное гормонами, которые вырабатывают яичники или семенники. И женская, и мужская детерминация пола включает два главных временных компонента. Первый из них реализуется в период органогенеза, второй — в юношеский период.

Как говорилось ранее, в отсутствие гонад возникает женский фенотип. Происходит развитие мюллеровых каналов и редукция вольфова. Формирование мужского фенотипа связано с секрецией тестикулярных гормонов, обуславливающих развитие вольфова канала и атрофию мюллера. Первым начинает секретироваться — антимюллеровский гормон (АМГ). Этот белковый по своей природе гормон, секретируемый клетками Сертоли (поддерживающие клетки), вызывает дегенерацию мюллера канала. Чувствительность мюллера канала к этому гормону сохраняется в течение короткого периода времени, и семенники прекращают секрецию этого фактора незадолго перед рождением.

Второй гормон представляет собой стероид тестостерон, вырабатываемый клетками Лейдига (стероидогенные клетки). Этот гормон обуславливает дифференцировку вольфова канала в придаток семенника, семявыносящий канал и семенные пузырьки; из мочеполювого бугорка под воздействием тестостерона развивается мошонка и половой член. Т. е. он приводит к маскулинизации плода, одновременно стимулируя редукцию зачатков молочных желез, которые развиваются первоначально у особей обоих полов.

Однако процесс детерминации пола, как и другие морфогенетические события, контролируются генетически на многих уровнях. Показано, в частности, существование генов, модифицирующих эффект гена SRY-1. Замечены, в частности, различия в росте гонад самцов и самок: первые растут быстрее и этот более быстрый рост контролируется геном Gdy (growth and

development), который расположен на Y-хромосомы мышей.

Наряду с системой формирования семенников из потенциально бисексуальных прогонад у млекопитающих участвуют и другие гены. Для появления клеток Сертоли, семявыносящих канальцев, клеток Лейдига и др. требуется взаимодействие целого ряда аутосомных и сцепленных с X-хромосомой факторов.

Можно выделить три основных этапа детерминации пола у высших (плацентарных) млекопитающих: закладка индифферентной гонады; детерминация пола гонады и ее первичная дифференцировка; гормонзависимая фаза дифференцировки пола. Первый этап связан с активностью генов WT1 (Wilmstumor 1) и SF1 (steroidogenic factor 1). Ген WT1, находящийся у человека на 11-ой хромосоме, отвечает за возникновение одной из форм детского рака, его нуль-мутация приводит к полному недоразвитию почек и гонад. SF1 кодирует орфан, ключевой регулятор ферментов, участвующих в образовании половых гормонов. При его нуль-мутации развитие гонад нарушается и они дегенерируют. Позднее его экспрессия продолжается в зачатке семенника. Одной из его мишеней является ген антимюллеровского фактора.

Второй этап – детерминация пола гонады – обусловлен активностью генов SRY (sex determining region of the Y) и DAX1 (DSS-AHC critical region of the X). Об SRY было написано выше. Одним из генов, который находится под контролем SRY, является ген Sox-9 (SRY-box related 9), он экспрессируется в клетках полового гребня после SRY. При мутациях по этому геному нарушается нормальное развитие скелета и происходит реверсия пола. Кроме этого, обнаружены гены аутосом, находящиеся под контролем гена SRY. Например, гены Tda (testis determining autosomal gene) и Tas (Testis associated sex reversal gene) являются необходимыми для правильного развития семенников, при их мутациях может происходить реверсия пола. Для правильного образования яичников тоже необходимо участие различных генов. Важную роль в

детерминации женского пола у млекопитающих играет расположенный в коротком плече X-хромосомы локус DSS (dosage sensitive sex reversal), который находится в области АНС (делеции в этой области вызывают синдром гипоплазии надпочечников - АНС, adrenal hypoplasia congenital). Эти нарушения оказались связанными с мутациями в гене DAX1 (DSS-АНС critical region of the X). Оказалось, что избыточное количество белка DAX1 (при дупликации этого района) подавляет действие белка SRY и ведет к формированию женских особей с генотипом XY. Было выявлено, что белок DAX1 относится к семейству ядерных рецепторов гормонов. На ранних этапах развития он экспрессируется в клетках полового гребня у зародышей обоих полов. Позднее, когда начинается экспрессироваться SRY, его экспрессия прекращается, но продолжается у зародышей женского фенотипа. Критическое значение для развития яичника играет также аутосомный ген Wnt4a. Вероятно, он подавляет экспрессию тестостерона и антимюллеровского гормона, так как при его мутациях эти гормоны экспрессируются, что приводит к формированию мужского фенотипа.

1.8. ПРОГРАММЫ РАЗВИТИЯ

В основе морфогенетических процессов лежат сложные, разветвленные генетические системы, управляющие развитием. В ходе развития происходит не просто последовательное включение все новых и новых генов по принципу «передачи эстафетной палочки». Возникающие сигнальные молекулы активируют или ингибируют процессы транскрипции в клетках, благодаря чему у зародыша возникает строго закономерный паттерн экспрессии генов. Единое вначале пространство зародыша или зачатка со временем подразделяется на все более мелкие подпространства, каждое из которых дает начало определенной области зародыша. Относительно гомогенный характер первоначального распределения сигнальных молекул в области эмбрионального поля сменяется гетерогенным

паттерном экспрессии генов, неоднородность этого паттерна в ходе эмбриогенеза нарастает. Взаимодействуя друг с другом, системы генов создают в трехмерном пространстве зародыша динамически меняющуюся позиционную информацию, в соответствии с которой происходят детерминация и дифференцировка клеток, осуществляются морфогенезы. Генетические системы, обеспечивающие эти процессы, исследованы в настоящее время недостаточно полно. Относительно хорошо изученным примером системы генов, активность которых управляет сложным морфогенетическим процессом, может служить комплекс генов, осуществляющих сегментацию тела личинки и их последующую спецификацию (см. раздел 1.4.2), а также комплекс генов, участвующих в морфогенезе конечности у позвоночных.

Морфогенез конечности у позвоночных

Конечности тстрапод подразделяются на три основных отдела. Прилегающий к телу проксимальный отдел, или стилоподий имеет один элемент скелета — плечевую кость в передней или бедренную кость в задней конечности. Средний отдел — зигоподий состоит из двух костей — локтевой и лучевой в передней конечности, большой и малой берцовой — в задней. Дистальный отдел, или аутоподий (в передней конечности кисть, в задней — стопа) подразделяется на базиподий (соответственно, запястье или предплюсна), метаподий (пять или плюсна) и акроподий (пальцы). Кроме проксимодистальной оси в конечности различают дорсо-вентральную и передне-заднюю оси.

Морфогенетическое поле конечности. На стадии нейрулы амфибий выявлены поля детерминации глаза, слухового пузырька, носовой ямки, хрусталика, сердца, жабр, а также поля конечностей. Морфогенетическое поле представляет собой совокупность клеток, детерминированную как целостный зачаток органа. Зоны, детерминированные как поля конечностей, образуются задолго до

появления морфологических признаков конечностей. В пределах поля все его участки способны к образованию конечности. С момента своего возникновения поле анизотропно: оно поляризовано вдоль передне-задней, а позднее и по дорсо-вентральной оси. Было выявлено, что детерминирована и скорость роста конечности. Местоположение полей, а затем и зачатков конечностей определяется экспрессией *Нох*-генов, хотя конкретные молекулярные механизмы локализации полей в настоящее время не известны. В латеральной мезодермальной пластинке куриного эмбриона иницируется локальная экспрессия фактора роста фибробластов Fgf-10, который предопределяет активность генов семейства *tbx*. В области экспрессии гена *tbx5* у зародышей курицы и мыши закладывается поле передней конечности, а в области экспрессии генов *tbx4* и *pitx1* — задней. Полагают, что у амфибий для индукции и поддержания роста передней конечности необходима совместная экспрессия по крайней мере трех генов — *tbx5*, *wnt2b*, *fgf10*, а для задней — *tbx4*, *wnt8c*, *fgf 10*.

Появление морфологически обособленного зачатка конечности сопровождается регионализацией поля, которое по мере развития подразделяется на отдельные субзоны — зачатки элементов конечности.

Почка конечности. Зачаток, или почка конечности образуется в результате скоординированных во времени и пространстве событий, из которых главными являются миграция клеток мезенхимы и их пролиферация, а также изгибание эктодермы. Мезенхима, выселяющаяся из латеральной мезодермальной пластинки, в ходе дифференциации конечности образует элементы скелета, мезенхима из миотомов сомитов даст мышечные элементы, а из нервного гребня — соединительную ткань. В почке конечности выделяются три области, активность которых имеет решающее значение для формирования трехмерной структуры конечности, т.е. для спецификации дорсо-вентральной, проксимодистальной и передне-

задней осей. Среди них: *апикальный эктодермальный гребень*, лежащая под ним в дистальной части зачатка *транзитная зона* и расположенная на заднем краю почки *зона поляризующей активности*.

Апикальный эктодермальный гребень (АЭГ). Спецификация зоны АЭГ происходит на стадии, предшествующей образованию почки конечности, когда под влиянием сигналов, исходящих из осевой, промежуточной и латеральной мезодермы, в эктодерме морфогенетического поля конечности начинается экспрессия генов, предопределяющих дорсальную и вентральную судьбу покровов будущей конечности. В области, примыкающей к осевому комплексу, в эктодерме инициируется экспрессия гена *wnt7a*, которая предопределяет образование дорсальной стороны конечности. Латеральнее, примерно на уровне париетального листка мезодермы в пределах морфогенетического поля конечности в эктодерме экспрессируется ген *engrailed 1 (en 1)*, что ведет к спецификации вентральной стороны конечности. У куриного эмбриона между зонами экспрессии *wnt7a* и *en 1* остается узкая полоска, шириной около 150 мкм. Именно эта зона после изгибания эктодермы и образования почки конечности дает область, в которой формируется столбчатый эпителий апикального гребня. В клетках АЭГ происходит экспрессия гена *msx2* (muscle segment homeobox), что стимулирует пролиферацию в подлежащей мезенхиме. Высоким уровень пролиферации в мезенхиме дистальной области почки конечности поддерживается достаточно сложной молекулярной системой, в которой участвуют разнообразные факторы роста фибробластов.

Транзитная зона. Как полагают, основная функция АЭГ состоит в поддержании высокого пролиферативного статуса мезенхимы транзитной зоны. Для объяснения спецификации проксимодистальной оси конечности предложены модели транзитной зоны и ранней спецификации и растяжения зачатков. Согласно модели транзитной зоны, выходящие из этой области клетки

последовательно формируют зону стилоподия, зигоподия и, наконец, аутоподия, и спецификация этих областей зависит от времени пребывания клеток в зоне интенсивной пролиферации: чем меньше времени клетки находятся в транзитной зоне, тем более проксимальные элементы конечности они формируют. Более тщательные исследования не подтвердили, однако, перемещения клеток из дистальной области почки конечности. Согласно другой модели, в период закладки почки конечности специфицируются одновременно все три области конечности, по мере роста которой происходит их растяжение вдоль продольной оси конечности. Окончательное решение проблемы еще не найдено.

В развитии конечности различаются три фазы, каждая из которых связана с детерминацией соответственно стилоподия, зигоподия и аутоподия. У мыши первая фаза характеризуется экспрессией генов *hoxd9* и *hoxdl0*, которая охватывает всю почку в целом. Во второй фазе паттерн экспрессии имеет колинеарный характер. Ген *hoxd9* экспрессируется во всей почке конечности от ее передней до задней границы. Передняя граница экспрессии гена *hoxdl0* сдвинута назад. Еще несколько отступя назад проходит граница экспрессии гена *hoxdll*. Затем идет граница экспрессии гена *hoxd12*, и, наконец, ген *hoxd13* экспрессируется в самой задней части почки конечности. Таким образом, во второй фазе формирования конечности устанавливается гнездовой паттерн экспрессии *hoxd*-генов: в задней области представлены транскрипты всех пяти экспрессирующихся в конечности генов (*hoxd9* — *hoxdl3*). Далее вперед расположена зона экспрессии генов *hoxd9* — *hoxd12*. Затем идет полоска, в которой имеются транскрипты лишь трех генов *hoxd9* — *hoxdll*. В следующей, сдвинутой в переднем направлении зоне экспрессируются гены *hoxd9* и *hoxdl0*. И, наконец, в передней области конечности экспрессируется лишь один ген — *hoxd9*. Третья фаза характеризуется экспрессией более «задних» генов, которые лежат в 5' области кластера. В дистальной части конечности начинает повсеместно

экспрессироваться *hoxa13*. несколько отступя назад проходит граница экспрессии гена *hoxd13*, тогда как в задней дистальной области сохраняется экспрессия генов *hoxd10* — *hoxd13*.

Зона поляризующей активности (ЗПА). Роль этой зоны, расположенной на заднем крае ранней почки конечности, в установлении передне-задней оси конечности была показана экспериментально. Трансплантация ЗПА на передний край конечности приводила к зеркальной дупликации пальцев, и первоначально думали, что ЗПА является источником морфогена, образующим заднепередний градиент. Предполагалось, что в качестве морфогена в ЗПА выступает ротиновая кислота. Позднее было выяснено, что ключевым событием, определяющим свойства ЗПА, является включение экспрессии гена *sonic hedgehog (shh)*. С помощью вирусного вектора, содержащего ген *shh*, были трансфицированы фибробласты куриного эмбриона, которые затем имплантировали на передний край почки конечности. Появление эктопического источника белка Shh вызывало изменение полярности конечности, свидетельством чему была зеркальная дупликация пальцев.

Последовательность событий, связанных со спецификацией передне-задней оси, в настоящее время представляется следующим образом: экспрессия *shh* инициирует активность фактора Gremlin, который блокирует белки BMP, в результате чего начинают функционировать фибробластические факторы роста. ФРФ, диффундируя из зоны поляризующей активности, создают заднепередний градиент, который, вероятно, служит причиной дифференциальной активности генов *hoxd*-кластера, наблюдаемой во второй фазе развития конечности. Участие *hoxd*-генов в формировании передне-задней оси является весьма древним механизмом регионализации конечности, который возник у рыб, задолго до появления четвероногих позвоночных.

Нельзя не обратить внимания на то, что у хвостатых амфибий закладка пальцев происходит отдельно, в виде почек, образующихся

последовательно в передне-заднем направлении, и предваряется интенсивной экспрессией генов *tbx4* и *tbx5*. Этот способ формирования пальцев резко отличается от механизма, характерного для других позвоночных, у которых все пальцы закладываются одновременно и промежутки между пальцами образуются путем апоптоза.

Задания для самоконтроля к главе 1

1. Особенности организации про- и эукариот.
2. Биологическая роль полового процесса.
3. Основные стадии онтогенеза.
4. Типы развития многоклеточных животных.
5. Оплодотворение, дробление, гастрюляция, гисто- и органогенез: в чём заключается сущность каждого периода?
6. Формирование пространственной организации.
7. Молекулярно-генетические основы детерминации пола.
8. Сравните гастрюляцию у морского ежа и у млекопитающих.
9. Основные положения гипотезы дифференциальной экспрессии генов.
10. Регуляция экспрессии генов в процессе развития эукариот.
11. Трансляционная и посттрансляционная регуляция процессов развития.
12. Клеточные взаимодействия в развитии. Роль внеклеточного матрикса в процессах морфогенеза.
13. Понятие о детерминации и дифференцировке.
14. Формирование дифференцированного состояния клетки.

2. ПРЕДЗАРОДЫШЕВОЕ И РАННЕЕ ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

2.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗВИТИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Особенности размножения плацентарных млекопитающих связаны с внутриутробным развитием и живорождением. Самые древние и примитивные млекопитающие — клоачные (ехидна и утконос) откладывают яйца и, в целом, их эмбриональное развитие сходно с эмбриогенезом рептилий. Сумчатые — (каменная куница, сумчатый волк, кенгуру) уже живородящие животные. У них эмбрион развивается внутри организма матери, принимающего ограниченное участие в обеспечении растущего зародыша кислородом и питательными веществами. У плацентарных, к числу которых относится подавляющее большинство млекопитающих, включая человека, механизмы обеспечения внутриутробного развития зародыша достигают совершенства. Название «плацентарные» происходит от названия особого провизорного органа — плаценты, который формируется во время беременности в матке из тканей зародыша и матери. Через плаценту осуществляется связь зародыша с материнским организмом, что позволяет последнему снабжать эмбрион питательными веществами и кислородом, а также осуществлять по отношению к нему выделительную, защитную и регуляторную функцию.

Возникновение тесной функциональной связи между матерью и плодом в период внутриутробного развития оказало влияние на ранние этапы эмбрионального развития млекопитающих, вызвав появление ряда особенностей.

Во время оогенеза не происходит накопления в яйцеклетке большого запаса питательных веществ, который был бы достаточным для поддержания развития организма вплоть до самого рождения.

Яйцеклетки млекопитающих мелкие, в среднем их диаметр составляет 100–200 мкм (для сравнения: яйцеклетки шпорцевой лягушки имеют диаметр 1,2–1,5 мм). Они почти лишены желтка, поэтому их относят к олиголецитальным яйцеклеткам.

У млекопитающих происходит ранняя активация экспрессии эмбриональных генов. Поскольку накопленного в яйце запаса биологически активных молекул достаточно лишь для осуществления 7–10 делений дробления, то начало синтеза генопродуктов эмбрионального происхождения необходимо для поддержания дальнейшего развития зародыша.

Для зародышей млекопитающих характерна ранняя первичная цитодифференцировка. Уже в составе 32-клеточного эмбриона можно видеть клетки, принадлежащие к двум разным клеточным линиям. Клетки первой из них в дальнейшем будут участвовать в формировании эмбриона и ряда внезародышевых оболочек, клетки второй — дадут начало эмбриональной части плаценты.

Развитие млекопитающих делят на следующие периоды:

1. Предзародышевый период или прогенез. Данный период включает в себя процессы, предшествующие оплодотворению и завершается в момент слияния родительских половых клеток. К числу таких процессов относят возникновение первичных половых клеток и гаметогенез — становление структурно-функциональной организации ооцитов и сперматозоидов.

2. Онтогенез, или индивидуальное развитие организма. Онтогенез начинается с момента оплодотворения и формирования одноклеточного зародыша — зиготы и продолжается до смерти организма. Онтогенез, в свою очередь, делят на несколько периодов

Внутриутробный, или эмбриональный, период длится от оплодотворения до рождения. Он включает в себя:

- **доимплантационный** период развития, который начинается от момента оплодотворения и завершается имплантацией — вращанием зародыша в эпителиальный слой стенки матки

- *постимплантационный* период, который начинается имплантацией зародыша и завершается рождением новой особи

Внеутробный, или **постэмбриональный** период начинается со времени рождения и длится до смерти организма.

В данном разделе пособия будут подробно рассмотрены события, происходящие в течение предзародышевого и доимплантационного периодов развития млекопитающих.

2.2. СТРОЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

2.2.1. Мужская половая система

К органам мужской половой системы (рис.2.1) относят парные половые железы – **семенники**, и добавочные органы – семявыносящие пути, половой член, добавочные железы.

Семенники выполняют генеративную и эндокринную функции: в них развиваются мужские половые клетки и происходит синтез мужского полового гормона — **тестостерона**.

Снаружи каждый семенник покрыт серозной и соединительнотканной оболочками. На заднем конце семенника оболочка утолщается, образуя средостение, от которого вглубь половой железы отходят соединительнотканые перегородки, разделяющие семенник на дольки. Число долек может достигать до 250. В каждой дольке находится до 4 **извитых канальцев**. Такой каналец имеет диаметр 150-250 мкм и длину 30-80 см. На выходе из дольки канальцы сливаются и в средостении формируют сеть семенника. Из этой сети берет начало система семявыносящих протоков.

Внутреннюю выстилку извитого канальца образует **сперматогенный эпителий**, содержащий в своем составе мужские половые клетки, которые находятся на разных стадиях развития.

Между петлями извитых канальцев в соединительной ткани

семенника располагаются крупные **клетки Лейдига**, синтезирующие мужской половой гормон — **тестостерон**.

Репродуктивную и эндокринную функции семенников регулируют аденогипофизарные гонадотропины — **фоллитропин (фолликулстимулирующий гормон, ФСГ)** и **лютропин (лютеинизирующий гормон, ЛГ)**. ФСГ регулирует преимущественно репродуктивную функцию семенников, а ЛГ — эндокринную, однако большое значение имеет также и соотношение гормонов при их сочетанном действии.

Семявыносящие пути начинаются придатком семенника (**эпидидимисом**). Эпителиальная выстилка эпидидимиса секретирует специфический секрет (гликокаликс), и он покрывает все сперматозоиды, проходящие через придаток семенника. Такой защитный слой предотвращает иммунные реакции на сперму при её попадании в женский организм, но лишает спермии способности оплодотворить яйцеклетку. Если в дальнейшем они попадут в женский репродуктивный тракт, то гликокаликс будет удален с поверхности спермиев, после чего мужские гаметы приобретут оплодотворяющую способность.

Проток придатка семенника переходит в семявыносящий проток и далее — в семяизвергающий проток, который открывается в мочеиспускательный канал. Мочеиспускательный канал проходит внутри полового члена. Основную часть объема этого копулятивного органа занимают пещеристые тела. Заполняясь кровью, они обеспечивают эрекцию. Эрекция является механизмом, обеспечивающим внутреннее оплодотворение, так как гарантирует доставку спермы непосредственно в половые пути самки, исключая контакт спермиев с неблагоприятной для них внешней средой.

К добавочным железам мужской половой системы относятся парные семенные пузырьки, предстательная железа и бульбоуретральные железы. Семенные пузырьки синтезируют богатый фруктозой жидкий слизистый секрет со слабощелочной

реакцией. Он выделяется в семявыносящий канал, где смешивается со спермой, нейтрализует и разжижает её. Изменение кислотности среды приводит к появлению у спермиев двигательной активности, а фруктоза используется ими в качестве источника энергии при движении.

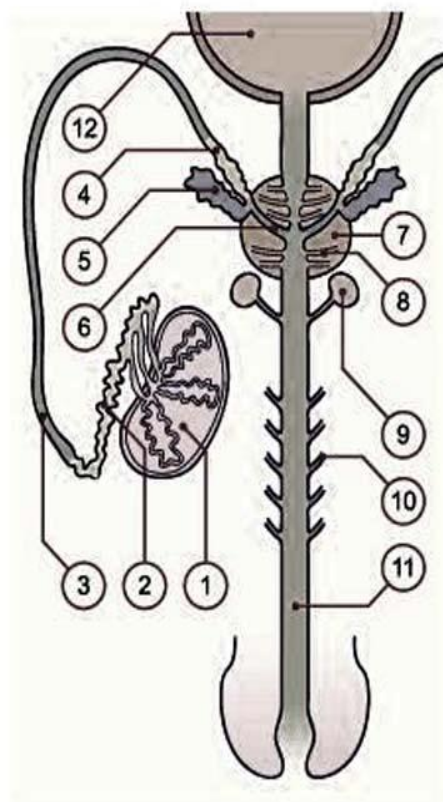


Рис. 2.1. Мужская половая система
(Human Embriology online, с изменениями)

- 1 – семенник, 2 – придаток семенника, 3 – семявыводящий канал,
4 – ампула семявыводящего канала, 5 – семенные пузырьки,
6 – устье семявыводящего канала, 7 – простата, 8 – экскреторная часть
простаты, бульбоуретральные железы, 10 – железы уретры, 11 – уретра,
12 – мочевого пузырь

Предстательная железа (простата) охватывает верхнюю часть мочеиспускательного канала, куда и открываются протоки многочисленных простатических желёзок. Секрет, вырабатываемый простатой, по характеру действия сходен с секретом семенных пузырьков, но имеет более сложный состав, в который входят

144

иммуноглобулины, ферменты, витамины, ионы цинка. Протоки бульбоуретральных (куперовых) желез открываются также в верхнюю часть мочеиспускательного канала. Слизистый секрет этих желез входит в состав эякулята — смеси сперматозоидов и семенной жидкости, которая выделяется во время полового акта.

2.2.2. Женская половая система

Женская половая система (рис.2.2) состоит из парных половых желез — **яичников** и добавочных органов полового тракта — **парных яйцеводов (маточных или фаллопиевых труб)**, а также непарных **матки и влагалища**.

Яичники выполняют генеративную функцию (образование женских половых клеток — ооцитов) и эндокринную (синтез женских половых гормонов эстрогенов).

Яичник половозрелой самки покрыт соединительнотканной оболочкой, под которой расположено корковое вещество, и еще глубже — мозговое вещество. Последнее выполняет структурную функцию, а также обеспечивает кровоснабжение и иннервацию яичника. Корковое вещество образовано многочисленными **фолликулами**, окруженными соединительной тканью. Каждый фолликул является устойчивым клеточным комплексом, в состав которого входит ооцит и функционально связанные с ним соматические клетки. Соматическим компонентом фолликула являются клетки **фолликулярного эпителия** яичника. Они выполняют разнообразные функции, в частности, синтезируют женские половые гормоны **эстрогены** и так называемый «гормон беременности» **прогестерон**.

В составе коркового слоя яичника половозрелой самки можно обнаружить фолликулы, находящиеся на разных стадиях развития, поскольку с началом полового созревания под действием половых гормонов в яичнике инициируется **фолликулярный цикл** — ритмическое повторение роста и усложнения структуры фолликулов,

сопровождающееся ростом и созреванием входящих в состав фолликулов ооцитов. Эти процессы будут подробно рассмотрены нами позднее.

Яйцевод (маточную трубу) делят на несколько отделов. К поверхности яичника прилегает **воронка яйцевода**, которая переходит в **ампулу яйцевода** и далее — в сам **яйцевод**, заканчивающийся перешейком, присоединяющимся к телу матки. Готовые к оплодотворению ооциты выходят из яичника и попадают через воронку в ампулу яйцевода. Сюда поднимаются спермии, и здесь происходит оплодотворение. Дробящийся зародыш постепенно спускается по яйцеводу в матку. Изнутри яйцевод выстлан слизистой оболочкой, в составе которой присутствуют реснитчатые и слизистые клетки. Реснитчатые клетки обеспечивают перемещение эмбрионов по направлению к матке. Слизистые клетки выделяют сложный по составу секрет, который создает в маточной трубе среду, необходимую для активации спермиев, успешного оплодотворения и дробления зародыша.

Матка — мышечный орган, предназначенный для внутриутробного развития зародышей. В матке выделяют следующие отделы: **тело матки**, **рога матки** и **шейку матки**. К рогам матки присоединяются нижние части яйцеводов, а шейка матки является нижней частью матки и имеет вид мышечного цилиндра. Матка выстлана **слизистой оболочкой (эндометрием)**, в которой выделяют базальный и функциональный слои. Функциональный слой эндометрия под действием половых гормонов претерпевает регулярную циклическую перестройку по ходу полового цикла, что связано с подготовкой организма к возможной беременности. В состав функционального слоя входят однослойный призматический эпителий и собственная пластинка слизистой оболочки, которая образована рыхлой соединительной тканью. Эндометрий собран в складки, которые называют маточными крестами.

Производным эпителия являются многочисленные **маточные железы**. Совместно с секреторными клетками эпителия они секретируют слизистую маточную жидкость сложного белково-гликопротеинового состава. Компоненты этой жидкости влияют на имплантацию эмбриона в начале беременности, а перед родами обеспечивают расслабление сухожилий и мышц вокруг матки.

Влагалище и наружные половые органы участвуют в половом акте, обеспечивая проникновение спермы в женские половые пути и частично регулируя движение спермиев.

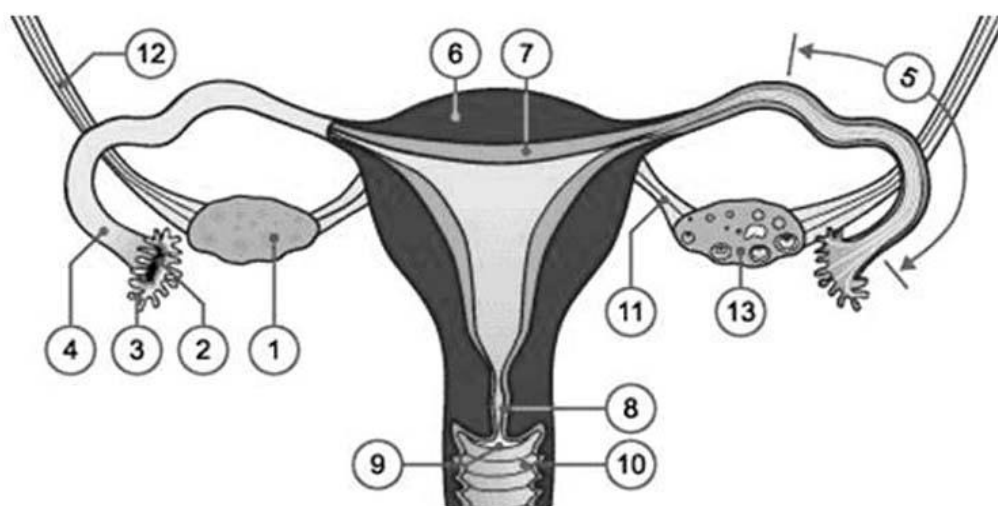


Рис. 2.2. Женская половая система
(Human Embriology online, с изменениями)

- 1 – яичник, 2 – воронка яйцевода, 3 – бахрома воронки,
4 – фаллопиева труба, 5 – ампула яйцевода, 6 – мышечная оболочка матки,
7 – слизистая оболочка матки, 8 – шейка матки, 9 – влагалище,
10 – связки влагалища, 11 – поддерживающие связки яичника,
12 – фолликулы на поперечном срезе яичника

Как и в случае семенников, репродуктивную и эндокринную функции яичников регулируют аденогипофизарные гонадотропины — фолликулстимулирующий (ФСГ) и лютеинизирующий (ЛГ), а также пептидный гормон **ингибин**, вырабатываемый клетками фолликулярного эпителия.

2.3. ПРЕДЗАРОДЫШЕВОЕ РАЗВИТИЕ

2.3.1. Происхождение половых клеток млекопитающих

Высокоспециализированные гаметы — ооциты и сперматозоиды являются потомками соматических клеток-предшественников. Эти клетки получили название **первичных половых клеток (ППК)** или **гоний**. ППК обособляются в отдельную группу уже на ранних этапах эмбриогенеза, задолго до того времени, когда в развивающемся зародыше сформируются зачатки половых желез — **гонад**, а это значит, что первичные половые клетки имеют внегонадное происхождение. Установлено, что в составе **эпибласта** (эмбриональной эктодермы) присутствуют 2-3 клетки, потомками которых будут ППК, однако фенотипически эти клетки пока ничем не выделяются. Позднее они приобретают фенотип, который позволяет идентифицировать ППК на гистологических препаратах. Так, на стадии гастрюляции, в стенке желточного мешка можно наблюдать компактную группу крупных клеток с высокой активностью в них щелочной фосфатазы и высоким содержанием гликогена в цитоплазме.

Примерно с середины стадии гастрюляции ППК начинают мигрировать, чтобы заселить гонады. На первом этапе клетки перемещаются пассивно вместе с клеточными слоями и током крови, в результате чего попадают в заднюю кишку. Здесь гонии приобретают способность к амебоидному движению и начинают перемещаться вдоль кишки, далее — вверх по дорсальному мезентерию вплоть до половых гребней. У мыши в процессе миграции ППК активно пролиферируют, и в результате этого количество клеток пришедших в зачаток гонады превышает количество начавших миграцию клеток в 50-70 раз, однако у человека мигрирующие гонии почти не делятся и их активное размножение начинается уже после заселения в зачаток гонады. Проникают ППК в зачаток гонады, внедряясь между клетками окружающего гонаду

эпителия. Гонады человека заселены первичными половыми клетками уже к 35 суткам развития.

Полагают, что существует система сигналов, направляющих миграцию ППК, однако механизм её действия пока остается неясным. Известно, что в то время пока гонии мигрируют по подлежащим тканям, они подвергаются воздействию растворимых ростовых факторов и компонентов внеклеточного матрикса. Такие воздействия оказывают на ППК двоякое действие. С одной стороны, обеспечивают жизнеспособность клеток, одновременно не позволяя им прекратить миграцию и начать размножаться в неподходящем месте. С другой стороны, указывают клеткам направление движения к формирующимся гонадам, используя хемотаксис или дифферент адгезии. Оказавшись на небольшом расстоянии от зачатка гонады, ППК движутся к нему привлекаемые фактором белковой природы, который выделяет зачаток половой железы. Не все гонии успешно мигрируют, многие сбиваются с пути и позднее их можно обнаружить в составе надпочечников, кишки, кожной эктодермы и других органов.

Далее судьба ППК определяется тем, в каком направлении будет развиваться индифферентный зачаток гонады, в которую они попали. Если зачаток гонады начинает дифференцироваться в семенник, то под действием выделяемых им факторов, ППК перемещаются в мозговой слой железы и приступают к дифференцировке в мужские половые клетки. При развитии гонады в яичник, ППК переместятся в его корковый слой, где позднее сформируются многочисленные фолликулы.

2.3.2. Мейоз

Клеточное деление может осуществляться на основе двух вариантов клеточного цикла. Митоз характерен для пролиферирующих диплоидных соматических клеток. **Мейоз** —

специфический тип клеточного цикла, с помощью которого формируются гаплоидные половые клетки. Мейотическое деление присутствует как в цикле развития мужских гамет (**сперматогенезе**), так и женских (**оогенезе**).

Биологический смысл мейоза заключается в том, что он обеспечивает:

1. уменьшение числа хромосом с диплоидного их набора ($2n$) до гаплоидного (n); редукция числа хромосом достигается тем, что на два цикла клеточного деления приходится только один цикл репликации ДНК;

2. формирование гамет, обладающих уникальным набором генов; достигается это при помощи генетической рекомбинации, которая происходит при обмене участками между гомологичными хромосомами (**кроссинговер**), и случайным распределением гомологичных хромосом отцовского и материнского происхождения между дочерними клетками;

3. точное разделение хромосомного набора на две части.

Мейоз представляет собой два последовательных клеточных цикла, разделенных коротким интеркинезом (рис. 2.3). Первое деление мейоза (мейоз I) является уникальным по своей структуре клеточным циклом, в то время как второе (мейоз II) больше похоже на митоз.

В мейозе I выделяют длительную и сложно организованную профазу I, за которой следуют метафаза I, анафаза I и телофаза I. Продуктом мейоза I являются две гаплоидные клетки. Деления разделяет короткий интеркинез, во время которого синтеза ДНК не происходит. Далее следуют метафаза II, анафаза II, телофаза II и цитокинез, приводящий к формированию четырех гаплоидных клеток. Необходимо учитывать, что оогенный и сперматогенный мейоз имеют целый ряд различий, что связано с особенностями развития женских и мужских гамет. У особей разного пола мейоз

начинается в разное время, при этом оогенный мейоз значительно сложнее и длительнее сперматогенного.

Еще до начала профазы мейоза хромосомы реплицировались на фазе S предшествовавшего началу мейоза митотического цикла, и к началу профазы каждая хромосома состоит из двух сестринских хроматид. Чтобы предотвратить их неправильное расхождение во время мейоза между хроматидами возникает физическая связь. Белки **когезины** связывают сестринские хроматиды в центромерном участке и вдоль плеч хромосом. Теперь сестринские хроматиды будут перемещаться в клетке как единая структура. Как станет понятно позднее, это важно для успешного осуществления первого деления мейоза.

Рассмотрим ядерные события профазы мейоза I. Профазу делят на несколько стадий: **лептотену, зиготену, пахитену и диплотену**.

Лептотена. Хромосомы начинают конденсироваться. Оба конца хромосом прикрепляются к ядерной мембране теломерными участками. Сестринские хроматиды скреплены когезинами.

Зиготена. Гомологичные хромосомы начинают сближаться и располагаются попарно. Начинается **конъюгация** (соединение) хромосом. Механизм конъюгации до конца не ясен. У ряда организмов в составе хромосом обнаружены специфические последовательности, которые служат сайтами связывания хромосом. У других видов формируются двунитевые разрывы ДНК, и далее одна из нитей «мостиком» перекидывается на гомологичную хромосому, связываясь с ней. Когда количество сайтов связывания между хромосомами достигает порогового уровня, к процессу конъюгации подключаются специфические белки. Они начинают формировать сложный мультипротеиновый комплекс, получивший название **синаптонемального комплекса**. К концу зиготены пары гомологичных хромосом полностью конъюгированы. Такую структуру называют **тетрадой**, так как она состоит из четырех хроматид.

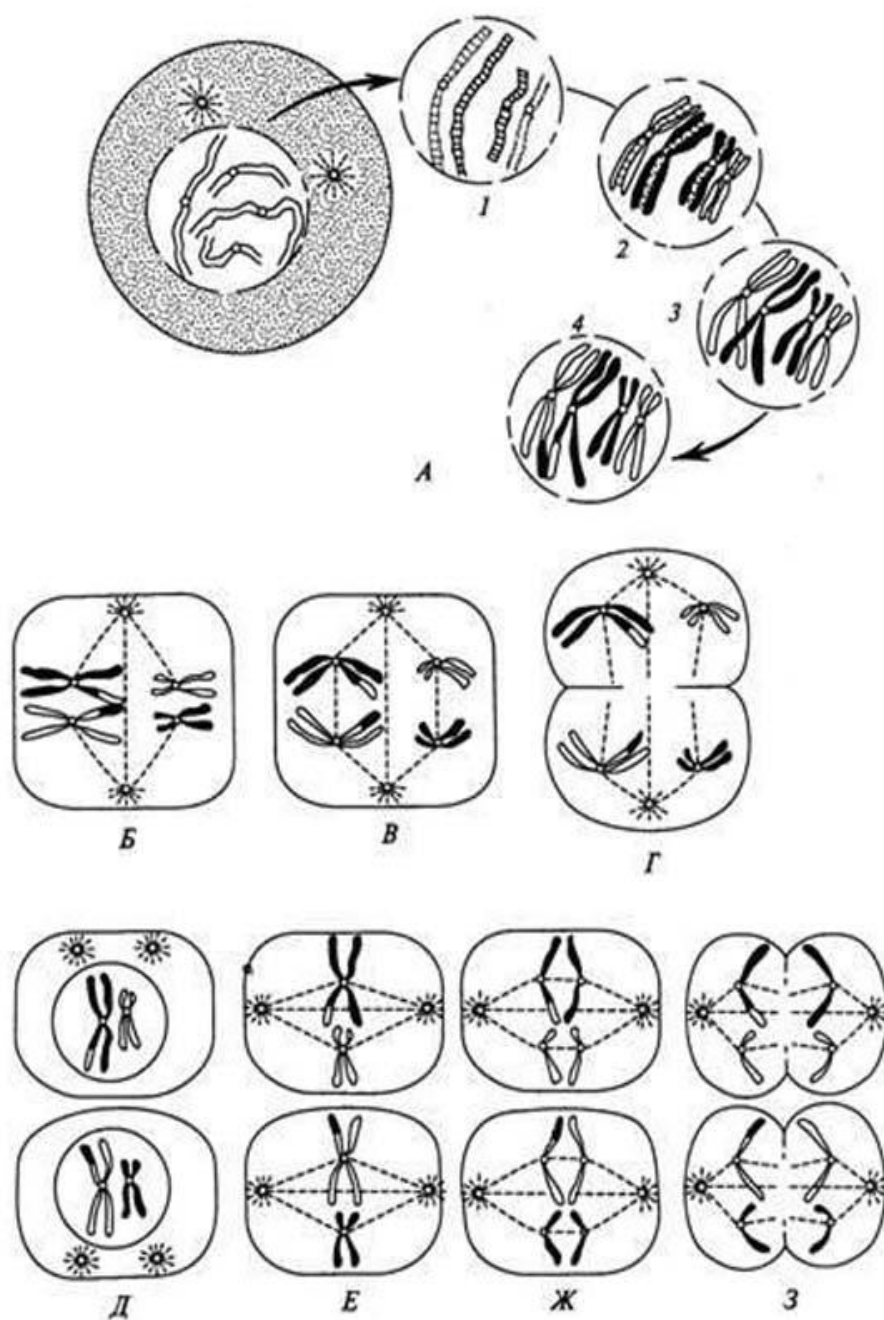


Рис. 2.3. Стадии мейоза (Голиченков и др., 2004):
 А – профазы I (1 – зиготена, 2 – пахитена, 3 – диплотена, 4 – диакинез);
 Б – метафаза I, В – анафаза I, Г – телофаза I, Д – профазы II,
 Е – метафаза II, Ж – анафаза II, З – телофаза II

Пахитена. На этой стадии профазы между гомологичными хромосомами происходит обмен участками (**кроссинговер**). В одной из сестринских хроматид каждой хромосомы образуется однонитевой

разрыв, в то время как другая остается интактной. В месте разрыва происходит ковалентное связывание между несестринскими хроматидами разных хромосом, в результате которого возникает **хиазма**. Хиазма является структурным проявлением межхромосомного обмена. На одной тетраде может образовываться несколько хиазм.

Диплотена. Синаптонемальный комплекс начинает деградировать и освобождать хромосомы, которые постепенно отходят друг от друга и частично деконденсируются. Однако они продолжают быть связаны хиазмами. Хиазмы начинают сдвигаться к концам хромосом.

Профаза первого деления мейоза завершена. Во время метафазы I на веретене деления выстраиваются пары гомологичных хромосом, в которых несестринские хроматиды соединены хиазмами, а сестринские «сшиты» когезинами по всей длине хромосомы. Во время анафазы I происходит разрушение хиазм и разделение гомологичных хромосом. К полюсам клетки расходятся **по одной хромосоме из пары гомологов**. В их состав входят участки, полученные во время кроссинговера. Телофаза I – в клетке сформировались два гаплоидных набора хромосом. Первое деление мейоза завершается цитокинезом, в результате которого появляются две гаплоидные клетки.

Короткий интеркинез не сопровождается синтезом ДНК. Гаплоидные клетки вступают в метафазу II, и на веретене деления выстраиваются гаплоидный набор хромосом, каждая из которых состоит из двух хроматид. Во время анафазы II сестринские хроматиды разделяются вследствие разборки центромеров, и **каждая из хроматид** начинает двигаться к своему полюсу деления.

На телофазе II в каждой клетке присутствует по одной хроматиде от каждой хромосомы. Таким образом, в результате двух последовательных делений мейоза сформировались четыре гаплоидные клетки.

2.3.3. Сперматогенез

Фазы сперматогенеза

Образование мужских половых клеток (**сперматогенез**) проходит в **эпителиосперматогенном (сперматогенном)** слое стенки извитых семенных канальцев семенников половозрелых особей. В сперматогенном слое присутствуют два типа клеток, которые находятся в тесной функциональной связи. Первый представляют половые клетки, находящиеся на различных стадиях дифференцировки, а второй — поддерживающие клетки, или **клетки Сертоли**.

Половая дифференцировка гонад человека происходит на 42-46 сутки, и к этому времени гонады уже содержат ППК. Половые клетки, заселившие гонаду, называют гониями, в данном случае это будут сперматогонии. В течение нескольких суток они активно делятся, в результате чего возникают колонии недифференцированных стволовых клеток, а затем пролиферация сперматогоний прекращается.

Сперматогенез возобновляется после наступления половой зрелости и состоит из 4 фаз: размножение, рост, созревание и формирование.

Фаза размножения. Во время фазы размножения сперматогонии проходят 3-6 циклов митотического деления. В составе сперматогенного эпителия они образуют верхний слой клеток наиболее удаленный от просвета семенного канальца. Сперматогонии представлены клетками двух типов. К первому типу относятся стволовые клетки (сперматогонии типа А-стволовые), ко второму типу — сперматогонии типа А-дифференцирующиеся. Стволовые клетки расположены обособленно от других сперматогоний, морфологически их можно разделить на темные и светлые клетки.

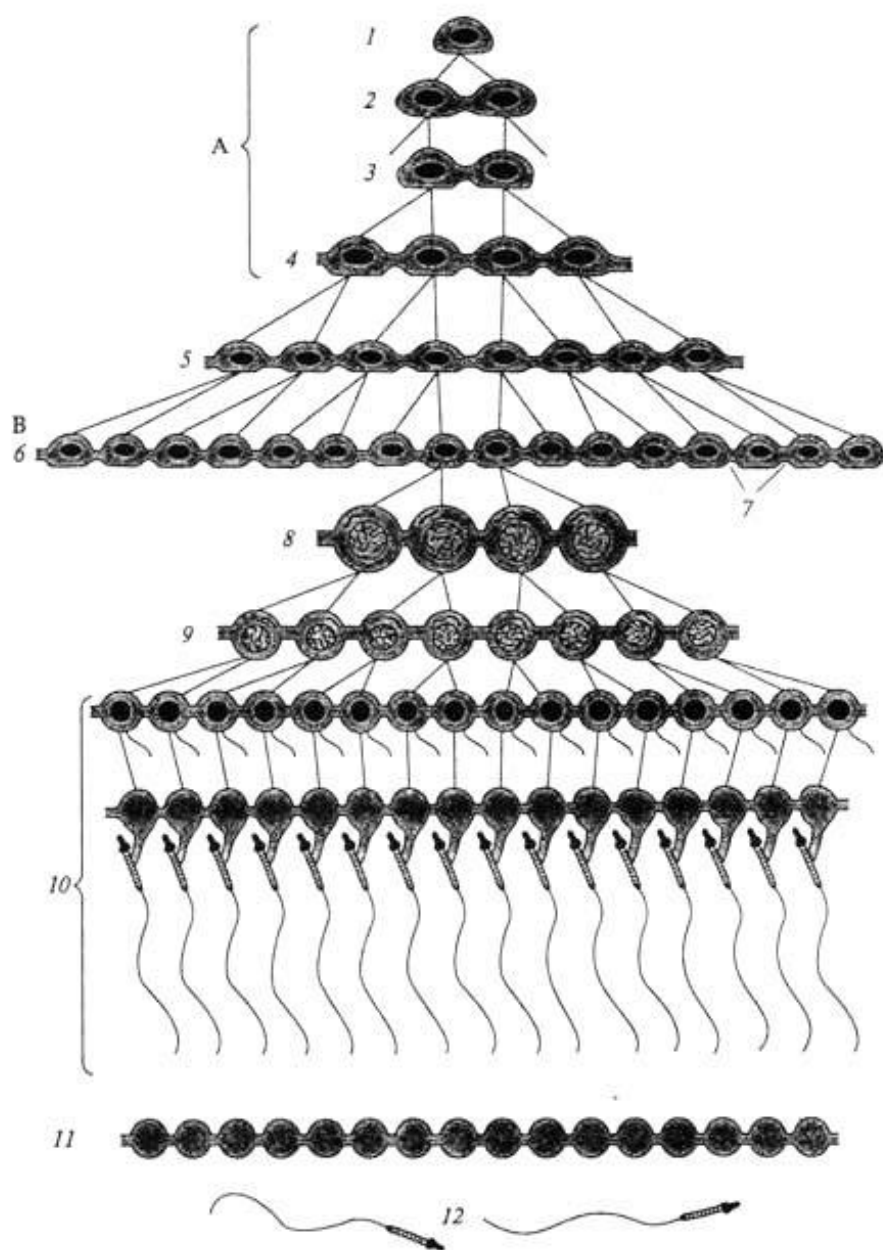


Рис. 2.4. Формирование синцитиального клона мужских половых клеток
(Голиченков и др., 2004)

- 1 – 4 – сперматогонии типов А1-А4; 5 – промежуточные сперматогонии,
6 – сперматогонии типа В, 7 – цитоплазматические мостики,
8 – первичные сперматоциты, 9 – вторичные сперматоциты,
10 – сперматиды, 11 – резидуальные тельца, 12 – сперматозоид

Темные клетки относят к А-стволовым резервным, медленно обновляющимся стволовым клеткам. В нормальных условиях такие клетки делятся редко, только для поддержания численности своей

популяции, но в случае резкого сокращения числа А-сперматогоний обоих типов (интоксикация, авитаминоз, радиоактивное облучение) они начинают активно пролиферировать.

Светлые клетки относят к А-стволовым быстрообновляющимся. Они делятся регулярно и при делении не завершают цитокинез, образуя синцитий (т. е. оставаясь связанными цитоплазматическими мостиками). Такие сперматогонии называют А-спаренными, и их появление является маркером начала дифференцировки мужских половых клеток. Дальнейшая пролиферация А-спаренных сперматогоний приводит к возникновению соединенных цитоплазматическими мостиками цепочек клеток, которые называют А-групповыми, или клональным синцитием (рис. 2.4). Объединение клеток в синцитий обеспечивает координацию их метаболизма, что приводит к синхронизации дифференцировки половых клеток в составе клона. А-групповые клетки проходят ряд делений и к концу периода размножения превращаются в сперматогонии типа В.

Фаза роста. В-сперматогонии проходят профазу первого деления мейоза, превращаясь в сперматоциты I порядка и немного увеличиваясь в размере (рис. 2.5). В это время гибнут клетки, хромосомы которых не смогли правильно конъюгировать на стадии пахитены профазы мейоза.

Фаза созревания. Сперматоциты I порядка осуществляют первое деление мейоза до конца, и каждый из них дает двух потомков — сперматоцитов II порядка. Второе деление мейоза быстро следует за первым, и в результате него каждый сперматоцит дает начало двум сперматидам.

Таким образом, из одной диплоидной сперматогонии формируются четыре гаплоидных сперматиды, которые представляют собой небольшие округлые клетки с крупным ядром. Сперматиды являются дифференцированными половыми клетками, однако еще должны пройти ряд морфологических преобразований, превращаясь в сперматозоиды.

Фаза формирования или спермиогенез. Процесс формирования сперматозоида начинается с перераспределения внутриклеточных органелл сперматиды. Ядро смещается в переднюю часть клетки, его объем уменьшается, хроматин сверхконденсируется. Над ядром формируется специфическая спермиальная органелла – **акросома**. Она является производным комплекса Гольджи и содержит смесь ферментов, необходимых для проникновения спермия в ооцит. Центросома смещается в противоположный от ядра конец сперматиды, и на основе её компонентов начинает формироваться жгутик, вокруг основания которого концентрируются митохондрии. Одновременно с удлинением жгутика, происходит утрата основной части цитоплазмы вместе с органеллами.

Сформировавшиеся сперматозоиды отделяются от спермиогенного эпителия и выходят в просвет извитого канальца.

Сперматогенез продолжается в семенниках постоянно. Время, которое требуется для полного превращения сперматогонии в сперматозоид, также является постоянным для каждого вида. Цикл развития от сперматогонии до сперматозоида у мыши занимает 35 суток (из них 13 суток составляет мейотическая фаза). У человека этот период составляет около 74 суток, и за 1 час образуется примерно 100 млн. спермиев, а при каждой эякуляции их выделяется около 200 млн. шт.

Развитие мужских половых клеток может проходить только при температуре ниже 37 °C. При более высокой температуре сперматоциты и сперматиды погибают в результате автолиза. Цитоплазма этих клеток содержит большое количество лизосом, заполненных протеолитическими ферментами, из которых в дальнейшем образуется **акросомная гранула**. При температуре равной или выше температуры тела мембраны лизосом разрушаются, и клетки гибнут в результате самопереваривания. Поэтому семенники расположены вне брюшины в специальном органе — мошонке, а

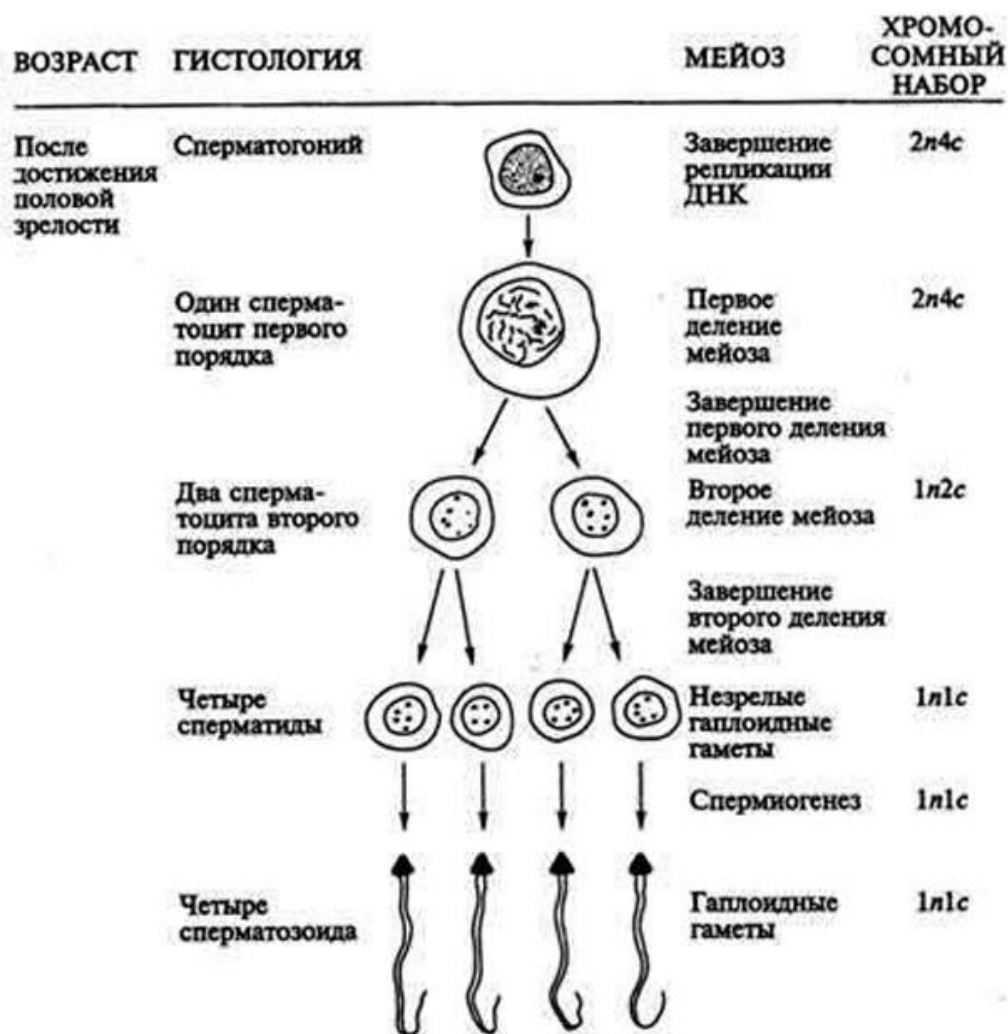


Рис. 2.5. Схема сперматогенеза у человека (Голиченков и др., 2004)

система кровоснабжения семенников имеет ряд особенностей, обеспечивающий быстрый отвод тепла от половых желез.

Функции клеток Сертоли

Нормальный сперматогенез невозможен без функционального взаимодействия клеток спермиального ряда с **поддерживающими клетками (клетками Сертоли)**. Это крупные соматические клетки, пронизывающие сперматогенный эпителий от базальной мембраны стенки извитого канальца до его просвета. Важнейшей

функциональной особенностью клеток Сертоли является способность образовывать отростки цитоплазмы, которые связываются с такими же отростками соседних клеток посредством плотных изолирующих межклеточных контактов.

Поддерживающие клетки выполняют целый ряд функций по отношению к развивающимся половым клеткам.

1. Трофическая и структурная функция. Клетки Сертоли расположены таким образом, что сперматогенный эпителий оказывается разделенным на два слоя – наружный и внутренний. Сперматогонии, находящиеся в наружном слое, получают питательные вещества непосредственно из крови. Изолированные от кровеносной системы сперматоциты, сперматиды и спермии внутреннего слоя – опосредовано, от клеток Сертоли.

2. Доставка тестостерона к развивающимся половым клеткам, изолированным от кровеносной системы. Клетки Сертоли синтезируют андрогенсвязывающий белок (АСБ). АСБ образует комплекс с тестостероном и в такой форме гормон передается половым клеткам.

3. Регуляторная функция: клетки Сертоли несут на себе рецепторы гормонов, участвующих в контроле синтеза АСБ — рецепторы ФСГ и тестостерона. Связывание гормонов с рецепторами стимулирует синтез АСБ.

4. Поддерживающие клетки способны фагоцитировать погибшие половые клетки.

5. Клетки Сертоли выполняют защитную функцию, поскольку являются ведущим компонентом в создании сложной структуры, которую называют **гематотестикулярным барьером**. Его основная задача — предотвратить иммунную реакцию организма на развивающиеся половые клетки. Носителями неизвестных организму антигенов дифференцирующиеся половые клетки становятся после осуществления межхромосомного обмена в процессе мейоза (начиная со стадии сперматоцитов первого порядка). Помимо этого,

гематотестикулярный барьер изолирует развивающиеся половые клетки от действия токсических агентов, которые могут быть принесены с кровью.

Гормональная регуляция сперматогенеза

Начиная со времени полового созревания, нейросекреторные клетки ядер гипоталамуса вырабатывают гормон **гонадолиберин (люлиберин, гонадотропин-рилизинг фактор)**. Этот гормон в пульсовом режиме каждые два часа поступает в кровь.

Люлиберин активизирует клетки аденогипофиза (**гонадотропоциты**), которые, в свою очередь, импульсно секретируют в кровь гонадотропные гормоны. Эти гормоны – фолликулстимулирующий (ФСГ) и лютеинизирующий (ЛГ), воздействуют на клетки-мишени в семенниках, которыми являются клетки Сертоли и Лейдига.

Главная функция в регуляции развития спермиев в семеннике принадлежит ФСГ. Он воздействует на клетки Сертоли, а те в ответ вырабатывают целый ряд биологически активных веществ (в первую очередь АСБ), регулирующих сперматогенез.

ЛГ контролирует функционирование клеток Лейдига, которые синтезируют мужской гормон тестостерон. Сперматогенез будет проходить в семенниках постоянно только при условии поддержания там высокой концентрации тестостерона.

2.3.4. Оогенез и фолликулярный цикл яичников

Развитие женских половых клеток проходит в корковом слое яичников. Ооциты развиваются не изолированно, а находясь в морфофункциональной связи с соматическими фолликулярными клетками, поддерживающими и контролирующими развитие гамет. Между ооцитами и фолликулярными клетками формируются щелевые контакты, через которые ооцит, не имеющий доступа к кровотоку, быстро получает необходимые ему метаболиты и

регуляторные молекулы. Такой клеточно-тканевой комплекс является функциональной единицей яичника, и называется **фолликул яичника**. Следует отметить, что функциональное взаимодействие компонентов фолликула возникает не сразу, формируется длительно и постепенно. Примитивные незрелые фолликулы уже присутствуют в яичнике в эмбриональный период развития, но циклическое поступательное их развитие устанавливается в женском организме только с наступлением периода полового созревания. С этого момента циклическое повторение роста и созревания группы ооцитов будет сопровождаться усложнением структуры фолликулов, в которых находятся половые клетки, и расширением их функций (рис. 2.6).

Во время оогенного мейоза хромосомные перестройки профазы I сопровождаются структурными изменениями цитоплазмы развивающейся женской половой клетки. В связи с этим, профазу оогенного мейоза делят на большее количество стадий по сравнению со сперматогенным. В ней выделяют раннюю и позднюю профазу. К ранней профазе относят лептотену, зиготену, пахитену и начало диплотены. Поздняя профаза включает в себя большую часть диплотены, которую подразделяют на диффузную диплотену (диктиотену), продвинутую диплотену, позднюю диплотену и диакинез.

Этапы оогенеза

В развитии женских половых клеток выделяют три фазы: размножения, роста, и созревания.

Фаза размножения. В эмбриональной гонаде, начавшей дифференцироваться в яичник, диплоидные ППК заселяют корковый слой половой железы. Там оогонии активно пролиферируют и образуют клональные колонии. Каждую из оогоний окружают первичные фолликулярные клетки. Большое количество половых клеток гибнет из-за ошибок расхождения хромосом во время митоза,

однако запас половых клеток в яичниках после завершения фазы размножения пополняться более не будет.



Рис. 2.6. Схема оогенеза у человека (Голиченков и др., 2004)

Фаза роста. Под влиянием сигналов, поступающих от первичных фолликулярных клеток, оогонии вступают в профазу

мейоза I. Начавшие мейоз клетки называют ооцитами I порядка. Во время пахитены отмечается их массовая гибель. Данное явление получило название **атрезии** (гибели) мейоцитов, и его причинами являются отсутствие или ошибки конъюгации хромосом. Успешно завершившие пахитену ооциты проходят профазу мейоза I до ранней диплотены. Далее следует диктиотена, для которой характерно наличие в ядре ооцита деконденсированного хроматина с невысоким уровнем транскрипции, обеспечивающим жизнеспособность клетки. Так как в это время происходит небольшое пропорциональное увеличение объемов ядра и цитоплазмы, то этот этап развития называют «**малым ростом ооцита**». В таком состоянии он может долго сохраняться и не терять способности к созреванию и оплодотворению. «Дремать» ооциты будут до времени полового созревания самки.

После наступления половой зрелости ооциты возобновляют развитие, переходя в продвинутую диплотену. Начинается **период большого роста ооцитов**. Растут начинают примерно 10 процентов из них, остальные гибнут. У мыши за время роста объем ооцитов возрастает примерно в 300 раз, а ядра — в 3-5 раз. Активно идет транскрипция и трансляция, накопление разнообразных белков, углеводов, всех типов РНК, формирование многочисленных клеточных органелл. Иными словами, в ооците происходит накопление желтка, поэтому второе название этой стадии — **вителлогенез**, т. е. «создание желтка». Параллельно с ростом ооцитов происходит рост и усложнение организации фолликулов.

На поздней диплотене рост ооцитов прекращается, транскрипция затухает. Хромосомы отсоединяются от ядерной оболочки, конденсируются и окружают ядрышко ооцита, формируя **кариосферу**. Наличие кариосферы свидетельствует о том, что ооцит способен к дальнейшему развитию. На поздней диплотене осуществление мейоза блокируется.

Фаза созревания. Данная фаза развития ооцита включает в себя метафазу, телофазу и анафазу мейоза I, интеркинез и метафазу второго деления мейоза. Она охватывает период от возобновления ооцитами мейоза до овуляции и у разных видов млекопитающих продолжается от 9-11 до 36-40 часов.

Возобновление ооцитами мейоза стимулируют гонадотропины, преимущественно ЛГ, но не прямо, а опосредовано, через воздействие на фолликулярные клетки, которые передают ооциту сигнал к возобновлению мейоза. На стадии диакинеза происходит разрушение ядерной оболочки ооцита, и далее — гомологичные хромосомы образуют метафазную пластинку первого деления мейоза. Затем быстро проходят анафаза I и телофаза I. Завершается митоз I (или первое деление созревания) асимметричным цитокинезом, в результате которого образуется крупный ооцит второго порядка и маленькое **первое редукционное (или первое полярное) тельце**. В каждую из этих клеток попадает половинный набор хромосом, таким образом, обе клетки являются гаплоидными.

После короткой интерфазы и столь же короткой профазы митоза ооцит II порядка формирует метафазную пластинку мейоза II. На этом этапе реализация мейоза вновь приостанавливается (блокируется) и ооциты остаются на метафазе II вплоть до овуляции.

Созревание ооцитов завершилось, а завершение второго деления мейоза произойдет позже во время оплодотворения.

Молекулярные механизмы регуляции созревания ооцитов

В течение оогенеза мейоз дважды приостанавливается и возобновляется (на поздней диплотене профазы мейоза I, и на метафазе мейоза II). Эти события находятся под контролем нескольких факторов: гипофизарных гонадотропных гормонов, **мейозиндуцирующего фактора (МИФ)** и **цитостатического фактора (ЦСФ)**.

МИФ является универсальным регулятором клеточного цикла, и контролирует переход от стадии G₂ к стадии М как в митотическом,

так и в мейотическом клеточном цикле. По молекулярной структуре он является белковым гетеродимером, состоящим из двух субъединиц. Белок p34^{cdc2} или cdc2 киназа является каталитическим, а циклин В — регуляторным компонентом. Функционально активный МИФ гиперфосфорилирует белки ядерной оболочки, что приводит к её разрушению, а разрушение оболочки ядра служит для клетки сигналом к переходу на стадию метафазы и началу формирования веретена деления. У млекопитающих завершившие период роста ооциты содержат в цитоплазме инактивированный комплекс p34^{cdc2}/циклин В, который называют пре-МИФ. Неактивным его делает фосфорилирование нескольких аминокислот в молекуле cdc2 киназы.

ЦСФ — фактор, контролирующий блокирование мейоза на метафазе мейоза II. Предполагают, что он представляет собой молекулярный комплекс, состоящий из Mos киназы и циклинзависимой киназы cdc2. ЦСФ стабилизирует молекулярную структуру МИФ, не позволяя тому распадаться на две субъединицы. В свою очередь, наличие в цитоплазме функционально активного МИФ не позволяет ооциту завершить метафазу II и перейти к анафазе.

Последовательность событий, сопровождающих созревание ооцита можно представить следующим образом. «Дремлющие» ооциты находятся на поздней диплотеке профазы мейоза I, они блокированы на границе фаз G₂/M и содержат пре-МИФ в цитоплазме. Усиление синтеза ЛГ и возрастание его концентрации в крови оказывает влияние на фолликулярные клетки и приводит к разрушению щелевых контактов между плазматической мембраной ооцита и отростками фолликулярных клеток, после чего межклеточный транспорт прерывается. Это вызывает снижение в цитоплазме ооцита концентрации целого ряда метаболитов, прежде всего цАМФ, а затем — снижение активности цАМФ-зависимой протеинкиназы А. Фермент более не способен поддерживать МИФ в

неактивном фосфорилированном состоянии. Активированный МИФ инициирует разборку ядерной оболочки ядра (или зародышевого пузырька) ооцита, и мейоз возобновляется. В конце метафазы I МИФ инактивируется в результате частичной деградации циклина B, после чего ооцит завершает мейоз I, выделяя первое направительное тельце.

Во время интерфазы вновь происходит синтез циклина B, который тут же используется для сборки новых гетеродимеров МИФ. МИФ инициирует начало метафазы II. ЦСФ стабилизирует его структуру, и присутствие функционально активного МИФ в цитоплазме ооцита блокирует осуществление мейоза во второй раз, препятствуя завершению метафазы и переходу к анафазе.

Окончание второго деления мейоза произойдет уже во время оплодотворения. Поток ионов кальция, возникающий при оплодотворении, окажет активирующее действие на белок кальмодулин, который через ряд промежуточных реакций, в свою очередь, активирует ферменты, вызывающие разрушение ЦСФ. Лишенный стабилизирующего действия ЦСФ, МИФ деградирует, и ооцит перейдет к завершающим стадиям второго деления мейоза. Оно завершится асимметричным цитокинезом с формированием одноклеточного зародыша — **зиготы** и выделением **второго редукционного тельца**.

Фолликулы и фолликулярный цикл яичников

Корковое вещество яичника половозрелой самки содержит ооциты в фолликулах, находящихся на разных стадиях развития. **Фолликулом яичника** называют клеточно-тканевой комплекс (овосоматический гистион), состоящий из женской половой клетки и окружающих ее соматических тканей, состав которых изменяется и усложняется в процессе фолликулогенеза. **Фолликулогенезом** принято называть поступательное развитие фолликулов,

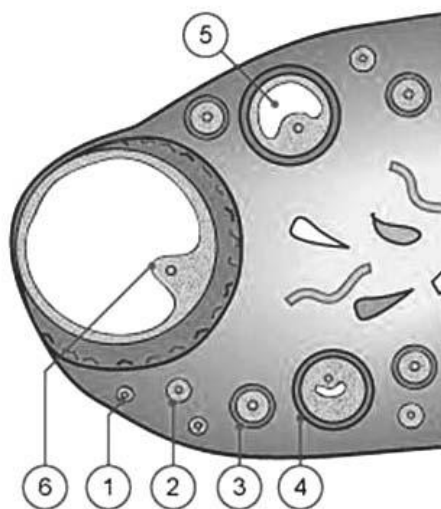


Рис. 2.7. Стадии фолликулогенеза в яичнике человека
(Human Embriology online, с изменениями)

1 – примордиальный фолликул, 2 – первичный фолликул, 3 – вторичный фолликул, 4 – третичный фолликул, 5 – третичный антральный фолликул, 6 – яйценосный бугорок в Граафовом пузырьке

сопровождающееся усложнением их организации.

В яичнике выделяют четыре типа фолликулов: **примордиальные, первичные, вторичные и третичные (Граафовы пузырьки)** (рис. 2.7). **Примордиальные** фолликулы имеют наиболее примитивную организацию и состоят из ооцита, окруженного одним слоем первичных фолликулярных клеток. Во взрослом яичнике примордиальных фолликулов относительно немного, но они являются основным типом фолликулов, содержащихся в яичнике эмбриона и неполовозрелой женской особи. Примордиальные фолликулы содержат ооциты первого порядка, находящиеся на стадии диктиотены мейоза I.

С началом полового созревания, под действием гормональных стимулов примордиальные фолликулы преобразуются в **первичные**. Фолликулярные клетки активно пролиферируют, увеличиваются в размере и меняют форму с плоской на кубическую. Они формируют **многослойный фолликулярный эпителий** или **гранулезную**

оболочку ооцита. В результате секреторной деятельности клеток гранулезы и самого ооцита вокруг него формируется внешняя оболочка — так называемая **блестящая оболочка ооцита**, которая в дальнейшем сыграет важную роль в оплодотворении. Ооцит первичного фолликула по-прежнему находится в состоянии мейотического блока, но переходит к стадии большого роста.

Для **вторичного** фолликула характерным является высокая пролиферативная активность фолликулярных клеток, за счет чего фолликул быстро увеличивается в размерах. В фолликуле появляется внутренняя полость — **антрум (или антральная полость)**, и фолликулы, сформировавшие такую полость, называют **антральными**. Клетки фолликулярного эпителия секретируют жидкость, накапливающуюся в антральной полости. Фолликулярная жидкость содержит женские половые гормоны — эстрогены. Чем выше концентрация гормонов в фолликулярной жидкости, тем выше вероятность того, что данный фолликул будет успешно развиваться. В составе фолликулярного эпителия обособляется область, непосредственно окружающая ооцит и получившая название **яйценосного бугорка, или кумюлюса**. Под давлением накапливающейся в фолликуле жидкости он смещается к внешнему краю фолликула. В составе яйценосного бугорка выделяется 1-3 слоя эпителиальных клеток, прилегающих к ооциту и образующих с его плазматической мембраной щелевые межклеточные контакты. Эти клеточные слои получили общее название **«блестящий венец»**. Ооцит первого порядка в фолликуле завершил период роста и находится в фазе диакинеза. Он будет ожидать сигнала к началу созревания.

Третичный фолликул (Граафов пузырек, преовуляторный фолликул) организован наиболее сложно, что связано с подготовкой к овуляции ооцита. Фолликул достигает таких размеров, что виден невооруженным глазом как выпячивание поверхности яичника. Антральная полость крупная, заполнена жидкостью, а внешняя стенка

фолликула становится совсем тонкой, поскольку теперь она состоит всего лишь из 3-4 слоев фолликулярного эпителия. Лучистый венец, содержащий в себе ооцит, постепенно обособляется от кумулюса. Щелевые контакты между клетками блестящего венца и ооцитом разрушаются и межклеточная коммуникация прерывается. Это служит для ооцита сигналом возобновления мейоза. Ооцит проходит до конца первое деление мейоза, трансформируясь в ооцит второго порядка и выделяя первое направительное тельце, и далее — достигает метафазы мейоза II, где клеточное деление вновь блокируется.

Таким образом, фолликулогенез можно определить как прогрессивное развитие фолликулов от стадии примордиальных до третичных преовуляторных. У человека продолжительность фолликулогенеза составляет около 120 суток.

Овуляцией называют выделение ооцита из фолликула. Индуктором овуляции является ЛГ. Резкий подъем уровня ЛГ в крови инициирует в яичнике целую группу событий, в результате которых стенка фолликула разрушается. Яйценосный бугорок отделяется и вместе с фолликулярной жидкостью покидает фолликул, после чего ооцит, окруженный кумулюсными клетками, подхватывает воронка яйцевода. Опустевший фолликул проходит структурное преобразование и превращается в **желтое тело**. Желтое тело является временным эндокринным органом, который синтезирует гормон **прогестерон**. Данный гормон оказывает комплексное воздействие на женскую репродуктивную систему, поэтому отметим здесь только то, что в яичнике он тормозит рост фолликулов и созревание ооцитов, а в матке стимулирует развитие её эпителиальной выстилки (эндометрия). Длительность функционирования желтого тела зависит от того, наступила беременность или нет. Если оплодотворение произошло, то **желтое тело беременности** будет секретировать прогестерон в течение нескольких месяцев. Если беременность не

наступает, то **менструальное желтое тело** будет функционально активным в течение 7-10 дней.

Не все фолликулы достигают стадии зрелости, значительное их количество подвергается атрезии. Под атрезией понимают контролируемую перестройку деструктивного характера. Атрезия фолликулов ранних стадий развития идет путем апоптоза, который затрагивает ооцит и его клеточное окружение. Атрезия вторичных и третичных фолликулов, типичная при возрастном затухании репродуктивной функции яичников, характеризуется образованием на месте фолликула атретических тел, которые продуцируют небольшое количество женских половых гормонов и значительное количество мужских половых гормонов.

Функции фолликулярных клеток

Ооцит и фолликулярные клетки при помощи щелевых межклеточных контактов объединены в единую систему – функциональный синцитий. Данный тип контактов дает клеткам возможность обмениваться молекулами с небольшим молекулярным весом. Находясь внутри фолликула, ооцит изолирован от капиллярного кровотока и, соответственно, от питательных веществ и регуляторных молекул, переносимых кровью (диаметр третичного фолликула человека составляет примерно 2-4 мм). По синцитию, сначала – от внешних фолликулярных клеток к внутренним, и далее к ооциту быстро поступают низкомолекулярные метаболиты. Фолликулярные клетки обеспечивают как поддержание мейотического ареста ооцитов, так и возобновление ими мейоза в конце профазы мейоза I. Блокирование мейоза достигается постоянным «накачиванием» в ооцит цАМФ, который синтезируют фолликулярные клетки. Высокая концентрация цАМФ позволяет инактивировать МИФ. Возобновлению мейоза предшествует резкое повышение в крови уровня ЛГ. Клетками-мишенями для гормонального сигнала являются фолликулярные клетки. ЛГ

вызывает снижение уровня синтеза белка коннексина — компонента щелевых контактов. Щелевые контакты разрушаются, и межклеточный транспорт цАМФ прерывается, что приводит к инактивации цАМФ-зависимой протеинкиназы А и активации МИФ.

Появляются данные об участии клеток лучистого венца в оплодотворении. Во время овуляции яйцеклетка выходит из фолликула окруженная клетками лучистого венца. Именно этот клеточный комок подхватывает воронка яйцевода и перемещает в ампулу яйцевода. Далее, в процессе оплодотворения, кумулюсные клетки механически улавливают наиболее активные сперматозоиды и направляют их сквозь блестящий венец к яйцеклетке, но не дают проходить туда спермиям с морфологическими дефектами. Также они участвуют в создании в зоне оплодотворения микроокружения, благоприятного для мужских и женских гамет.

2.3.5. Половые циклы

В период репродуктивной активности организм самок млекопитающих периодически готовится к зачатию и наступлению беременности. Физиологически такая подготовка выражается в циклическом изменении состояния яичников и других органов репродуктивной системы. В свою очередь, эти события оказывают влияние на весь организм, вызывая изменения температуры тела, интенсивности обмена веществ, состояния центральной нервной системы. Весь комплекс указанных изменений получил название **полового цикла**. Продолжительностью полового цикла считают период времени между двумя овуляциями.

У млекопитающих выделяют два основных типа половых циклов: эстральный и овариально-менструальный половой цикл. **Эстральный** цикл характерен для большинства животных, а **овариально-менструальный** — только для некоторых высших приматов и человека.

Механизм регуляции половых циклов

Репродуктивная функция самок млекопитающих контролируется нейроэндокринной системой, которая включает в себя центральную нервную систему (ЦНС), гипоталамус, гипофиз, половые и другие периферические железы.

ЦНС осуществляет связь между репродуктивной системой и другими системами организма, и между репродуктивной системой и внешней средой. На формирование и проявление половых циклов влияют разнообразные факторы внешней среды. Одни из них отражают условия существования животного (длительность светового дня, температура, ветер, почва и др.), другие сигналы исходят от самца (зрительные, слуховые, обонятельные). Сложный комплекс сигналов воспринимается анализаторами животного (зрительным, слуховым, обонятельным), обрабатывается, и ответный сигнал также в форме нервных импульсов передается в гипоталамус.

Гипоталамус – та часть промежуточного мозга, которая координирует функции нервной и эндокринной систем. К нему поступают сигналы из двух источников: нервные импульсы от ЦНС и гормональные (химические по своей природе) от эндокринных желез. В ответ на получаемые стимулы клетки гипоталамуса усиливают или ослабляют выделение в кровоток специфических нейросекретов (рилизинг-факторов). Кровь доставляет рилизинг-факторы в переднюю долю гипофиза (аденогипофиз), функцией которого является синтез гормонов, влияющих на работу яичников и других периферических желез внутренней секреции. Под действием рилизинг-факторов высвобождение гормонов либо усиливается, либо тормозится.

Аденогипофиз вырабатывает два гонадотропных гормона, которые регулируют функционирование яичников – фолликулстимулирующий гормон (ФСГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ), а также стимулирующий лактацию гормон пролактин. Высвобождение из гипофиза ФСГ и ЛГ контролируется

гонадотропин-рилизинг-гормоном, который является нейросекретом гипоталамуса.

ФСГ и ЛГ оказывают сочетанное действие на состояние яичников. ФСГ при участии ЛГ стимулирует рост и созревание фолликулов яичников и способствует синтезу в них женских половых гормонов эстрогенов. ЛГ при участии ФСГ вызывает окончательное созревание фолликулов, стимулирует овуляцию, формирование желтого тела и синтез прогестерона клетками желтого тела.

Яичники вырабатывают стероидные половые гормоны — эстрогены и прогестерон. Клетки фолликулярного эпителия синтезируют эстрогены, а синтез прогестерона обеспечивает желтое тело и, в небольших количествах, фолликулярные клетки антральных фолликулов. Половые гормоны выделяются в кровоток и воздействуют на органы — мишени, к которым относятся с одной стороны, периферические органы (матка, яйцеводы, влагалище, молочные железы), а с другой стороны — центральные органы (гипоталамус и гипофиз).

Эстрогены в период полового созревания вызывают рост и развитие половых органов и вторичных половых признаков, а в период репродуктивной активности участвуют в формировании полового цикла и определяют внешние проявления полового поведения самки. В низких концентрациях эстрогены стимулируют синтез гипофизом ФСГ, а в высоких — блокируют секрецию данного гормона, но стимулируют секрецию ЛГ.

Прогестерон тормозит на уровне гипоталамуса и гипофиза синтез ЛГ, но не влияет на секрецию ФСГ, поэтому в период активного синтеза прогестерона фолликулы яичника растут, но не овулируют. Прогестерон, который называют гормоном беременности, также обеспечивает структурную реорганизацию эндометрия, необходимую для имплантации зародыша, подавляет сократимость мышц матки, способствует развитию молочных желез и началу лактации после родов.

В регуляции половой функции самок наряду с перечисленными гормональными факторами участвует целый ряд других гормонов и биологически активных соединений, из числа которых следует выделить простагландины, окситоцин и ингибин.

Синтез простагландинов осуществляют клетки различных тканей организма. Простагландин E_2 , который играет определенную роль в овуляции, в больших количествах синтезируют фолликулярные клетки яичников. Простагландин $\Phi_{2\alpha}$ синтезируют клетки слизистой оболочки матки, и он участвует в контроле дегенерации желтого тела.

Гормон окситоцин производят клетки гипоталамуса, после чего он депонируется в задней доле гипофиза. Выделяясь в кровоток, окситоцин стимулирует сокращения мускулатуры матки и яйцеводов и функции миоэпителия молочных желез.

Ингибин (фолликулостатин) — белок, синтезируемый фолликулярными клетками. Выделяясь в кровь, ингибин подавляет секрецию гипофизом ФСГ, что тормозит созревание фолликулов, способствует их атрезии.

Эстральный половой цикл

Изучение динамики структурных и функциональных изменений репродуктивных органов позволило выделить в эстральном половом цикле несколько стадий.

1. Проэструс или предтечка.

Под влиянием внешних факторов (например: увеличение длительности светлого времени суток, присутствие самца) в гипофизе усиливается секреция гонадотропинов (ФСГ, ЛГ). Под их воздействием в яичнике начинается быстрый рост фолликулов, клетки которых синтезируют все большее количество эстрогенов. Гормоны оказывают действие на многочисленные клетки-мишени в разных органах, в результате чего увеличиваются наружные половые органы, усиливается кровенаполнение матки, увеличивается ее размер

и толщина эндометрия, слизистая шейки матки начинает активно секретировать слизь.

2. Эструс или период полового возбуждения.

В крови регистрируется высокий уровень половых гормонов. Самка демонстрирует наиболее выраженное половое поведение, она стремится к спариванию. Термин «эструс» прямо связан с изменениями в поведении самки. Еще в древности пастухи обратили внимание на то, что беспокойство, снижение аппетита самки во время течки сходно с поведением животных, которых длительное время на пастбище донимают оводы (латинское название таких оводов - oestrus), и по аналогии так же называли период наивысшего полового возбуждения у самок животных.

В это время слизистая шейки матки секретирует всё больше слизи, а поскольку канал шейки матки раскрывается, то слизь с примесью крови начинает вытекать наружу (отсюда возник термин «течка»). В конце эструса происходит овуляция.

3. Метэструс или послетечка.

После овуляции фолликул преобразуется в желтое тело и начинает секретировать прогестерон. Под действием гормона в матке происходят изменения, необходимые для внедрения в нее зародыша. Половое поведение затухает.

4. Анэструс или период полового покоя.

Яичники не содержат созревающих или зрелых фолликулов.

После завершения периода полового покоя вновь наступает проэструс.

У млекопитающих существуют видовые различия в половых циклах. Те виды, у самок которых при отсутствии беременности половые циклы круглогодично следуют один за другим, относят к полиэстральным (например: грызуны, корова, свинья). Животных, у которых бывает несколько течек в определенное время года, относят к сезонно-полиэстральным (кошка, лошадь, овца, коза), а тех, у которых только одна течка в год, называют сезонно-

моноэстральными (крупные хищники, лиса, косуля). Биологический смысл таких различий кроется в особенностях жизненного цикла животных. Мелкие животные имеют небольшую продолжительность жизни, короткий период размножения и, как и травоядные, являются кормовой базой для других видов. Для поддержания численности вида важно, чтобы самки были как можно быстрее готовы к новой беременности, если она не наступила в последнем половом цикле. Циклы у таких животных короткие (мышь – 4 дня). Чем крупнее животное и больше продолжительность его жизни, тем меньше этот вид нуждается в быстром размножении, если только данный вид не является желанной добычей многочисленных хищников, поэтому половые циклы у них протяженные, количество детенышей в помете небольшое и длительные интервалы между родами.

Для долгоживущих видов с продолжительностью жизни, исчисляемой десятками лет, требуются механизмы, ограничивающие плодовитость. К их числу относятся позднее половое созревание, отсутствие половых циклов у самки в период вскармливания детенышей, долгие перерывы между родами и низкая вероятность оплодотворения.

Овариально-менструальный цикл человека

Данный тип полового цикла имеет несколько отличий от эстрального. Прежде всего, в менструальном цикле отсутствует сам эструс. Поведение женщины в период, предшествующий овуляции и во время нее не меняется, она не становится более привлекательной для мужчины. Человек — единственный вид, у которого полностью отсутствует эстральное поведение. Так проявляется социальная составляющая природы человека. Регулярные резкие изменения поведения женщин чрезвычайно затруднили бы жизнь и совместную деятельность группы людей, и на каком-то этапе эволюции человека период полового возбуждения был исключен из репродуктивного цикла. Такое изменение создало условия для формирования

разноплановых взаимоотношений в группе людей, создав предпосылки для возникновения общества.

Вторым отличием является то, что в эстральном цикле течка предшествует овуляции, а в менструальном цикле кровотечение начинается после овуляции, в конце цикла и только в случае отсутствия оплодотворения.

Овариально-менструальный цикл – это циклические структурные и функциональные изменения органов женской половой системы, связанные с подготовкой к зачатию и вынашиванию беременности. При отсутствии оплодотворения цикл заканчивается маточным (менструальным) кровотечением. Название цикла связано с его периодичностью: лат. *menstrualis* – ежемесячный. Менструальный цикл объединяет в себе три группы циклически повторяющихся событий:

1. фолликулярный цикл яичника;
2. эндометриальный цикл – перестройка слизистой матки;
3. цервикальный цикл – изменение функционального состояния шейки матки.

Все три группы событий взаимосвязаны, синхронизированы и контролируются гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системой.

Первая менструация обычно происходит в 12-14 лет, и в течение 1,5 лет после неё менструальный цикл приобретает регулярный характер. После 16 лет устанавливается индивидуальная длительность цикла. У большинства женщин длительность цикла составляет 28 дней. Она не меняется в течение всего репродуктивного периода, который длится в среднем до 45 лет. Затем наступает пременопауза, репродуктивная и эндокринная функции яичника начинают затухать, время между менструациями увеличивается. Последняя менструация (менопауза) происходит в возрасте 50-51 года.

Овариально-менструальный цикл (рис.2.8) принято делить на три фазы: менструальную, фолликулярную (она же пролиферативная или

постменструальная) и лютеальную (она же секреторная или пременструальная). Первым днём цикла считают первый день менструального кровотечения.

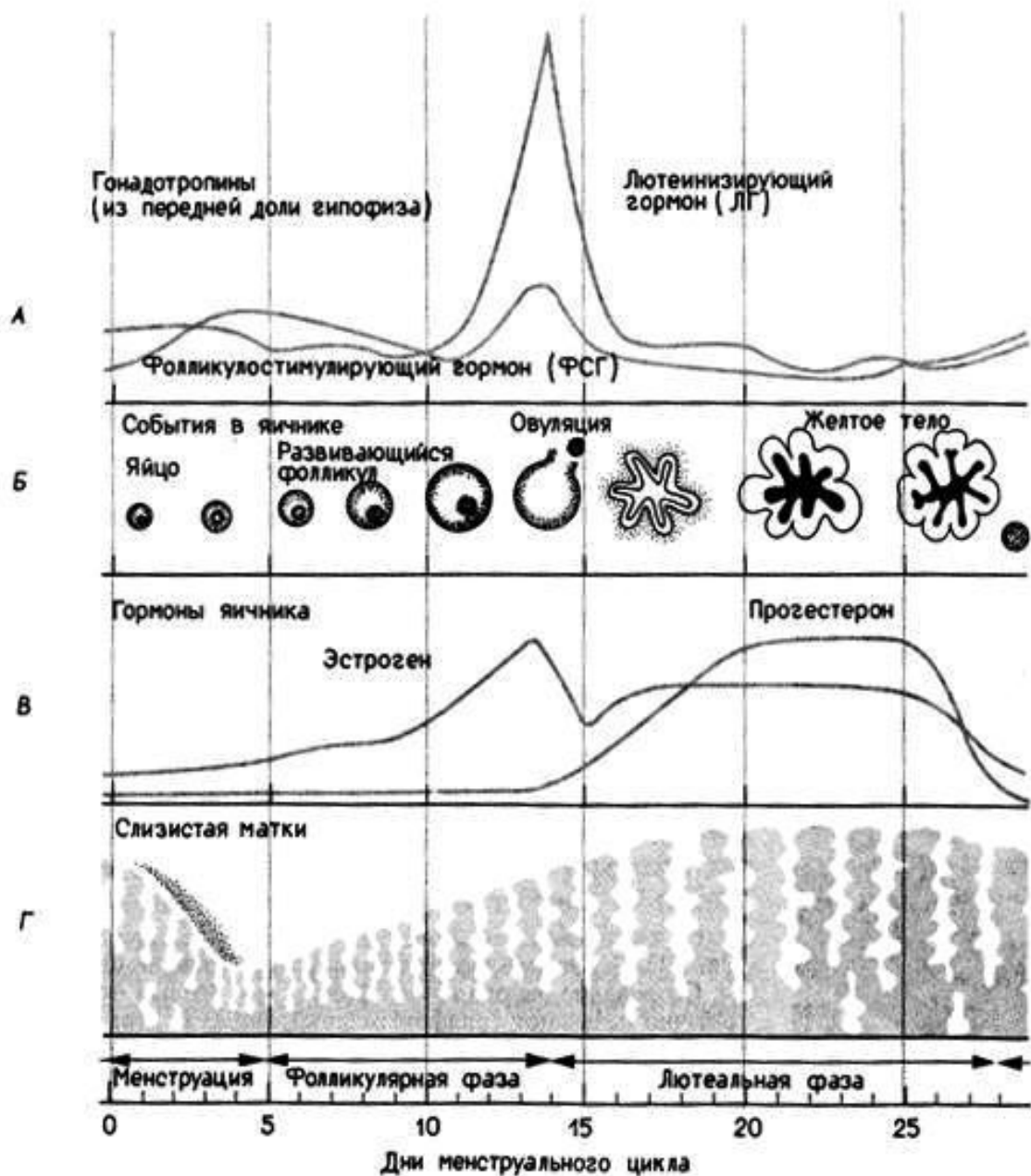


Рис. 2.8. Овариально-менструальный цикл человека (Гилберт, 1993)
Овариальный (Б) и маточный (Г) циклы координируются гормонами гипофиза (А) и яичника (В).

Во время **менструальной фазы** происходит отторжение функционального (наружного) слоя эндометрия, сопровождающееся маточным кровотечением. Менструация длится в среднем 4 дня, к её окончанию в эндометрии сохраняется только тонкий базальный слой, который в дальнейшем послужит основой для регенерации функционального слоя.

Данную фазу считают фазой гормонального покоя. В яичнике происходит инактивация желтого тела с прекращением синтеза прогестерона, а синтез ФСГ гипофиз увеличивает только к концу менструации.

В начале **фолликулярной фазы** гипофиз непрерывно синтезирует в кровь небольшие количества ФСГ и ЛГ (тоническая секреция), стимулируя развитие в яичниках вторичных фолликулов. Фолликулярные клетки синтезируют всё больше эстрогенов, которые запускают цикл регенерации функционального слоя эндометрия и маточных желез, в результате чего слизистая эпителия матки начинает постепенно утолщаться при одновременном увеличении в ней количества маточных желез.

В позднюю фолликулярную фазу синтез гонадотропинов постепенно возрастает (преовуляторная волна), активизируя развитие крупных антральных фолликулов и одного Граафова пузырька, который будет овулировать в данном цикле.

Гонадотропины стимулируют фолликулярные клетки к выработке всё больших количеств эстрогена. Под действием гормона эндометрий увеличивается в объеме и прорастает кровеносными сосудами; слизь шейки матки становится менее густой, что в дальнейшем будет облегчать проникновение спермиев в матку; гипофиз снижает уровень синтеза ФСГ.

Резкий кратковременный подъем концентрации ЛГ на фоне не столь существенного увеличения концентрации ФСГ является пусковым сигналом овуляции. Сама овуляция произойдет примерно через 12 часов. Стенка фолликула будет разрушена в результате воздействия на образующую её соединительную ткань

протеолитических ферментов — коллагеназ и активатора плазминогена, синтезируемых фолликулярными клетками.

Овуляция является началом **лютеальной фазы** цикла. Фолликул, из которого овулировал ооцит трансформируется в желтое тело, и его клетки начинают вырабатывать прогестерон. Под действием гормона увеличиваются маточные железы, их клетки вместе с секреторными клетками эндометрия начинают вырабатывать маточную слизь, необходимую для имплантации и питания зародышей. Усиливается кровоснабжение эндометрия, теперь сквозь всю его толщу проходит густая капиллярная сеть. К концу лютеиновой фазы цикла толщина эндометрия увеличивается более чем в два раза по сравнению с началом фолликулярной фазы.

Если оплодотворения не произошло, то желтое тело перестаёт секретировать прогестерон, и дефицит гормона приводит к резкому спазму артерий функционального слоя эндометрия. Его кровоснабжение прекращается, начинается некротический распад ткани. Через некоторое время кровоснабжение возобновляется, и небольшое количество крови (при нормальном ходе менструации её объем составляет около 150 мл) изгоняется из организма вместе с разрушенным функциональным слоем эндометрия — началась менструация.

До овуляции канал шейки матки (цервикальный канал) узкий, и заполняющая его густая слизь препятствует проникновению сперматозоидов в женский репродуктивный тракт. Отвечая на возрастание концентрации эстрогенов, которое непосредственно предшествует овуляции, клетки стенки цервикального канала начинают секретировать менее густую слизь с упорядоченным расположением тяжей. Теперь цервикальная слизь не только не является препятствием для проникновения активных спермиев, но и направляет их движение, в то время как спермии с дефектами застрянут в слизи. Во время овуляции стенка шейки матки расслабляется, и канал значительно расширяется.

2.4. ОПЛОДОТВОРЕНИЕ

Оплодотворением называют процесс слияния мужской и женской гаплоидных половых клеток. Во время оплодотворения спермий активирует метаболизм яйцеклетки, после чего начинается развитие нового организма, объединяющего в своем генотипе гены обоих родителей. Оплодотворение является концом гаметогенеза и началом онтогенеза.

Оплодотворение выполняет две основные функции: репродуктивную — создание нового организма, и половую — комбинирование полученных от родителей генов.

2.4.1. Строение зрелых гамет

Рассмотрим строение и свойства готовых к оплодотворению половых клеток.

Сперматозоид

После окончания стадии формирования спермии выходят в просвет извитого канальца семенника. Они еще не обладают оплодотворяющей способностью и будут продолжать созревать, задержавшись на несколько суток в придатке семенника, а затем, уже после осеменения самки поднимаясь по её репродуктивному тракту до зоны оплодотворения.

Во время пассивного движения по придатку семенника (эпидидимису) спермии подвергаются модифицирующему воздействию секрета, выделяемого эпителием эпидидимиса. У них изменяется молекулярная организация плазматической мембраны, на которой появляются стабилизирующие гликопротеины и специфические ферменты (в том числе галактозилтрансфераза). Плазматическая мембрана приобретает отрицательный электрический заряд, что предотвращает слипание спермиев. Спермии накапливают в цитоплазме цАМФ и начинают двигаться. Дополнительное

активирующее воздействие на метаболизм спермиев оказывает секрет пузырьков желез.

Однако и сейчас спермии не обладают оплодотворяющей способностью. Мужские гаметы приобретут её во время **капацитации** – процесса, характерного только для млекопитающих. Он проходит в половом тракте самки в ходе взаимодействия спермиев с жидкостями, содержащимися в матке и яйцеводах, а также с клетками эпителия, выстилающего эти органы. Капацитация спермиев заключается в изменении липидного и белкового состава их плазматической мембраны. С неё удаляются стабилизирующие протеины, мембрана становится более текучей, особенно вокруг акросомной гранулы, происходит активация молекул клеточной адгезии. Помимо этого, в результате капацитации спермии гиперактивируются, приобретая способность к максимально быстрому движению, которое требуется для проникновения сквозь слой клеток лучистого венца и блестящую оболочку яйцеклетки.

Условия, необходимые для капацитации можно воспроизвести *in vitro*, что позволило создать метод искусственного осеменения. Длительность процесса капацитации у разных видов животных различна. Для капацитации эякулированных спермиев барана требуется 1-1,5 часа, быка и кролика — 5-6 часов, приматов 4-5 часов.

Спермии, попавшие в яйцеводы самки, сохраняют оплодотворяющую способность около двух суток, а далее начинается старение мужских гамет. Слияние яйцеклеток со спермиями, находившимися в репродуктивном тракте более 24 часов нежелательно, так как может привести к появлению зародышей с низкой жизнеспособностью или нарушениями развития.

Полностью созревший, не имеющий морфологических дефектов спермий состоит из трех частей — **головки, шейки и жгутика** (рис.2.9). Головка содержит гаплоидное ядро и акросомную гранулу, которые окружены тонким слоем цитоплазмы. Хроматин ядра спермия сверхконденсирован, что достигается заменой гистонов при

его упаковке на меньшие по размеру белки протамины. Акросома является производным аппарата Гольджи и содержит смесь гидролитических ферментов (прежде всего гиалуронидазы и акрозина), необходимых спермию для преодоления внешних оболочек яйцеклетки.

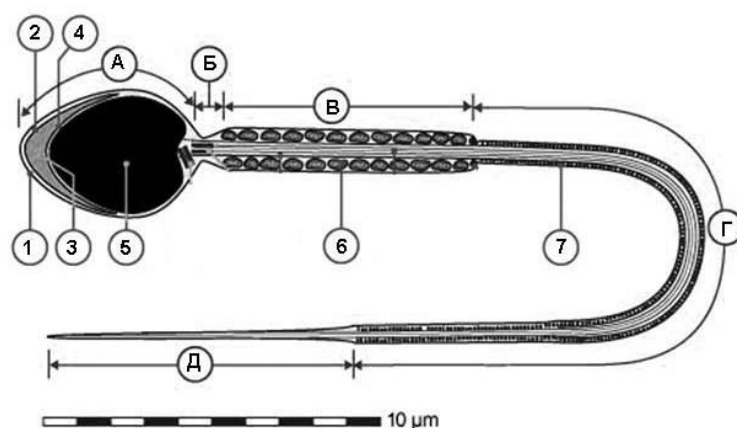


Рис. 2.9. Строение зрелого сперматозоида
(Human Embriology online, с изменениями)

А – головка, Б – шейка, В, Г, Д – передняя, средняя и
концевая части жгутика

- 1 – плазматическая мембрана, 2 – наружная мембрана акросомы,
3 – акосома, 4 – внутренняя мембрана акросомы, 5 – ядро,
6 – митохондрии, 7 – фибриллы жгутика

В шейке собраны митохондрии, они обеспечивают энергией движение жгутика, и находится центриоль, к которой крепится жгутик. Двигательную структуру жгутика называют аксонемой. Она собрана из тубулиновых микротрубочек. Стержень аксонемы состоит из двух одиночных микротрубочек, окруженных кольцом из девяти двойных микротрубочек. С микротрубочками ассоциирован другой белок — динеин, который обладает АТФ-азной активностью и способен преобразовывать химическую энергию гидролиза АТФ в механическую энергию движения жгутика.

Яйцеклетка

Овулировавший ооцит принято называть яйцом. Яйцеклетки млекопитающих намного меньше по размерам, чем яйцеклетки других позвоночных. Диаметр яиц грызунов составляет в среднем 80 мкм, приматов — 120 мкм, у кроликов и копытных животных он достигает 140 мкм. У большинства млекопитающих в момент овуляции ооцит находится на метафазе второго деления мейоза. Для его структурной организации характерно наличие под плазматической мембраной слоя фибриллярного актина и слоя кортикальных гранул, которые содержат протеолитические ферменты. Еще одной типичной чертой считают мозаичное распределение микроворсинок на плазматической мембране: та её часть, под которой находится мейотическое веретено, лишена микроворсинок.

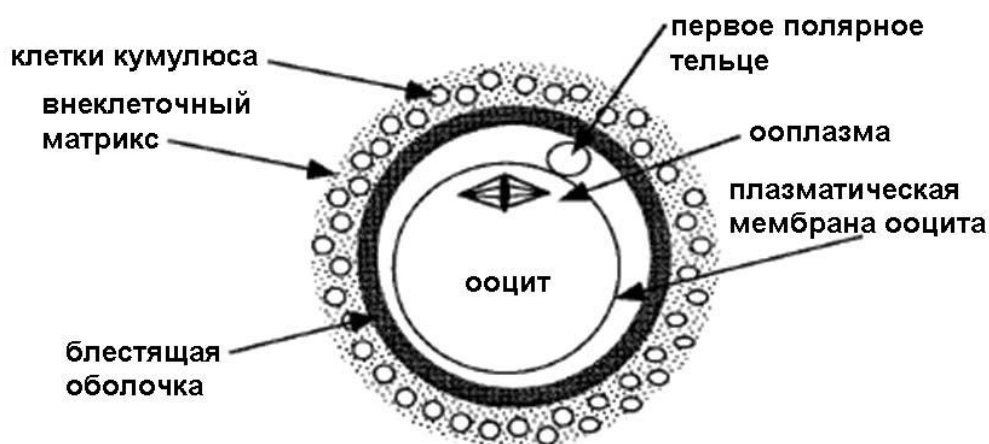


Рис. 2.10. Внешние оболочки ооцита

Яйцеклетка овулирует, будучи окруженной внешними оболочками (рис.2.10). К ним относят блестящую оболочку и лучистый венец, который является частью кумулюса.

Ближе к яйцеклетке расположена блестящая оболочка, и поскольку она не прилегает вплотную к плазматической мембране, между яйцом и оболочкой остается **перивителлиновое пространство**. В процессе оогенеза блестящая оболочка (zona pellucida, ZP) формируется в результате секреторной деятельности самого ооцита и окружающих его фолликулярных клеток. Ооцит первого порядка уже окружен блестящей оболочкой. Толщина ее растет по мере роста ооцита и достигает максимальных величин у преовуляторных ооцитов. Через блестящую оболочку способны проходить отростки фолликулярных клеток, чтобы образовывать щелевые контакты с плазматической мембраной яйцеклетки.

Блестящая оболочка представляет собой сложную композицию внеклеточных гликопротеинов, которые получили название **белков зоны** (zona proteins). У разных видов млекопитающих в состав данной оболочки входят три или четыре различных гликопротеина: ZP1, ZP2, ZP3 и, возможно, ZP4. ZP3 является основным компонентом блестящей оболочки. Он обеспечивает присоединение спермия к яйцеклетке. После того, как первый спермий сольется с яйцом, ZP3 модифицируется, и контакт других спермиев с блестящей оболочкой становится невозможным. Интересно, что яйцеклетка и спермий, принадлежащие разным видам млекопитающих, связаться друг с другом не смогут, так как ZP3 действует видоспецифично, и «не узнает» чужака. Это ограничение можно преодолеть, удалив блестящую оболочку. Она легко разрушается протеолитическими ферментами, и лидирующий спермий именно так прокладывает себе дорогу к плазматической мембране яйца при оплодотворении. Если же в условиях *in vitro* очистить яйцеклетки от оболочек, то можно оплодотворить их спермой другого вида и получить межвидовые гибриды, правда, в большинстве случаев их развитие будет ограничено лишь начальными этапами.

После оплодотворения блестящая оболочка не исчезает, она будет окружать дробящийся эмбрион вплоть до начала имплантации.

Диаметр блестящей оболочки не меняется, и зародыш вынужден проходить многочисленные деления дробления в условиях замкнутого ограниченного пространства, что обеспечивает компактность и упорядоченность трехмерного расположения бластомеров. Тесное прилегание плазматических мембран сестринских бластомеров создает условия для правильного формирования межклеточных контактов и для увеличения количества таких контактов. Если блестящую оболочку удалить, дробление зародышей продолжится, но теперь бластомеры будут образовывать клеточные цепочки, где каждый из них находится в контакте только с двумя своими соседями. В противоположность этому, каждый из бластомеров зародыша, развивающегося внутри оболочки, формирует в зависимости от стадии развития контакты с двумя-восемью соседями.

Бластомеры зародышей ранних стадий развития обладают высокой адгезивностью, поэтому лишенные блестящей оболочки эмбрионы легко слипаются между собой или прилипают к эпителию, выстилающему репродуктивный тракт. Изолируя зародыши друг от друга и окружающих тканей, блестящая оболочка предотвращает появление дефектных эмбрионов, их гибель или внематочную имплантацию.

Лучистый венец граничит с блестящей оболочкой и состоит из фолликулярных клеток и внеклеточного матрикса. Основу матрикса образует гиалуроновая кислота, которая дополнена несколькими чувствительными к гиалуронидазе и протеолитическим ферментам гликопротеинами. Объем такой кумулюсной массы намного больше, чем объем самой яйцеклетки и это облегчает захват яйца воронкой яйцевода. В процессе миграции яйцеклетки по ампуле яйцевода, клетки кумулюса взаимодействуют с реснитчатыми эпителиальными клетками яйцевода, что и обеспечивает перемещение яйца. В зоне оплодотворения кумулюсная масса почти разрушается, в первую очередь под действием гиалуронидазы спермиев, но окончательно

яйцо очищается от фолликулярных клеток только после оплодотворения.

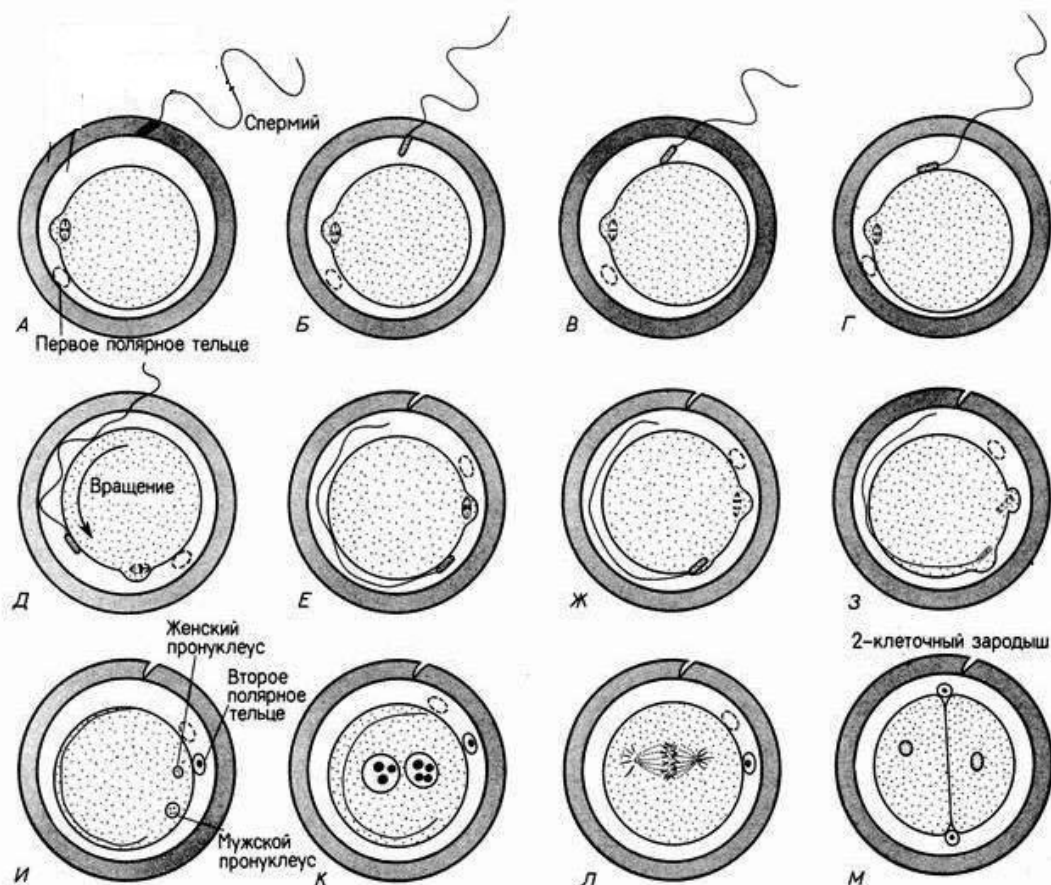


Рис. 2.11. Оплодотворение (Гилберт, 1993)

2.4.2. Последовательность событий при оплодотворении

В процессе оплодотворения (рис. 2.11) можно выделить несколько групп событий:

1. дистантное взаимодействие гамет — события, происходящие до соприкосновения яйцеклетки и спермия;
2. контактное взаимодействие гамет — события, происходящие при прямом соприкосновении поверхностей гамет;
3. группа событий, происходящих после проникновения сперматозоида в яйцеклетку, куда включают активацию метаболизма

яйца и объединение отцовского и материнского генетического материала.

Биологическая роль **дистантных взаимодействий гамет** заключается в повышении вероятности встречи яйцеклетки со спермием. В случае внутреннего оплодотворения этот этап не столь важен, как при внешнем, однако дистантные взаимодействия гамет сохранились и у млекопитающих. Сперма в составе эякулята, который представляет собой смесь сперматозоидов с секретами простаты и семенных пузырьков, попадает в шейку матки. Активнодвигающиеся спермии проходят первый барьер, которым является цервикальная слизь, и продолжают двигаться вверх по репродуктивному тракту. В это время они проходят капацитацию и приобретают оплодотворяющую способность. Правильное направление движения сперматозоиды сохраняют благодаря явлению реотаксиса — их способности двигаться против встречного тока жидкости в маточных трубах. Когда спермии попадают в верхний отдел яйцевода, направление движения контролируется при помощи стереотаксиса — механизма, который позволяет распознавать изолированные крупные объекты, какими являются кумулюсные массы с заключенными в них яйцеклетками. Помимо этого, клетки кумулюса выделяют привлекающие спермии вещества (аттрактанты), и явление хемотаксиса позволяет завершить взаимное распознавание гамет. Наиболее подвижные спермии проникают между клетками кумулюса и подходят к блестящей оболочке яйцеклетки.

Контактное взаимодействие гамет начинается в момент соприкосновения плазматической мембраны головки лидирующего спермия с блестящей оболочкой яйца (рис.2.12). Первичное связывание гамет происходит при участии молекул клеточной адгезии. Со стороны спермия ключевую роль на этом этапе играет фермент галактозилтрансфераза.

У некапацитированных спермиев данный фермент неактивен, так как связан со стабилизирующим гликопротеином

галактозамингликаном. В процессе капацитации галактозамингликан удаляется с поверхности головки спермия, и молекулы адгезии приобретают функциональную активность.

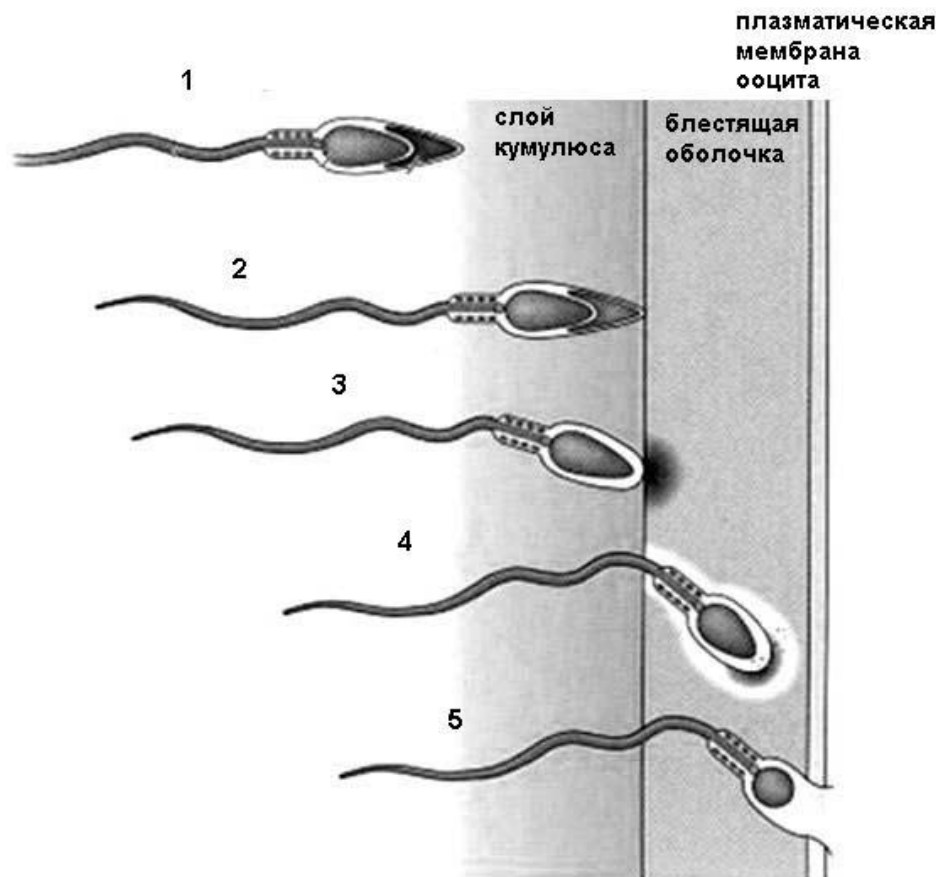


Рис. 2.12. Контактные взаимодействия гамет:
(Гилберт, 1993 с изменениями)

- 1 – сперматозоид приближается к кумулюсной массе, в центре которой находится ооцит, 2 – сперматозоид проникает сквозь кумулюс и соприкасается с блестящей оболочкой, 3 – акросомная реакция, 4 – сперматозоид преодолевает блестящую оболочку и оказывается рядом с плазматической мембраной яйцеклетки, 5 – плазматические мембраны спермия и яйцеклетки сливаются

Со стороны яйцеклетки в первичном связывании гамет участвует белок блестящей оболочки ZP3. Он имеет доступные для связывания N-ацетилглюкозаминовые остатки, с которыми по

принципу «замок-ключ» взаимодействует галактозилтрансфераза. Фиксированное положение спермия на яйце позволяет обеспечить воздействие высокой концентрации ферментов на небольшой участок блестящей оболочки во время акросомной реакции.

Акросомной реакцией называют процесс разборки оболочки акросомной гранулы спермия, экзоцитоз содержащихся в ней гидролитических ферментов и разрушения ограниченного участка блестящей оболочки яйца под действием этих ферментов. В результате акросомной реакции спермий проникает в перивителлиновое пространство и оказывается в непосредственной близости от плазматической мембраны яйца. Сигналом начала акросомной реакции является связывание специфического рецептора на плазматической мембране спермия с белком ZP3. Это событие приводит к активации тирозинкиназы мембраны спермия и, через ряд промежуточных реакций, к увеличению в цитоплазме спермия концентрации двухвалентных ионов кальция. Подъем концентрации ионов кальция, в свою очередь, вызывает изменение структуры цитоскелета, и в результате акросомная и плазматическая мембраны спермия сливаются, а ферментная смесь из акросомы попадает на блестящую оболочку. Основным ферментом акросомной гранулы является **акрозин**. Он разрушает ZP2, в блестящей оболочке появляется впячивание. Активно двигаясь, спермий начинает проталкиваться через блестящую оболочку, на которую продолжает действовать акрозин, связанный с мембраной головки спермия, и через 5-15 мин. спермий попадает в перивителлиновое пространство. У многих видов млекопитающих акросомная реакция активирует первый из механизмов предотвращения полиспермного оплодотворения. Таким механизмом является модификация белков блестящей оболочки, в результате которой становится невозможной как инициация акросомной реакции другими спермиями, так и успешное преодоление ими блестящей оболочки. Некоторые виды (например, кролик) лишены данного механизма, и у них, по

окончании акросомной реакции, у плазматической мембраны яйца могут оказаться несколько спермиев, а моноспермное оплодотворение обеспечивается другим образом.

Предшествующее слиянию гамет соприкосновение их плазматических мембран происходит между экваториальным сегментом мембраны головки спермия и любым покрытым микроворсинками участком мембраны яйцеклетки. Поскольку лишенный микроворсинок участок мембраны соответствует месту расположения в яйцеклетке метафазной пластинки мейоза II, неспособность спермия связаться с этим «голым» участком плазматической мембраны предотвращает внедрение ядра спермия в опасной близости от мейотического веретена, что могло бы привести к повреждению последнего.

Слияние мембран спермия и яйца осуществляется при участии специфических белков. В мембране яйцеклетки локализованы молекулы **анинтегрина**, а экваториальный сегмент мембраны спермия содержит **фертилин**. Взаимодействие белков приводит к встраиванию плазматической мембраны спермия в мембрану яйцеклетки, что дает возможность ядру, центриоли, митохондриям и микротрубочкам спермия попасть в цитоплазму яйца. Все цитоплазматические органеллы вскоре разрушаются, однако даже временное присутствие в определенном районе цитоплазмы яйцеклетки компонентов спермия оказывает контролирующее влияние на развитие зародыша. Показано, что бластомер, который получил такой участок цитоплазмы, после первого деления дробления первым вступает и во второе деление, а это значит, что для потомков такого бластомера выше вероятность дифференцироваться в клетки трофобласта, о чем подробно будет сказано при рассмотрении эмбрионального развития. В том месте, где спермий слился с яйцеклеткой, происходит локальное изменение структуры её плазматической мембраны и субкортикального слоя цитоплазмы. Мембрана выпячивается, теряя микроворсинки, и образует конус

оплодотворения. Под ним в цитоплазме формируется локальное скопление актиновых микрофиламентов.

Активация метаболизма яйцеклетки происходит при её слиянии со спермием, но также может быть вызвана иными стимулами (микротравма, действие Ca^{2+} -ионофоров), что приведет к началу развития партеногенетического зародыша. Следовательно, спермий (или другой активирующий стимул) инициирует реализацию той метаболической программы, которая уже запрограммирована в яйцеклетке. В активированном яйце возобновляется и доходит до конца второе деление мейоза, начинается синтез ДНК, идет активная трансляция с матриц мРНК, накопленных в период большого роста ооцита, иными словами, осуществляется подготовка к началу дробления.

Во время оплодотворения, в первые секунды после контакта первого спермия с плазматической мембраной яйцеклетки резко возрастает проницаемость мембраны для ионов Na^+ , что приводит к кратковременному изменению мембранного потенциала от -70 мВ до +10 мВ. Такая положительно заряженная мембрана становится неспособной к слиянию с другими спермиями. Данное явление получило название **быстрого блока полиспермии**, длительность его действия составляет около минуты.

Далее начинает осуществляться **медленный блок полиспермии**, или **кортикальная реакция**. Так называют кальций-зависимый экзоцитоз кортикальных гранул ооцита. Они являются производным комплекса Гольджи, формируются в период большого роста ооцита, и в овулировавшем яйце расположены непосредственно под плазматической мембраной. Во время кортикальной реакции содержимое кортикальных гранул попадает в перивителлиновое пространство и на внутреннюю поверхность блестящей оболочки. Гранулы содержат ряд веществ, вызывающих структурно-функциональные изменения блестящей оболочки. Протеазы разрушают рецепторы, необходимые для первичного связывания

гамет, карбогидразы вызывают отвердевание оболочки, сульфомукополисахариды, увеличиваясь в объеме, отодвигают блестящую оболочку от яйцеклетки. Модифицированную блестящую оболочку называют **оболочкой оплодотворения**.

Весь комплекс событий активации метаболизма яйцеклетки связан с функционированием **инозитолфосфатной системы** (рис.2.13), которое осуществляется по каскадному принципу. Контакт спермия со специфическими рецепторами плазматической мембраны яйцеклетки вызывает активацию GTF-связывающего мембранного белка (G белка). Он, в свою очередь, активирует фосфолипазу C. Фермент расщепляет входящие в состав мембраны инозитолфосфолипиды на два компонента — **диацилглицерол** и **инозитолтрифосфат**, являющийся переносчиком внутриклеточных сигналов. Первый из указанных компонентов остается в составе плазматической мембраны, а второй перемещается цитоплазму.

Инозитолтрифосфат действует на цистерны эндоплазматической сети и вызывает высвобождение свободного кальция, депонированного в этих клеточных органеллах. Происходит кратковременное повышение концентрации кальция, которое повторяется несколько раз, составляя серию. Такие кальциевые осцилляции являются иницирующим сигналом самых разнообразных метаболических процессов, первым из которых является кортикальная реакция. Следует также отметить активацию НАД⁺-киназы, что необходимо для синтеза новых липидных компонентов мембраны, а также увеличение потребления кислорода оплодотворенным яйцом.

Диацилглицерол активирует протеинкиназу C, что, в свою очередь, вызывает активацию мембранного транспортного белка, откачивающего из клетки ионы водорода. Кислотность цитоплазмы возрастает, и этот уровень pH будет сохраняться далее в дробящемся зародыше.

Повышение рН деблокирует активность запасенных яйцеклеткой во время оогенеза мРНК и рибосом, стимулирует синтез

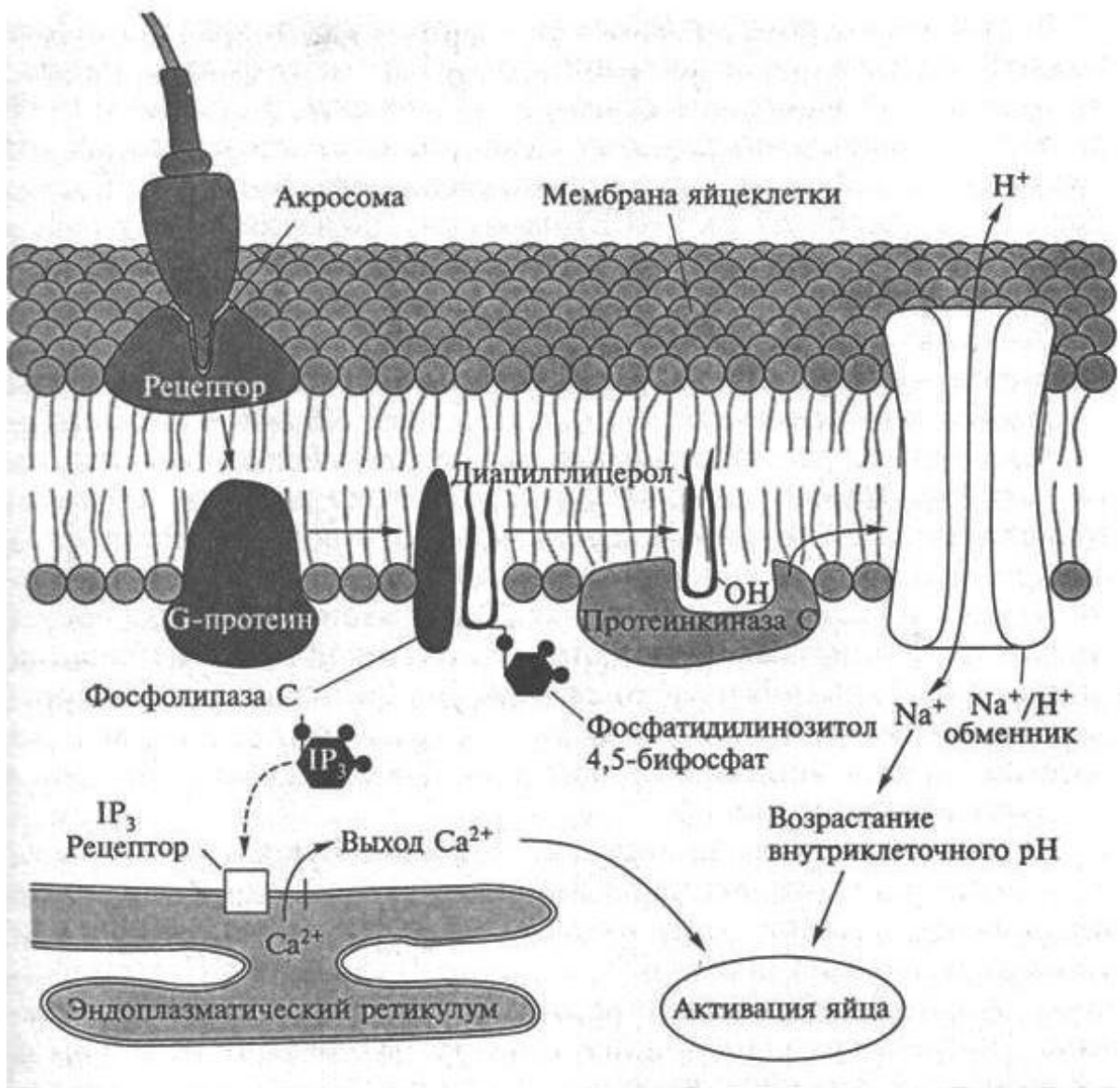


Рис. 2.13. Схема активации метаболизма яйцеклетки. (Гилберт, 1991)

белков и их посттрансляционную модификацию, инициирует синтез ДНК.

Активация ооцита является необходимым условием для завершения им второго деления мейоза. Подъем концентрации кальция в цитоплазме вызывает активацию белка кальмодулина, который через ряд промежуточных реакций инициирует ферментативное разрушение ЦСФ, после чего сразу же происходит

деградация МИФ на циклин В и киназу. Метафаза мейоза II завершается, и деление проходит до конца. Во время цитокинеза в цитоплазме яйца остается гаплоидный набор материнских хромосом, а избыточный гаплоидный набор выделяется в составе второго направительного тельца.

Результатом оплодотворения является формирование одноклеточного зародыша — **зиготы**.

2.5. РАННЕЕ ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ

Раннее эмбриональное развитие включает в себя доимплантационное развитие зародыша и период имплантации.

В течение доимплантационного периода эмбрионы развиваются автономно, они свободно перемещаются по репродуктивному тракту самки, который создает благоприятное для зародышей микроокружение.

Выделяют следующие стадии доимплантационного развития:

1. Стадия зиготы; одноклеточный зародыш.
2. Ранние этапы дробления; зародыш состоит из 2 – 8 бластомеров.
3. Поздние этапы дробления, компактизация зародыша; зародыш состоит из 8 – 32 бластомеров.
4. Формирование и развитие бластоцисты; в зародыше от 64 до 150 бластомеров.

2.5.1. Одноклеточный зародыш на стадии пронуклеусов

Через 2-3 часа после завершения слияния спермия и яйцеклетки в цитоплазме зиготы можно видеть два ядра. Они намного крупнее ядер соматических клеток и содержат деконденсированный хроматин и проядрышки. Ядра зиготы получили название **пронуклеусов**. Одноклеточный зародыш содержит более крупный мужской пронуклеус и женский пронуклеус меньшего размера. Формирование

пронуклеусов происходит независимо друг от друга и с разной скоростью, но контролируется этот процесс в обоих случаях одинаково — цитоплазматическими факторами, накопленными ооцитом во время оогенеза. В процессе формирования пронуклеусов происходит первый раунд репликации ДНК, во время которого хроматин ремоделируется и приобретает организацию, необходимую для дальнейшей стадиоспецифической и тканеспецифической регуляции экспрессии эмбриональных генов. По ходу репликации ДНК пронуклеусы увеличиваются в размерах, становятся видны различия между ними. Мужской крупнее, так как его хроматин более деконденсирован, но при этом темп развития мужского пронуклеуса ниже, чем женского, поскольку ему необходимо больше времени на сложную реорганизацию.

Женский пронуклеус начинает формироваться сразу после выделения второго направительного тельца. Оставшиеся в ооците хромосомы деконденсируются, происходит их частичное деметилирование, и вокруг них происходит сборка ядерной мембраны.

Трансформация головки спермия в мужской пронуклеус является более сложным процессом. Как только ядро спермия попадает в цитоплазму яйцеклетки, его ядерная оболочка разрушается и хроматин вступает во взаимодействие с цитоплазмой яйца. Хроматин деконденсируется и проходит структурную реорганизацию (ремоделирование): протамины отсоединяются от ДНК, и она переупаковывается с использованием гистонов ооцитного происхождения. Такая более рыхлая упаковка хроматина необходима для последующего восстановления активности отцовских генов (сверхконденсированный хроматин головки спермия транскрипционно неактивен). Параллельно с переупаковкой отцовского хроматина происходит его активное деметилирование. Далее, вокруг хроматина из цитоплазматических компонентов ооцитного происхождения заново образуется ядерная мембрана. В

отличие от непроницаемой оболочки ядра спермия, она имеет поровые комплексы, обеспечивающие ядерно-цитоплазматический транспорт. Таким образом, мужской пронуклеус имеет смешанное строение: он состоит из хроматина отцовского происхождения и ядерной оболочки материнского происхождения.

Одновременно со структурной реорганизацией, пронуклеусы начинают сближаться, совершая сложные движения, которые получили название «танца пронуклеусов». Ведущую роль на этом этапе играет центриоль сперматозоида, которая делится, формируя две centrosомы. В свою очередь, centrosомы служат основой для полимеризации микротрубочек, которые сначала стягивают пронуклеусы к центру зиготы, а затем формируют веретено первого деления зародыша.

Объединение мужского и женского генетического материала происходит во время метафазы первого деления дробления, когда группы хромосом отцовского и материнского происхождения выстраиваются на едином веретене деления. Для этого пронуклеусы должны сблизиться, что и происходит в процессе их миграции. До начала формирования веретена деления пронуклеусы располагаются рядом, но не сливаются. В конце стадии зиготы отмечается ограниченная транскрипция группы генов домашнего хозяйства в мужском пронуклеусе, и такую транскрипционную активность считают одним из ранних событий активации эмбрионального генома.

У млекопитающих невозможно развитие взрослой особи из активированного, но неоплодотворенного яйца (полное партеногенетическое развитие). Так способны размножаться многие беспозвоночные животные (например, пчелы и тутовый шелкопряд). Партеногенетические зародыши млекопитающих были впервые получены из ооцитов мыши. После овуляции у них искусственно активировали метаболизм, одновременно подавляя при помощи цитохалазина выделение второго направительного тельца, и тем

самым, сохраняя клетку в диплоидном состоянии. В результате формировались два женских пронуклеуса, и партеногенетическая зигота успешно проходила первое деление дробления. Жизнеспособность таких эмбрионов была намного ниже, чем двуродительских, но все же партеногенетические эмбрионы оказались способны дробиться, имплантироваться и развиваться далее, вплоть до времени формирования сомитов. Однако затем они гибли, а в ходе посмертных исследований у зародышей были обнаружены многочисленные отклонения в развитии тканей и органов.

На основании многочисленных наблюдений за развитием нормальных и партеногенетических зародышей было высказано предположение, что мужской и женский геном имеют функциональные различия и для обеспечения эмбрионального развития должны дополнять друг друга. Функциональная асимметрия родительских геномов была достоверно показана в экспериментах по микрохирургической реконструкции эмбрионов. Было создано два варианта однородительских диплоидных зародышей. Для получения **гиногенетических** зародышей из зиготы извлекали мужской пронуклеус и заменяли его женским из другой зиготы. **Андрогенетические** эмбрионы содержали два мужских пронуклеуса. Способность к развитию обоих типов однородительских зародышей не отличалась от той, что демонстрировали партеногенетические эмбрионы, и, как и партеногенетические, они погибали задолго до рождения. Таким образом, было подтверждено предположение о том, что для успешного завершения зародышем внутриутробного периода развития необходимо, чтобы в состав эмбрионального генома был включен и женский, и мужской генетический материал.

2.5.2. Общая характеристика дробления млекопитающих

Дробление – многократное митотическое деление эмбриона, в результате которого он становится многоклеточным. Во время дробления зародыш не растет, и объем цитоплазмы, первоначально

содержавшийся в зиготе, последовательно делится на всё большее количество клеток — бластомеров. Согласно общепринятой классификации, у млекопитающих голобластическое равномерное ротационное асинхронное дробление.

Внутриутробное развитие чрезвычайно затруднило изучение процесса дробления у млекопитающих, и основной объем информации об этом периоде эмбриогенеза был получен только после разработки методов культивирования эмбрионов млекопитающих *in vitro*. Но и теперь невысокая плодовитость млекопитающих, маленький размер зародышей (диаметр зиготы мыши составляет 100 мкм) и их чрезвычайная чувствительность к изменениям физико-химических свойств культуральной среды создают дополнительные сложности для наблюдений.

Дробление млекопитающих имеет ряд уникальных особенностей.

1. Среди животных это самое медленное дробление. Первые циклы клеточного деления по продолжительности приближаются к клеточным циклам соматических клеток. Так, у мыши одноклеточная и двухклеточная стадии развития длятся до 20 часов, четырехклеточная — около 12 часов. В клеточных циклах присутствуют все четыре фазы.

2. Млекопитающие имеют редко встречающийся в животном мире тип дробления — ротационный, или чередующийся. При таком дроблении, начиная со второго деления дробления, отмечается специфическая ориентация борозд дробления. Один из двух сестринских бластомеров делится экваториально, а другой меридианально.

3. Бластомеры в зародыше делятся асинхронно, поэтому эмбрион может состоять из нечетного числа клеток.

4. Для млекопитающих характерна ранняя активация транскрипции эмбриональных генов. Зигота имеет запас метаболитов, накопленных в оогенезе, но он невелик (яйцеклетки у

млекопитающих олиголецитальные) и расходуется в течение нескольких делений дробления. Возникает необходимость начать синтез нужных для развития молекул, и решается эта задача через активацию эмбриональной транскрипции. Наиболее ранняя **активация эмбрионального генома (АЭГ)** отмечается у мыши (на двухклеточной стадии развития), у большинства животных она происходит на 4-8-клеточной стадии, и самая поздняя активация эмбрионального генома характерна для овец и крупного рогатого скота (8-16-клеточная стадия развития).

5. Уникальной чертой дробления млекопитающих является **компактизация** зародыша, которая происходит на восьмиклеточной стадии развития. В процессе компактизации в эмбрионе создается система упорядоченных межклеточных контактов. Благодаря этому осуществляется структурная реорганизация бластомеров, что создает условия для начала дифференцировки клеток, в результате которой в составе зародыша формируются две клеточные линии — **трофобласт** и **внутренняя клеточная масса**.

2.5.3. Зародыши ранних стадий дробления

Начиная с двухклеточной, и до середины восьмиклеточной стадии развития зародыш представляет собой рыхлую группу округлых неполяризованных клеток, плазматические мембраны которых хоть и прилегают друг к другу, но не образуют межклеточных контактов. Сестринские бластомеры (потомки одного бластомера более ранней стадии) соединены только остатками веретена деления.

Именно на ранних стадиях дробления у большинства видов млекопитающих происходит **активация эмбрионального генома (АЭГ)**, под которой понимают поэтапное появление транскрипционной активности разнообразных эмбриональных генов.

Следует пояснить, что для раннего развития млекопитающих характерно двойное генетическое обеспечение. С одной стороны,

осуществление генетической программы развития регулируется действием генопродуктов, накопленных во время оогенеза, (материнская программа развития). Материнский контроль развития реализуется на посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях через действие цитоплазматических факторов материнского происхождения.

С другой стороны, уже на ранних стадиях дробления хромосомы зародыша начинают проявлять транскрипционную активность (т. е. происходит активация эмбрионального генома и иницируется эмбриональная программа развития), в результате чего генопродукты, являющиеся результатом транскрипции и трансляции генов зародыша достаточно рано начинают оказывать влияние на ход эмбриогенеза.

Помимо перечисленных механизмов, ранние этапы развития контролируются также и при помощи особой системы биологических ритмов — «зиготических часов», которая является основным механизмом эпигеномного контроля развития. Биологической функцией «зиготических часов» является недопущение начала транскрипции до тех пор, пока хромосомы обоих родительских наборов не пройдут структурную реорганизацию, и не будут созданы условия для работы механизмов регуляции транскрипции. Репрессия транскрипции будет продолжаться только до тех пор, пока зародыш не достигнет определенного биологического возраста (у мыши это 20 час. от оплодотворения). После этого АЭГ произойдет независимо от того, готов к нему геном эмбриона или нет.

Наиболее детально активация эмбрионального генома изучена у мыши, где она проходит в три этапа. Первый этап АЭГ регистрируется еще на стадии зиготы, когда в конце данной стадии активируется группа генов домашнего хозяйства в мужском пронуклеусе. Их генопродукты (в первую очередь — транскрипционные факторы) необходимы для осуществления последующих этапов АЭГ и появляются в зародыше на двухклеточной стадии.

Следующим этапом АЭГ считают нарастание транскрипционной активности в течение фазы G_1 второго клеточного цикла (малый пик транскрипции). В цитоплазме бластомеров зародыша одновременно присутствуют и транслируются мРНК материнского и эмбрионального происхождения.

Третий и основной этап АЭГ — большой пик транскрипционной активности на фазе G_2 второго клеточного цикла. В это время появляются многочисленные и разнообразные мРНК эмбрионального происхождения. Параллельно с этим, материнские РНК начинают быстро разрушаться, однако синтезированные с их помощью генопродукты будут присутствовать в цитоплазме и оказывать влияние на развитие эмбриона вплоть до стадии бластоцисты.

Через механизм АЭГ в эмбриогенезе решаются следующие задачи: зародыш получает возможность транскрибировать собственные гены; формируется система регуляции транскрипции многочисленных генов; происходит согласование по времени начала эмбриональной транскрипции с другими событиями эмбрионального развития.

До завершения АЭГ бластомеры зародыша являются тотипотентными клетками. **Тотипотентность** — это способность клеток давать начало всем типам клеток и тканей, включая клетки зародышевой линии. Если в зародыше от двух- до восьмиклеточной стадии развития разрушить все бластомеры кроме одного, то из оставшегося благополучно разовьется здоровый и плодовитый организм. Оставить в живых можно любой из бластомеров, результат будет одинаковым. Если один из бластомеров извлечь из зародыша и добавить к бластомерам другого, то «чужой» бластомер включится в формирование эмбриона и его потомки могут попасть в состав любой эмбриональной или экстраэмбриональной ткани.

Длительность периода времени, в течение которого бластомеры зародыша остаются тотипотентными зависит от срока АЭГ у данного вида животных. Бластомеры мыши тотипотентны только до конца

двухклеточной стадии развития, в то время как овцы и коровы — вплоть до шестнадцатиклеточной.

2.5.4. Зародыши поздних стадий дробления

Начиная с восьмиклеточной стадии развития, дробящийся зародыш, который не имеет внутренней полости, называют **морулой**. В начале данной стадии эмбрион все еще состоит из почти не связанных между собой округлых неполярных бластомеров, и в нем отчетливо просматриваются границы отдельных клеток. Такой зародыш является **некомпактизированной морулой**. С середины восьмиклеточной стадии начинается первый этап процесса первичной цитодифференцировки — компактизация эмбриона, которая сопровождается поляризацией составляющих его бластомеров. К концу стадии зародыш приобретает вид плотного клеточного шара, границы составляющих его бластомеров неразличимы. Говорят о формировании **компактизированной морулы** (рис. 2.14).

Компактизация зародыша не встречается нигде в животном мире, кроме как у млекопитающих. Это многостадийный процесс, составляющие его изменения происходят в кортикальной зоне бластомеров и в цитоплазме.

Первым этапом компактизации является адгезия бластомеров. Результатом этого процесса является утрата бластомерами округлой формы и то, что они плотно прижимаются друг к другу, образуя адгезивные контакты. Формирование адгезивных контактов обеспечивается действием мультимолекулярного комплекса, в состав которого входят молекула клеточной адгезии **увоморулин** и стабилизирующие её положение в составе мембраны белки **α -** и **β -катенины**, а также актин.

Увоморулин, состоящий из внеклеточного и внутриклеточного доменов, является гликопротеином и функционирует на поверхности микроворсинок. В некомпактизированной моруле микроворсинки соседних бластомеров переплетаются, но не взаимодействуют между

собой. Увоморулин входит в состав плазматических мембран некомпактизованных бластомеров, однако весь комплекс пока находится в инактивированном состоянии. Его активирует протеинкиназа C, фосфорилируя β -катенин, который после этого присоединяется к актину и α -катенину, модифицируя внутриклеточный домен увоморулина. Вслед за этим изменяется конформация внеклеточного домена, и он приобретает адгезивные свойства, «становится липким». Молекулы увоморулина на мембранах соседних бластомеров начинают связываться друг с другом, постепенно вовлекая в этот процесс все новые участки мембран. Формируется множество адгезивных контактов, вследствие чего бластомеры плотно прижимаются друг к другу и изменяют форму.

Адгезия бластомеров является индуктором и ориентирующим фактором для поляризации бластомеров. Поляризация проходит параллельно с изменением формы бластомеров и существенно изменяет их внутреннюю организацию. Выделяют кортикальную и цитоплазматическую поляризацию. В зоне цитокортекса микроворсинки остаются только на наружных частях мембран бластомеров, а актиновые филаменты микроворсинок стабилизируются. В кортикальную зону мигрируют ассоциированные с актином белки, лектиновые рецепторы. На нижнем и боковых доменах плазматической мембраны бластомеров начинают образовываться полупроницаемые щелевые контакты, что меняет систему межбластомерной коммуникации.

После поляризации мембраны апикальный (верхний) и базолатеральный (нижний и боковые) её домены начинают играть роль полюсов апико-базальной оси бластомера, определяя направление поляризации цитоплазматических компонентов. В ходе поляризации микротрубочки образуют апикальную и базальную субпопуляции, в апикальную часть сдвигаются молекулы клатрина и

эндосомы, поскольку именно здесь в дальнейшем будет проходить экзо- и эндоцитоз, ядро клетки сдвигается вниз.

К концу восьмиклеточной стадии развития компактизованная морула состоит из поляризованных бластомеров

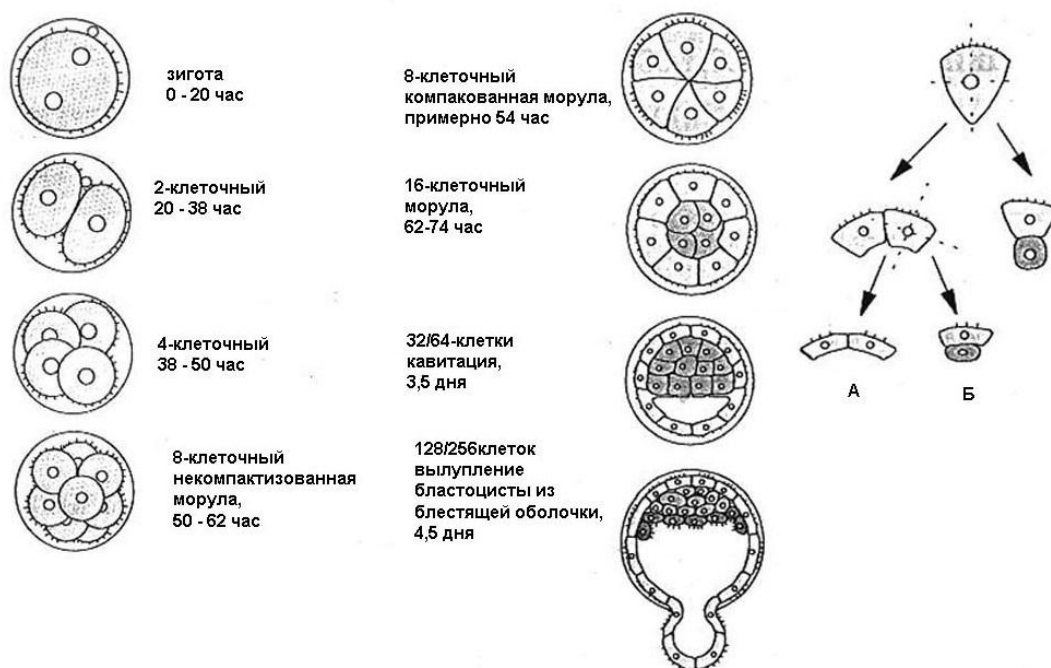


Рис. 2.14. Этапы первичной цитодифференцировки в зародыше мыши (Fleming, 1989 с изменениями)

А – консервативное деление клеток трофэктодермы,
Б – дифференцирующее деление

с протоэпителиальным фенотипом. Далее проходят митозы четвертого деления дробления и переход на 16-клеточную стадию. Для осуществления митозов эмбрионы декомпактизуются.

Так как при чередующемся типе дробления возможны два варианта ориентации веретена деления, то потомками каждого из бластомеров могут быть либо две поляризованные клетки, либо поляризованная и аполярная клетка (рис.2.14). Две поляризованные клетки с протоэпителиальным фенотипом появляются в результате так называемого консервативного деления, когда оба потомка

получают фрагмент апикального домена мембраны с микроворсинками. Если апикальный домен наследует только один из потомков, то говорят о дифференцирующем делении. В этом случае после завершения митоза одна из сестринских клеток будет иметь протоэпителиальный фенотип, а вторая останется аполярной.

Бластомеры с протоэпителиальным фенотипом образуют внешний слой 16-клеточной морулы. На 32-клеточной стадии развития их дифференцировка продолжается, а за счет консервативного деления количество клеток увеличивается. Между клетками внешнего слоя постепенно формируются плотные межклеточные контакты. Такие контакты препятствуют межклеточному обмену молекулами и ионами и их проникновению к внутренним клеткам эмбриона. Внутренние бластомеры остаются аполярными, они способны к метаболической кооперации, поскольку соединены щелевыми контактами.

Таким образом, на стадии морулы в зародыше происходит первичная цитодифференцировка, и в его составе появляются две первичные клеточные линии — трофэктодерма (ТЭ) (или первичный эпителий) и внутренняя клеточная масса (ВКМ). Поздняя морула содержит 32 бластомера, в течение шестого-седьмого делений дробления количество клеток обеих линий в ней увеличивается, а далее морула преобразуется в бластоцисту.

2.5.5. Стадия бластоцисты

Стадия бластоцисты — последняя стадия доимплантационного периода эмбриогенеза, в конце которой зародыш прикрепится к стенке матки и завершит период автономного развития.

Если морула является плотным клеточным шаром, состоящим из внешнего и внутреннего слоев клеток и заключенным в блестящую оболочку, то **бластоциста** представляет собой пузырек, в котором можно выделить три части (рис.2.15). Стенка бластоцисты образована клетками **трофэктодермы (ТЭ)**, на одном из полюсов внутренней

поверхности стенки находится компактное скопление клеток **внутренней клеточной массы (ВКМ)**, а **полость бластоцисты (бластоцель)** заполнена жидкостью. В составе трофэктодермы выделяют две части. Полярной ТЭ называют ту часть, которая окружает ВКМ, а муральной ТЭ ту часть, которая составляет стенку бластоцисты. Трофэктодерму готовой к имплантации бластоцисты также называют **трофобластом**.

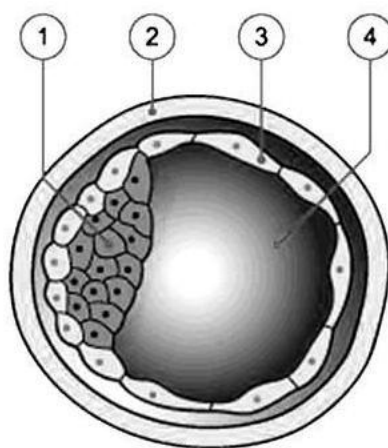


Рис. 2.15. Строение бластоцисты:
(Human Embriology online, с изменениями)
1 – внутренняя клеточная масса; 2 – блестящая оболочка;
3. – клетки трофобласта; 4 – полость бластоцисты

Бластоциста уникальна по своему строению и является эволюционным достижением млекопитающих. Можно сказать, что главной задачей доимплантационного периода развития является формирование бластоцисты – эмбриональной структуры, которая обеспечит создание связи между матерью и зародышем, а тем самым и успешное развитие эмбриона.

Бластоциста не гомологична гастрوله, она является более «юным» зародышем, и с гастролой низших позвоночных в эмбриогенезе млекопитающих нужно сопоставлять зародыш, в котором уже формируются зародышевые листки.

1. Формирование бластоцисты. Ключевым событием развития бластоцисты является формирование в эмбрионе полости и её заполнение жидкостью; этот процесс получил название **кавитация**. В процессе кавитации морула превращается в бластоцисту. Накопление жидкости внутри зародыша является результатом функционирования клеток трофэктодермы. Необходимым условием успешной кавитации является наличие плотных контактов между клетками. Контакты служат для изоляции внутреннего пространства зародыша и не позволяют жидкости вытечь из него.

Механизм кавитации основан на активном переносе ионов натрия во внутреннее пространство зародыша. Базолатеральные домены плазматических мембран клеток трофэктодермы содержат в своем составе натриевые насосы, функциональная активность которых у всех млекопитающих резко возрастает перед началом кавитации. В результате работы Na^+/K^+ -АТФ-азы в клетках формируется транс-трофэктодермальный градиент ионов. Во внутреннем пространстве зародыша увеличивается осмотическое давление, что создает условия для движения воды из окружающей среды сквозь эпителий. Поступление воды идет через водные каналы мембраны (аквапорины), которые попарно расположены на апикальном и базолатеральном участках плазматической мембраны клеток трофэктодермы. Начинается накопление жидкости между клетками внутренней клеточной массы. Эти события, в сочетании с удерживающим воду действием плотных контактов, которые препятствуют вытеканию жидкости через межклеточные зазоры, в конце концов, приводят к изменению внутренней организации зародыша. Под давлением жидкости зародыш растягивается, насколько ему позволяет блестящая оболочка, все внутренние клетки отодвигаются к одному из полюсов, образуя внутреннюю клеточную массу, а в центре эмбриона формируется полость – бластоцель. Такой способ кавитации характерен для большинства видов млекопитающих.

Зрелая бластоциста мыши состоит примерно из 80-100 клеток. Из них 20-25 входят в состав внутренней клеточной массы, но только 3 клетки станут родоначальниками всех тканей тела зародыша, а из остальных бластомеров разовьются внезародышевые органы. Более 75 % клеточного состава бластоцисты приходится на клетки трофэктодермы, которые дадут начало развитию эмбриональной части плаценты.

Для начала процесса кавитации не играет существенной роли, сколько клеточных делений прошел зародыш и сколько он содержит клеток. Важен только его возраст, то есть время от момента проникновения спермия в яйцеклетку. Сформировать нормальную бластоцисту может лишь та морула, которая к началу кавитации имела в своем составе не менее 25 клеток, однако и при низком темпе пролиферации малоклеточная морула будет трансформироваться в бластоцисту. Даже двухклеточный зародыш может компактизироваться и кавитировать, если при отсутствии клеточного деления он сохранил жизнеспособность. Однако малоклеточный зародыш будет иметь в своем составе только клетки трофэктодермы. В результате кавитации такой зародыш формирует так называемый **трофобластический пузырек** – бластоцисту, в которой отсутствует внутренняя клеточная масса. Трофобластический пузырек способен взаимодействовать с клетками эпителия стенки матки, но имплантироваться он не сможет и вскоре погибнет.

Для периода формирования бластоцисты характерным является высокий уровень транскрипционной активности в ядрах клеток трофэктодермы и внутренней клеточной массы. Экспрессируются как материнские, так и отцовские аллели генов. Формирование бластоцисты зависит в основном от того раунда транскрипции генов, который предшествует пятому делению дробления, его ингибирование блокирует кавитацию. Вместе с тем, для осуществления кавитации также необходимы и те генопродукты, которые были синтезированы ранее на стадии активации

эмбрионального генома, но оставались до нужного времени в функционально неактивном состоянии.

2. Морфофункциональные особенности клеток трофэктодермы и внутренней клеточной массы. Бластоциста объединяет в своем составе две группы клеток, обладающих двумя принципиально разными фенотипами. Клетки трофэктодермы являются дифференцированными клетками, выполняющими конкретные функции. Клетки внутренней клеточной массы находятся в недифференцированном состоянии и сохраняют высокий уровень клеточной пластичности. Оба фенотипа появляются на 32-клеточной стадии, но они пока нестабильны, и клетки как внутренней клеточной массы, так и трофэктодермы всё ещё сохраняют способность к дифференцирующему делению. Далее судьба клетки, то есть будет ли она дифференцироваться или останется в составе ВКМ, определяется действием целого ряда генетических контролирующих факторов. В частности, в экспериментах на зародышах мыши было показано, что клетки внутренней клеточной массы и трофэктодермы по-разному экспрессируют гены нескольких специфических транскрипционных факторов. Фактор *Cdx2*, наличие которого характерно для дифференцированных клеток обнаружен исключительно в клетках трофобласта, в его отсутствие первичный эпителий не формируется. Транскрипционные факторы *Oct4* и *Naipog*, которые ответственны за поддержание недифференцированного состояния клеток, синтезируются только клетками ВКМ.

Клетки трофэктодермы обладают рядом черт характерных для эпителиальных клеток. Они имеют полигональную форму, микроворсинки на апикальном домене плазматической мембраны, сложноорганизованный субкортикальный актиновый цитоскелет, поляризованную цитоплазму. Клетки ТЭ неадгезивны.

Между собой клетки ТЭ объединены несколькими типами межклеточных контактов. В верхней части клеток локализованы плотные изолирующие контакты, которые играют наиболее важную

функциональную роль в трофэктодерме, обеспечивая накопление жидкости в полости бластоцисты. Эти мембранные мультимолекулярные комплексы препятствуют диффузии молекул и ионов между клетками. Ниже располагаются щелевые полупроницаемые контакты, допускающие избирательный межклеточный обмен небольшими молекулами и поляризованными ионами, что создает возможность метаболической координации всей субпопуляции клеток трофэктодермы. Ближе к базальной части клеток клетки соединены при помощи десмосом – проницаемых контактов, которые в ТЭ выполняют по большей части функцию структурной стабилизации клеточного слоя.

Структурная организация клеток ВКМ напоминает бластомеры ранних стадий дробления. ВКМ состоит из округлых неполярных клеток, они обладают высокой адгезивностью и легко агрегируют между собой или с ранними бластомерами. Клетки ВКМ соединены контактами, сходными со щелевыми, и метаболическая активность клеток ВКМ координируется как единой клеточной популяцией. Являясь недифференцированными клетками, ВКМ сохраняют высокий уровень клеточной пластичности. Они являются **плюрипотентными** и могут давать начало всем клеточным типам, включая клетки зародышевой линии, но неспособны обеспечить развитие целого организма, как это могут делать тотипотентные зигота и бластомеры ранних зародышей.

3. Проспективные потенции частей бластоцисты

Проспективными потенциями называют способность группы клеток зародыша в процессе развития давать начало различным тканевым типам (рис. 2.16).

Бластоциста образована из клеток двух различных популяций, которые имеют четко predetermined судьбу в процессе эмбрионального развития и не могут дедифференцироваться и пойти по другому пути развития. Зародыш сможет успешно развиваться до

рождения только в том случае, если на стадии бластоцисты в нем будут присутствовать и взаимодействовать ВКМ и ТЭ.

Если микрохирургическим путем разрезать бластоцисту на две половины так, что одна будет содержать ВКМ и часть клеток ТЭ, а другая только клетки ТЭ, и далее культивировать эти половинки *in vitro*, то можно наблюдать различие в судьбе таких фрагментов зародыша. Фрагмент, содержащий только клетки ТЭ, сформирует трофобластический пузырек. Если его пересадить в матку самки, то пузырек прикрепится к стенке матки и начнет имплантироваться, но не сможет образовать ни тела зародыша, ни эмбриональную часть плаценты и погибнет. Этот опыт показывает, что клетки ВКМ необходимы для формирования тела эмбриона и что они оказывают индукционное влияние на ТЭ. Под влиянием ВКМ клетки ТЭ активно пролиферируют, и из них формируется внезародышевая эктодерма.

Второй фрагмент, содержащий ВКМ и часть ТЭ, сформирует бластоцисту меньшего размера, но способную имплантироваться и успешно развиваться дальше.

Изолированная из бластоцисты ВКМ также не сможет дать начало полноценному зародышу после её пересадки в матку, так как она неспособна имплантироваться, хотя из-за адгезивности составляющих её клеток способна прикрепиться к стенке матки. Вместе с тем, если изолированные ВКМ культивировать *in vitro*, то они будут продолжать пролиферировать и начнут образовывать колонии эмбриональных стволовых клеток. Такие клетки сохраняют столь же высокий уровень клеточной пластичности, каким обладали клетки ВКМ и являются плюрипотентными. В условиях, индуцирующих цитодифференцировку, эмбриональные стволовые клетки способны дифференцироваться во все клеточные типы.

Плюрипотентность клеток ВКМ подтверждается также результатами экспериментов по пересадке генетически маркированных клеток ВКМ в ВКМ бластоцисты-реципиента. Генетический анализ тканей и органов таких химерных организмов

показывает, что потомки пересаженных клеток ВКМ способны войти в состав любой ткани. Следует отметить, что клетки ТЭ после аналогичной пересадки можно было обнаружить только в составе трофэктодермы и её производных.



Рис. 2.16. Проспективные потенции частей бластоцисты (Гилберт, 1993)

Незадолго до имплантации, в поздней бластоцисте ВКМ разделяется на **первичную энтодерму** и **первичную эктодерму (эпибласт)**. Из первичной энтодермы в дальнейшем образуется только внезародышевая энтодерма, в то время как клетки первичной эктодермы примут участие в формировании тела зародыша и таких внезародышевых органов как амнион, аллантоис и желточный мешок. Помимо этого, потомки клеток эпибласта являются клетками-предшественниками первичных половых клеток.

4. Подготовка бластоцисты к имплантации. Бластоциста медленно спускается по яйцеводу в полость матки. К этому времени (4,5–5,5 суток от оплодотворения у разных видов животных) её клеточный состав за счет митотических делений клеток ТЭ и ВКМ увеличивается до 130-170 клеток. Всё время с момента оплодотворения развивающийся зародыш находился внутри блестящей оболочки. Изолируя эмбрион от эпителиальных клеток

стенки фаллопиевых труб, блестящая оболочка предотвращала прилипание зародыша к стенке яйцевода, что привело бы к началу внематочной беременности. Теперь же блестящая оболочка будет препятствовать имплантации, поэтому зародыш должен покинуть её. Выход эмбриона из оболочки получил название **вылупления бластоцисты**. Растворение блестящей оболочки происходит под действием ферментов, синтезируемых самим зародышем и клетками эпителия матки. В бластоцисте несколько клеток ТЭ формируют выросты и прикасаются ими к блестящей оболочке. Протеаза, выделяемая клетками, начинает разрушать оболочку. Клетки матки выделяют лизины, которые также воздействуют на оболочку, истончая её. Образуется небольшое отверстие и через него выпячивается часть ТЭ. Бластоциста начинает ритмически набухать и сокращаться, увеличивая и уменьшая давление жидкости в бластоцеле и постепенно пролезая в разрыв блестящей оболочки. После того как зародыш покинет оболочку, на его поверхности активируются молекулы адгезии и специфические рецепторы, и он становится способен прикрепиться к стенке матки. Сразу после выселения бластоциста ориентируется в матке таким образом, чтобы тот полюс, где находится ВКМ, оказался обращен к стенке матки. Положение бластоцисты при имплантации очень важно, так на начальных этапах имплантации клетки ВКМ взаимодействуют с клетками ТЭ, активизируя их проникновение в стенку матки. Ориентация бластоцисты происходит быстро и занимает в среднем 1-2 часа.

2.5.6. Имплантация

Имплантацией называют прикрепление (адгезию) зародыша к внутренней поверхности стенки матки и его последующее внедрение (инвазию) в ткани слизистой оболочки матки (эндометрия). Процесс имплантации представляет собой сложное физиологическое взаимодействие между бластоцистой и эндометрием, нарушение

которого приводит к прерыванию беременности. Имплантация имеет сложную многоступенчатую систему регуляции, компонентами которой являются эндокринная регуляция гормонами яичников, паракринная регуляция эффекторами, синтезируемыми клетками трофобласта и эндотелия, а также регуляция с использованием молекул адгезии и антиадгезии.

В ходе эмбриогенеза млекопитающих имплантация зародыша происходит одновременно с процессом гастрюляции.

1. Реорганизация трофобласта, связанная с имплантацией.

Трофэктодерма (или трофобласт) готовой к имплантации бластоцисты, является временным органом, необходимым для имплантации и формирования плаценты (рис. 2.17). После прикрепления бластоцисты к стенке матки, в ходе взаимодействия трофобласта с эндометрием, происходит изменение его строения. Из эпителиоподобного клеточного слоя он превращается в сложно организованную клеточно-симпластическую структуру.

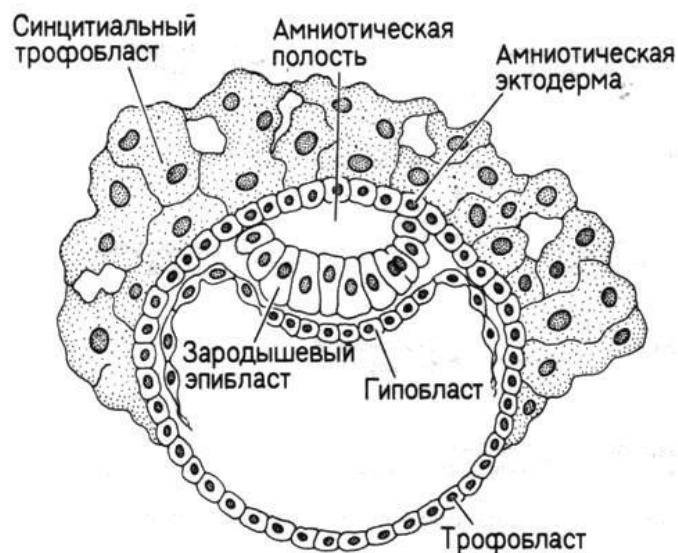


Рис. 2.17. Дифференцировка трофобласта в имплантирующейся бластоцисте (Гилберт, 1993)

Внешняя (наружная) часть трофобласта преобразуется в **синцитиотрофобласт (СТБ)**: границы между клетками исчезают, и их ядра оказываются погруженными в общую цитоплазму клеточного синцития. Внутренняя часть трофобласта сохраняет клеточное строение, ядра клеток преимущественно полиплоидные, в них активно синтезируется ДНК. Эта часть получила название **цитотрофобласта (ЦТБ)**. Цито- и синцитиотрофобласт связаны структурно и метаболически.

Во время имплантации и формирования плаценты СТБ быстро растет и ветвится. В ходе эмбриогенеза человека рост СТБ наиболее активно идет в первые 4 месяца беременности. Увеличение его объема происходит за счет слияния с СТБ части клеток ЦТБ. Активно делящиеся клетки ЦТБ поддерживают численность клеток трофобласта и постоянно пополняют СТБ новыми ядрами и цитоплазмой, обогащенной разнообразными генопродуктами. Поэтому нарушение пролиферации и дифференцировки клеток ЦТБ приводит к функциональной недостаточности плаценты и нарушению снабжения развивающегося плода кислородом и питанием.

2. Изменения эндометрия в процессе имплантации. Прикрепление бластоцисты к слизистой оболочке стенки матки становится возможным только в том случае, если последняя подготовлена к взаимодействию с зародышем, то есть, находится в рецептивном состоянии. Благоприятный для имплантации период времени (окно имплантации) открывается в конце лютеальной фазы менструального цикла. Ранее, в течение пролиферативной фазы цикла эндометрий препятствует имплантации, что выражается в том, что в составе плазматических мембран эпителиоцитов функционально активны молекулы антиадгезии, а молекулы адгезии, напротив, инактивированы. Однако в конце лютеальной фазы цикла эндометрий попадает под воздействие ЛГ, прогестерона, а также паракринных эффекторов, вырабатываемых спустившейся в матку бластоцистой. Действие этих регуляторов вызывает изменение состояния

эндометрия: активацию в мембранах клеток эпителия матки молекул адгезии, которые обеспечивают прикрепление зародыша к ее стенке.

При внедрении в слизистую оболочку зародыш выделяет протеолитические ферменты, травмирующие стенку матки, и это воздействие вызывает изменения клеток базальной пластинки эндометрия. Клетки рыхлой соединительной ткани базальной пластинки начинают активно пролиферировать, округляются, полиплоидизируются и гипертрофируются, превращаясь в **децидуальные** клетки. Позднее такие клетки приобретают способность к фагоцитозу, что на начальных стадиях имплантации позволяет контролировать скорость и направление внедрения в эндотелий клеток трофобласта. Децидуальная ткань является одним из компонентов материнской части плаценты. Во время родов она отделяется от базального слоя эндометрия и выводится из материнского организма вместе с плацентой, отсюда и возникло название данной ткани: «децидуальная» переводится как «отпадающая».

3. Основные события имплантации у человека. Через 120 часов от момента овуляции бластоциста покидает блестящую оболочку, после чего перемещается к стенке матки. К этому времени под действием гормонов и паракриновых регуляторных молекул эндотелий переходит в рецептивное состояние.

Зародыш соприкасается со стенкой матки и прилипает к ней. Адгезию бластоцисты обеспечивают трансмембранные белки интегрины, синтезируемые эпителиальными клетками эндометрия. Если матка не секретирует интегрины, то имплантации не произойдет, дефицит интегринов является одной из причин женского бесплодия.

Начинается проникновение зародыша в стенку матки, которое получило название **инвазии**. Под действием протеолитических ферментов, выделяемых клетками трофобласта, целостность эндометрия нарушается, и клетки трофобласта медленно внедряются

между эпителиальными клетками слизистой оболочки матки, постепенно продвигаясь вглубь эндотелия.

Во время внедрения в стенку матки трофобласт синтезирует несколько изоформ интегринов и всё большее количество протеаз. Интегрины обеспечивают формирование связи между ТБ и эпителиоцитами стенки матки. Трофобласт достигает базальной пластинки эндометрия и индуцирует в ней децидуальную реакцию.

СТБ и ЦТБ распространяются все шире в стенке матки и окружают кровеносные сосуды матери. В СТБ формируются полости — лакуны трофобласта.

Выросты СТБ встраиваются в стенку кровеносных сосудов, целостность сосудов нарушается и материнская кровь заполняет лакуны.

Постепенно эмбрион оказывается полностью погруженным в стенку матки. Его окружает СТБ, который начинает формировать ворсины хориона. Через 12 дней после овуляции ооцита, из которого возник имплантирующийся зародыш, образуются **первичные ворсины хориона** — продукт развития и ветвления СТБ. Появление первичных ворсин увеличивает площадь взаимодействия трофобласта с тканями матки.

Первичные ворсины прорастают кровеносными сосудами плода, механически укрепляются внезародышевой мезенхимой. В результате формируются **вторичные ворсины хориона**, и с этого момента хорион считают структурно сформированным. В дальнейшем хорион войдет в состав плаценты.

2.5.7. Эмбриональная диапауза

Среди млекопитающих есть виды, у которых спаривание происходит в неблагоприятное для размножения время года. Рождение и вскармливание детенышей в таких условиях будет приводить к снижению жизнеспособности потомства и увеличению его смертности. Для таких видов характерно удлинение

доимплантационного периода развития эмбрионов, что позволяет задержать рождение потомства до наступления более благоприятных условий. Блостоциста формируется, но не имплантируется, а продолжает автономное существование в матке самки. У летучих мышей и соболя имплантация может быть задержана на срок до шести месяцев, у норки — до 50 дней.

Увеличение длительности доимплантационного периода развития получило название эмбриональной диапаузы. В зависимости от условий внешней среды, в которых существуют животные, выделяют два типа диапаузы. Облигатная диапауза характерна для видов, постоянно обитающих в сложных природных условиях (короткое северное лето или короткий влажный сезон в сухих степях) и наблюдается при каждой беременности. К числу таких животных относятся представители семейств медвежьих, парнокопытных, куньих. Однако на обычно благоприятном фоне может произойти неожиданное резкое изменение условий существования, которое создаст угрозу для жизни животных. Засуха, сильные холода, отсутствие пищи вызывает наступление факультативной диапаузы. Она не повторится в следующем половом цикле, если условия для вынашивания беременности будут благоприятными. Таким приспособительным механизмом обладают грызуны.

Регуляцию возникновения и окончания диапаузы осуществляет сочетанное действие ЦНС, которая реагирует на изменение состояния внешней среды, и гормонального фона самки. У разных видов животных основную роль в контроле диапаузы играют разные гормоны, это могут быть эстрогены, прогестерон, пролактин.

2.5.8. Плацента

Формирование плаценты, или **плацентация**, является продолжением имплантации.

Плацента представляет собой провизорный орган, который формируется во время беременности и предназначен для

поддержания связи между материнским организмом и плодом. В состав плаценты со стороны зародыша входят сильно разветвленные и проросшие кровеносными сосудами эмбриона ворсины хориона, а со стороны матери — слизистая оболочка матки.

Обеспечивая успешное развитие зародыша, плацента выполняет несколько функций. Главной из них является обменная функция, которая заключается в перемещении веществ, содержащихся в крови матери, в кровь эмбриона, и в обратном направлении. Так, через плаценту осуществляется газообмен: из крови матери кислород попадает в кровь развивающегося зародыша, а оттуда в обратном направлении поступает углекислый газ. Питательные вещества из крови матери диффундируют в кровь плода, одновременно конечные продукты обмена веществ плода переходят в кровь матери и выводятся её выделительной системой. Кровь зародыша и матери никогда не смешивается, их всегда разделяет несколько слоев эмбриональных и материнских тканей. Эти ткани образуют гемоплацентарный барьер, функцией которого является обеспечение избирательного обмена растворенными веществами между кровеносными системами плода и материнского организма.

Следующая функция плаценты — барьерная, обеспечивает защиту кровотока плода от проникновения паразитов и большинства микроорганизмов, а также крупных молекул и молекулярных комплексов материнского происхождения. К сожалению, такая защита не абсолютна. Через гемоплацентарный барьер легко проникают иммуноглобулины матери, вызывая иммунологический конфликт, который приводит к разрушению эритроцитов плода. Не является плацентарный барьер преградой для вирусов, особо разрушительное действие на развитие плода оказывает инфицирование вирусами краснухи, оспы, кори, гепатита. Токсины любой природы легко проникают из крови матери в кровь плода, поэтому прием сильнодействующих медикаментов, алкоголя, никотина, наркотиков во время беременности недопустим.

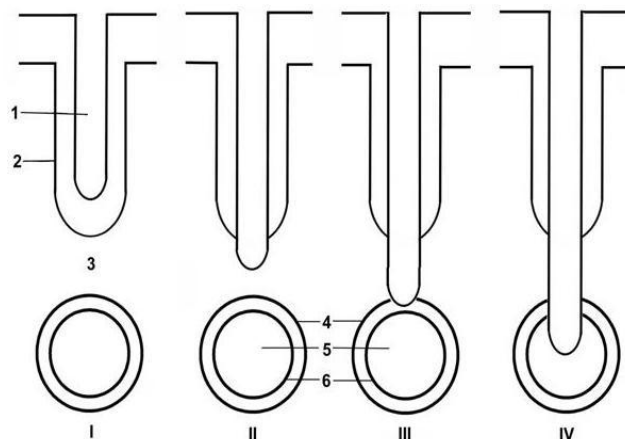


Рис. 2.18. Типы плацент (Антипчук, 1983)

I – эпителиохориальная; II – десмохориальная;

III – эндотелиохориальная; IV – гемохориальная

1 – ворсина хориона; 2 - эпителий стенки матки (показано одно из углублений слизистой матки), 3 – соединительная ткань слизистой матки,

4 – внешний слой стенки кровеносного сосуда матки, 5 - просвет кровеносного сосуда, 6 – внутренний слой стенки кровеносного сосуда

У многих видов млекопитающих плацента выполняет также синтетическую функцию, обогащая кровь матери и плода структурными белками и сигнальными молекулами (например, хорионическим гонадотропином у человека), что способствует поддержанию беременности.

В зависимости от глубины проникновения ворсинок плаценты в слизистую матки, у млекопитающих выделяют четыре типа плаценты (рис. 2.18).

1. Эпителиохориальные плаценты (непарнокопытные, сумчатые). Материнские ткани не разрушаются, и ворсины хориона только прилегают к углублениям слизистой матки.

2. Десмохориальные плаценты (парнокопытные). Ворсины хориона разрушают эпителий матки и проникают в соединительную ткань слизистой оболочки матки.

3. Эндотелиохориальные плаценты (хищные). Ворсины хориона контактируют с эндотелием кровеносных сосудов слизистой матки.

4. Гемохориальные плаценты (грызуны, насекомоядные, приматы и человек). Сильно разветвленные ворсины хориона омываются непосредственно материнской кровью, что обеспечивает наиболее тесный контакт между плодом и материнским организмом.

По степени повреждения тканей матки при родах плаценты делят на отпадающие (децидуальные) и неотпадающие. Неотпадающие плаценты (свиньи, лошади, многие жвачные, лемуры и др.) состоят только из тканей эмбрионального происхождения. При родах ворсины хориона просто выходят из углублений слизистой матки, не повреждая её. В состав плацент отпадающего (децидуального) типа (хищные, приматы, человек и др.) входят ткани не только плода, но и матери. При родах происходит так называемое отторжение плаценты — часть слизистой оболочки матки с внедрившимися в неё ворсинами хориона отторгается, что вызывает сильное маточное кровотечение.

У человека к концу нормально протекающей беременности при весе плода 3300–3400 г плацента представляет собой диск диаметром 17-20 см, толщиной 2-2,5 см и весом 500 г. Обычно она расположена на задней или передней стенке матки. У отторгнутой во время родов плаценты можно видеть две поверхности: плодную и материнскую. Плодная поверхность покрыта амнионом и от её центральной части к плоду отходит пуповина. Материнская часть разделена на 15-20 долек — котиледонов, разделенных перегородками. Каждый котиледон содержит несколько ворсин хориона и во время беременности котиледоны заполнены материнской кровью.

2.5.9. Близнецы

Как крупное долгоживущее млекопитающее, человек имеет низкую плодовитость. Обычно беременность завершается рождением одного ребенка. Если же в результате беременности рождается двое и более детей, их называют близнецами. Детеныши-близнецы могут рождаться и у животных, таких как крупные хищники и обезьяны.

С древнейших времен людей удивляло, что в одних случаях близнецы рождались однополыми и очень похожими друг на друга, а в других – сходство было не больше, чем между обычными братьями (сестрами) или же дети рождались разнополыми. Причина таких различий кроется в разном механизме формирования близнецов. Близнецов делят на две группы: однайцевые (монозиготные, идентичные) и дваайцевые (дизиготные, братские).

Дваайцевые возникают в результате двух, произошедших в рамках одного полового цикла, независимых зачатий. В редких случаях таким образом могут быть оплодотворены от четырех до восьми яйцеклеток. Родившиеся дети могут быть разнополыми, и, по сути дела, они являются обычными братьями и сестрами. Частота рождения дваайцевых близнецов увеличивается с возрастом матери и к 35 годам достигает 0,7-0,8 %.

Однайцевые близнецы развиваются из обособившихся частей одного доимплантационного зародыша (рис.2.19). Обычно зародыш делится на две части, но описаны случаи появления на свет четырех и шести идентичных близнецов.

В случае парной близнецовости у 33 % пар каждый из зародышей имеет независимый хорион. Это значит, что разделение единого зародыша произошло до формирования трофобласта, то есть ранее 5 суток беременности. Бластомеры зародышей, начиная с двухклеточной стадии, и до времени компактизации морулы могут разделиться и сформировать две клеточные группы внутри одной блестящей оболочки. Из них образуются две бластоцисты, которые после вылупления будут независимо друг от друга имплантироваться и формировать все внезародышевые оболочки.

Во время кавитации бластоцисты ВКМ также может разделиться на две части. Так появляются примерно 2/3 идентичных близнецов. Если части ВКМ оказались на большом расстоянии друг от друга, то зародыши-близнецы будут иметь один общий хорион и две индивидуальных амниотических оболочки. Если такие группы клеток

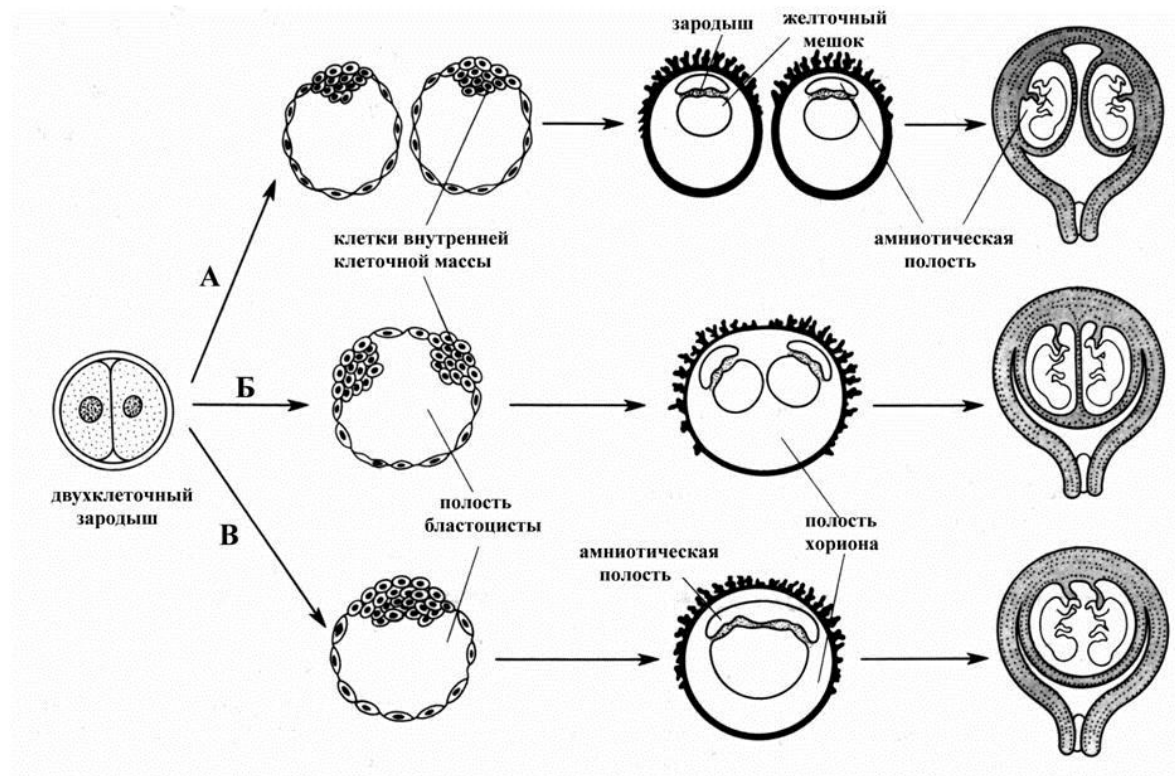


Рис.2. 19. Развитие однояйцевых близнецов у человека и их отношения с зародышевыми оболочками. (Голиченков и др., 2004)

ВКМ примыкают друг к другу, то развивающиеся из них зародыши будут иметь общие хорион и амнион. Неполное разделение ВКМ может привести к формированию неправильно развивающихся зародышей и появлению так называемых двойниковых уродств, к числу которых относятся «сиамские близнецы».

Возникновение близнецов наглядно иллюстрирует удивительную способность к регуляции развития, которой обладают тотипотентные бластомеры дробящегося зародыша и плюрипотентные клетки внутренней клеточной массы бластоцисты.

2.6. КРИТИЧЕСКИЕ ПЕРИОДЫ РАЗВИТИЯ

Развитие организма представляет собой сложное, хорошо скоординированное сочетание таких процессов как клеточное деление, миграция клеток и межклеточные взаимодействия, генная регуляция и дифференцировка. Развитие будет успешным только в том случае, если все составляющие его процессы проходят в оптимальных условиях. Однако в индивидуальном развитии организма существуют периоды, когда он становится чрезвычайно чувствительным к повреждающему воздействию внешних факторов. Впервые на существование таких отрезков времени обратил внимание отечественный эмбриолог П.Г.Светлов и назвал их **критическими периодами** развития. У млекопитающих выделяют следующие критические периоды:

- оогенез и сперматогенез;
- оплодотворение;
- имплантация;
- развитие осевых зачатков органов и формирование плаценты (3-8 нед. у человека);
- стадия усиленного роста головного мозга, формирование основных функциональных систем организма и дифференцировка полового аппарата (15-24 нед. у человека);
- рождение;
- новорожденность (до 1 года у человека);
- период полового созревания (11-16 лет у человека).

В течение критических периодов развития способность развивающегося организма сопротивляться внешнему повреждающему воздействию оказывается временно сниженной, поэтому любое отрицательное воздействие, которое зародыш испытывает на себе в это время, в дальнейшем может вызвать нарушения (аномалии) его развития и даже гибель. Подсчитано, что примерно половина от всего числа начавших развиваться зародышей не доживает до рождения. У большинства из них аномалии возникают

на доимплантационных стадиях развития, и такие эмбрионы прекращают дробление или оказываются неспособны имплантироваться в стенку матки. В другом случае, зародыши имплантируются, но не происходит формирования плаценты, что приводит к прерыванию беременности. Таким образом, те зародыши, которые имеют несовместимые с жизнью, преимущественно генетические, аномалии развития спонтанно abortируются ещё до того, как женщина узнает о своей беременности. Это явление получило название ранней эмбриолетальности. С помощью чувствительного иммунологического теста, который способен выявить наличие хорионического гонадотропина через 8 или 9 сут. после оплодотворения, была установлена беременность у 112 здоровых женщин. У 67 из них в дальнейшем не обнаружилось никаких признаков беременности.

Наука о врожденных аномалиях развития называется **тератологией**, а агенты, ответственные за их возникновение, называются **тератогенами** (создателями чудовищ, монстров). Они имеют физическую, химическую и биологическую природу, и, соответственно, различаются по характеру воздействия на процессы развития. Наибольший ущерб развивающемуся организму тератоген нанесет в том случае, если его воздействие по времени совпадет с каким-либо из критических периодов развития. Любой орган наиболее уязвим во время его роста и формирования внутренней структуры. Как и у всех млекопитающих, у человека различные органы имеют не совпадающие по времени критические периоды, однако период между 15 и 60 сут. беременности является критическим для большой группы органов. Сердце формируется между 3-й и 4-й неделями, мозг и скелет чувствительны к вредным влияниям постоянно, начиная с 3-й недели после зачатия, вплоть до конца беременности, и далее после рождения.

По характеру воздействия тератогены можно разделить на несколько классов. К первому относят ***агенты, вызывающие генные***

мутации. Ионизирующая радиация и некоторые лекарственные препараты вызывают разрыв хромосом и изменяют структуру ДНК. По этой причине беременным женщинам следует избегать неконтролируемого приема лекарств, и сократить до необходимого минимума воздействие рентгеновских лучей, хотя данных о врожденных аномалиях, вызванных дозами облучения, используемыми в целях диагностики, у нас нет.

Еще один класс тератогенов представлен **вирусами**. Чем меньше срок беременности, на котором вирус краснухи поражает женщину, тем больше риск, что зародыш пострадает в результате инфекции. По-видимому, заражение в первые пять недель его развития является наиболее опасным, поскольку в это время формируются сердце, органы зрения и слуха. Цитомегаловирус и вирус простого герпеса также являются тератогенными. Инфицирование цитомегаловирусом раннего зародыша почти всегда приводит к его гибели, но заражение более старших по возрасту зародышей может привести к слепоте, глухоте, церебральному параличу и задержке умственного развития у новорожденного.

Микроорганизмы (бактерии) редко бывают тератогенными, но два их вида могут оказать вредное воздействие на человеческий зародыш. Возбудитель токсоплазмоза *Toxoplasma gondii* — простейшее, переносимое кроликами и кошками (и содержащееся также в их фекалиях), может проникнуть в зародыш через плаценту и вызвать поражение мозга и глаз у плода. *Treponema palladium* (возбудитель сифилиса) может убить ранние плоды и вызвать врожденную глухоту при воздействии на плоды старшего возраста.

Четвертый класс тератогенов представлен группой **лекарственных препаратов, а также химическими соединениями природного происхождения**. Хинин и алкоголь — два агента растительного происхождения, способны вызывать врожденные уродства: хинин — глухоту, а алкоголь (при употреблении в количестве, большем 50-85 г в сутки) — отставание в умственном и

физическом развитии ребенка. В научной литературе не приводится данных о том, что никотин и кофеин вызывают появление у детей врожденных аномалий, однако у женщин — злостных курильщиц (20 и более сигарет в день) чаще, чем у некурящих женщин рождаются дети с недостатком веса, что отрицательно сказывается на их дальнейшем развитии. Курение также значительно понижает количество и подвижность спермиев в семенниках мужчин, выкуривающих не менее 4 сигарет в день.

К сожалению, количество потенциальных тератогенов вряд ли будет уменьшаться. Наше индустриальное общество ежегодно получает в свое распоряжение сотни **новых искусственных веществ**, которые включаются во всеобщее потребление. **Пестициды и органические вещества, содержащие ртуть**, вызывают нарушения неврологического характера и аномалии в поведении у детей, матери которых во время беременности ели пищу, содержащую эти вещества. В настоящее время известно свыше 50000 искусственных химических веществ, которые находят практическое применение, и примерно от 200 до 500 видов новых материалов появляются каждый год. По-видимому, не следует забывать о том, что чем больше мы производим и потребляем разнообразных химических соединений, тем большему риску мы подвергаем здоровье наших будущих детей.

Задания для самоконтроля к главе 2

1. Особенности развития млекопитающих.
2. Периодизация онтогенеза млекопитающих.
3. Основные события доимплантационного периода развития.
4. Понятие о половых циклах и их биологической роли.

Структура и регуляция половых циклов.

5. Сходство и различие оогенеза и сперматогенеза.
6. Мейоз как специализированный тип клеточного цикла.
7. Регуляция мейоза.
8. Основные события и контролирующие механизмы оплодотворения.
9. Особенности дробления зародышей млекопитающих.
10. Этапы первичной цитодифференцировки в зародыше млекопитающих.
11. Стадия бластоцисты и её биологическая роль.
12. Имплантация и плацентация.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Гилберт С.Ф. Биология развития / С.Ф. Гилберт. – СПб.: Информ-планета, Политехника, 2010. – 830 с.
2. Голиченков В.А. Эмбриология: учебник для ун-тов / В.А. Голиченков, Е.А. Иванов, Е.Н. Никерясова. – М.: Академия, 2004. – 218 с.
3. Данилов Р.К. Общая и медицинская эмбриология: учебник для мед. вузов / Р.К. Данилов, Т.Г. Боровая. – СПб.: СпецЛит, 2003. – 230 с.
4. Дондуа А.К. Биология развития. Т. 1-2: учебник для ун-тов. / А.К. Дондуа. – СПб.: Изд-во СПб Университета, 2005.
5. Корочкин Л.И. Биология индивидуального развития. Учебник. / Л.И. Корочкин – М.: Изд-во МГУ, 2002. – 264 с.