

С. В. Савельев

---

Формообразование  
**МОЗГА**  
ПОЗВОНОЧНЫХ



---

Издательство  
Московского университета  
1993

Савельев С.В.  
Формообразование мозга позвоночных. — М., Изд-во МГУ,  
1993. — 143 с. ISBN 5-211-02961-5

В монографии рассмотрено формирование нервной системы позвоночных от выделения клеток-предшественниц до первичной дифференцировки нейробластов. Показаны закономерности возникновения и развития формы эмбрионального мозга. Основное внимание уделено механизмам контроля и детерминации формообразовательных процессов в головном мозге амфибий.

Для биологов, эмбриологов, гистологов и нейрофизиологов.

Рецензенты:  
член-корреспондент РАН, профессор Л.И. Корочкин,  
доктор биологических наук, профессор Л.В. Белоусов

Московское общество испытателей природы

Книга издана при финансовой поддержке  
Международного института биологической медицины  
и совместного предприятия "БЕТ"

С 1904000000 — Без объявления  
077(02) — 93

ISBN 5-211-02961-5

© Савельев С.В., 1993 г.

|                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Введение .....                                                                                     | 4   |
| Глава 1. ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ЭМБРИОНАЛЬНОГО<br>РАЗВИТИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ .....                           | 6   |
| 1.1. Морфогенез клеток-предшественниц .....                                                        | 8   |
| 1.2. Формирование нейроэпителия .....                                                              | 18  |
| 1.3. Нейруляция .....                                                                              | 25  |
| 1.4. Сегментация нервной трубки и формирование<br>основных отделов головного мозга .....           | 38  |
| 1.5. Топология первичной дифференцировки нейро-<br>эпителиальных клеток .....                      | 45  |
| Глава 2. МОРФОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПОДВИЖНОСТЬ<br>НЕЙРОЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК .....                          | 53  |
| 2.1. Миграция клеток .....                                                                         | 53  |
| 2.2. Тангенциальная и радиальная миграция кле-<br>ток .....                                        | 54  |
| 2.3. Количественные характеристики формообразо-<br>вания головного мозга .....                     | 67  |
| 2.4. Подвижность стенок эмбрионального мозга ...                                                   | 75  |
| Глава 3. МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАЗ-<br>ВИВАЮЩЕЙСЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ .....                      | 80  |
| 3.1. Источники механических натяжений .....                                                        | 83  |
| 3.2. Типы механических натяжений и их свойства                                                     | 95  |
| 3.3. Механозависимые периоды развития нервной<br>системы .....                                     | 107 |
| 3.4. Природа механочувствительности нейроэпите-<br>лиальных клеток .....                           | 113 |
| Глава 4. МЕХАНИЗМЫ КОНТРОЛЯ И ДЕТЕРМИНА-<br>ЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ НЕРВ-<br>НОЙ СИСТЕМЫ ..... | 117 |
| 4.1. Формообразование как фактор региональной<br>экспрессии генов .....                            | 122 |
| 4.2. Формообразование головного мозга и поведе-<br>ние .....                                       | 131 |

Сила тяжести и другие механические силы, как растяжение и давление, — свет, теплота и бесчисленные химические силы, действующие в веществах воздуха, воды и земли, — все они влияют на организм и управляют образованием его форм.

*О. Гертеиз*

## ВВЕДЕНИЕ

В этой небольшой книге я попытался построить картину динамического развития формы мозга от появления клеток-предшественниц до первичной дифференцировки нейробластов. Такое внимание к процессу становления пространственной организации нервной системы обусловлено парадоксом формы мозга, который является ключом к ее пониманию. Сущность парадокса сводится к тому, что головной мозг обладает сложной формой, которая не выполняет самостоятельных функций. Казалось бы, отсутствие прямых внешних воздействий на форму мозга должно постепенно упростить его пространственную организацию, но этого в эволюции не происходит. Наоборот, в сравнительно-анатомическом ряду позвоночных пространственная организация мозга непрерывно усложняется. У млекопитающих мозг представляет собой одну из наиболее сложных структур организма. Созерцание мозга взрослого человека или обезьяны, находящегося в жидкой среде, защищенного мозговыми оболочками и черепом, не оставляет сомнений в том, что форма мозга не имеет никаких отношений к прямым механическим контактам с внешним миром. Поэтому вполне естественно предположить, что при отсутствии внешних воздействий мозг мог бы приобрести в процессе эволюции более экономичную и простую форму шара или эллипсоида. Если этого не произошло, то логика подсказывает предположить, что видимая пространственная организация мозга необходима. Зачем же она возникает? Для ответа на этот вопрос надо обратиться к эмбриональному развитию нервной системы. Именно в это время возникают зачатки мозга, его структуры и отделы, которые составят основу формы взрослого мозга. Формообразование мозга в эмбриогенезе происходит благодаря подвижности нейроэпителиальных пластов клеток. Изгибы стенок мозга, формирование или исчезновение бороздок, закрывание или открывание полостей желудочков обуславливают внешние изменения его формы. В

основе этих анатомических событий лежит совокупный результат изменения формы клеток, их подвижность, пролиферация и дифференцировка. Попытке сопоставления внешних изменений эмбриональной формы мозга с событиями на клеточном и пластовом уровне посвящены первые две главы книги. Описываемые в этих главах преобразования формы на анатомическом уровне не могут происходить без участия механических сил.

Действительно, трудно представить, что прогиб пласта или формирование полости IV желудочка не требуют никаких механических усилий. Если мы допускаем их существование, то неизбежен вопрос об их происхождении. Откуда берутся механические силы, воздействующие на форму мозга? Где они генерируются и кем контролируются? Ответ на эти вопросы — в третьей главе книги, которая посвящена механической природе формообразования головного мозга позвоночных.

Анализ механизмов, управляющих формообразованием головного мозга позвоночных, неизбежно приводит к проблеме происхождения позиционной информации в развитии головного мозга. Кто и как размечает в пространстве и во времени события формообразования? Где хранится или как создается регионально-специфичная информация, запускающая дифференцировку нейробластов? Этим вопросам посвящена последняя глава книги. В ней проводится попытка обосновать идею о том, что форма мозга является результатом эмбрионального развития, во время которого она служит источником позиционной информации, реализуемой в региональной экспрессии генов и индивидуализации дифференцировки нейронов.

## ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

**П**роблема происхождения нервных клеток и их предшественников имеет большое значение для понимания раннего развития мозга. По-существу вопрос о происхождении клеток нервной системы является одной из сторон проблемы детерминации раннего эмбрионального формообразования головного мозга. На процессы детерминации развития нервной системы существует по меньшей мере два взгляда: с одной стороны, это представления о мозаичности развития нервной системы, а с другой — регуляционная модель морфогенеза мозга.

Мозаичный тип развития предусматривает детерминацию судьбы потомков клеток-предшественниц на протяжении всего онтогенеза мозга, вплоть до его окончательной дифференцировки. Согласно **мозаичной модели**, детерминация начинается с уровня бластомеров на 32-й и 64-й клеточной стадиях развития. На этих стадиях выделяются один или два бластомера, которые станут в дальнейшем предшественниками всех клеток нервной системы. Пройдя одно или два деления, бластомеры формируют первичную группу клеток-предшественниц. Каждая из них дает начало одному клону клеток, который состоит только из ее потомков. На этой стадии развития вся нервная система состоит из нескольких, закономерно расположенных клонов клеток. Клоны не смешиваются друг с другом и имеют выраженные границы. В этих границах заложена структурализация мозга на поздних эмбриональных и дефинитивных стадиях. Однако в процессе реального развития мозга существуют миграции клеток, которые учитываются в мозаичной модели морфогенеза.

Для объяснения этих явлений вводится представление о компартаментах. Компармент клеток отличается от клона только тем, что клетки, расположенные на его границах, могут перемешиваться с клетками соседних компарментов. Несмотря на перемешивание, клетки в компарimente на 80% состоят из потомков одной клетки-предшественницы. Компармент, по мозаичной модели развития, является не просто совокупностью топологически объединенных потомков одной клетки, но и функциональной единицей. При формировании нервной трубки клетки компартамента создают определенную область мозга или функциональную структуру. Это может быть любая из областей мозга, в которой клетки объединены анатомически, функционально и по происхождению. Причем считается детерминированным не только сам компарт-

мент, но и входящие в него клетки. Следовательно, мозаичная модель развития мозга предусматривает не только детерминацию топографического положения клетки, но и ее функциональную дифференцировку.

Мозаичная модель успешно объединяет и образование первичного паттерна нервных связей. Известно, что первые нервные связи устанавливаются между самыми удаленными друг от друга структурами. На основе первичных нервных связей формируются вторичные связи, которые объединяют между собой близко расположенные структуры. На самых поздних стадиях развития и дифференцировки мозга возникают связи внутри отдельных структур, которые являются третичными. Эта схема сильно упрощена, но отражает дифференцировку мозга у низших позвоночных. Последовательность перечисленных событий дифференцировки хорошо объяснима, если допустить, что первые связи устанавливаются между самыми дальними "родственниками" клеток в разных компартаментах. Тогда сначала возникнут связи между компартаментами, удаленными друг от друга. На втором этапе установятся связи между соседними компартаментами, а затем между клетками внутри одного компартамента. Таким образом, допустив, что связи в мозге устанавливаются в той же последовательности, в какой формируются дочерние нейробластомеры, клоны и компарменты, мы получим целостную и формально непротиворечивую модель раннего эмбрионального формообразования и дифференцировки головного мозга.

Другая точка зрения предусматривает значительно меньшую детерминированность судьбы отдельных клеток. Основой **регуляционной модели** развития мозга является мультифункциональность клеток-предшественников и наличие самой общей детерминации нейральных зачатков. В этом случае предусматривается детерминация только направления нейральной дифференцировки ткани, а не судьбы отдельных клеток. Судьба клеток нейрального зачатка зависит от того, в какие коммуникационные отношения они вступят друг с другом в процессе эмбрионального формообразования. Регуляционная модель подразумевает, что судьба клетки в известной степени случайна. Она изменится, если клетка переместится в нейральном зачатке. Следовательно, судьба клетки в каждый конкретный момент времени зависит от ее топографического положения и коммуникационных взаимодействий с соседями. Таким образом, параметром, ограничивающим степень изменчивости клетки, является ее топологическая принадлежность к той или иной части нейрального зачатка. Например, нейроэпителиальная клетка нервной пластинки, расположенная в центре зачатка презумптивного среднего мозга, не может стать клеткой переднего или заднего мозга, но внутри среднего мозга, она может дифференцироваться в любой нейрон. Безусловно, на стадии гастролы эти возможности у клеток значительно шире.

С точки зрения регуляционной модели, судьба клеток зависит от тех формообразовательных процессов, в которых они участвуют. Каждая клетка нейрального зачатка детерминирована настолько, насколько она топологически связана с развитием конкретных структур. В регуляционной модели судьба клетки зависит от нескольких постоянно изменяющихся параметров. С одной стороны, это топография клетки в развивающемся зачатке, а с другой — весь комплекс межклеточных взаимодействий. Согласно регуляционной модели, любая клетка может начать пролиферировать или выйти в дифференцировку, если ее позиционная информация будет соответствовать началу этого процесса. В этом случае первичный паттерн нервных связей устанавливается не по генеалогическому принципу, а между клетками, реализующими одинаковую позиционную информацию.

В основе различий мозаичной и регуляционной моделей лежит отношение к продолжительности детерминированного развития. Мозаичная модель подразумевает, что судьба клетки предопределена уже на стадиях дробления и гаструляции. Все остальное время развития клетка реализует полученную информацию. Другая ситуация в регуляционной модели. Здесь предполагается, что на непродолжительное время детерминирована только исходная группа клеток, которая будет дифференцироваться в головной мозг, а конкретная информация о дифференцировке структур мозга появляется во время взаимодействий клеток в развитии. Причем информация о дальнейшем развитии возникает дискретными порциями. Клетка на ранних стадиях развития еще «не знает» своей окончательной судьбы, а обладает программой действий только на несколько часов. Следовательно, регуляционная модель отличается от мозаичной прерывистостью детерминации.

\* \* \*

Таким образом, к настоящему времени сложились две концепции детерминации эмбрионального формообразования головного мозга: мозаичная и регуляционная. Обе модели имеют свои положительные и отрицательные стороны, однако окончательный ответ на вопрос о том, какая из них в большей степени отражает реальный механизм развития нервной системы, могли дать только прямые наблюдения за судьбами нейроэпителиальных клеток и их предшественников.

### 1.1. МОРФОГЕНЕЗ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИЦ

Попытки определить локализацию клеток-предшественниц, или анцестральных клеток, предпринимались давно. Первые удачные эксперименты по маркированию живых клеток были проведены Фохтом (Vogt, 1925, 1929), а затем Карпентером (Carpenter,

1932, 1937), который посвятил свои исследования развитию нервной системы. Эти исследователи метили группы клеток на относительно поздних стадиях, что представляет интерес для анализа развития нервной трубки и будет рассмотрено во гл. 2. Для анализа раннего развития нервной ткани важна локализация клеток-предшественниц на ранних стадиях дробления, поскольку исследуя судьбы клеток-предшественниц и их потомков, можно ответить на вопрос о степени детерминации развития нервной системы.

Долгое время попытки проследить судьбу отдельных бластомеров от ранних стадий дробления до органогенеза оставались неудачными. Основной трудностью исследований было отсутствие хорошего витального маркера. Маркер должен быть нетоксичен, хорошо сохраняться в клетке и выдерживать большое разведение. Первой удачной попыткой промаркировать отдельные бластомеры на стадии 32 клеток является исследование японских авторов (Nakamura, Kishiyama, 1971; Nakamura et al., 1978). Они вводили внутриклеточно витальный краситель в поверхностные бластомеры зародышей шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Меченые бластомеры и их потомки сохраняли метку длительное время. Это позволяло исследовать меченые потомки бластомеров на 23-й стадии развития, которая у этого объекта соответствует периоду формирования хвостовой почки. Исследователи определяли топографическое распределение меченых клеток на тотальных анатомических разрезах, поскольку применяемый ими способ мечения исключал использование гистологических процедур. Такой метод дал возможность авторам создать относительно подробные карты судеб отдельных бластомеров, однако из-за того, что они не могли использовать серийные гистологические срезы всего зародыша, распределение отдельных клеток ими не изучалось. Работы Накамура с соавт. отличались от исследований Фохта маркированием отдельного бластомера, а не группы клеток. Локализация меченых потомков определялась в их работе весьма приблизительно, так что не удалось установить, существуют ли индивидуальные вариации в распределении потомков одного бластомера. Следовательно, невозможно было оценить и степень детерминации судеб потомков отдельного бластомера. Тем не менее, они показали, что бластомеры, из которых формируется нервная система, локализованы в дорсальных частях бластулы. Эти бластомеры обозначены на рис. 1, как D1, D3, D4, D6, D8, V2, V4, V5, V6.

Наиболее важным шагом в исследовании клеток-предшественниц в нервной системе было применение Хироэ и М. Джекобсоном (Hirose, Jacobson, 1979). Этот метод внутриклеточного маркирования позволяет проследить судьбу потомков меченого бластомера на протяжении 10–15 пролиферативных циклов. Джекобсон и Хироэ начали свои исследования с анализа судеб отдельных

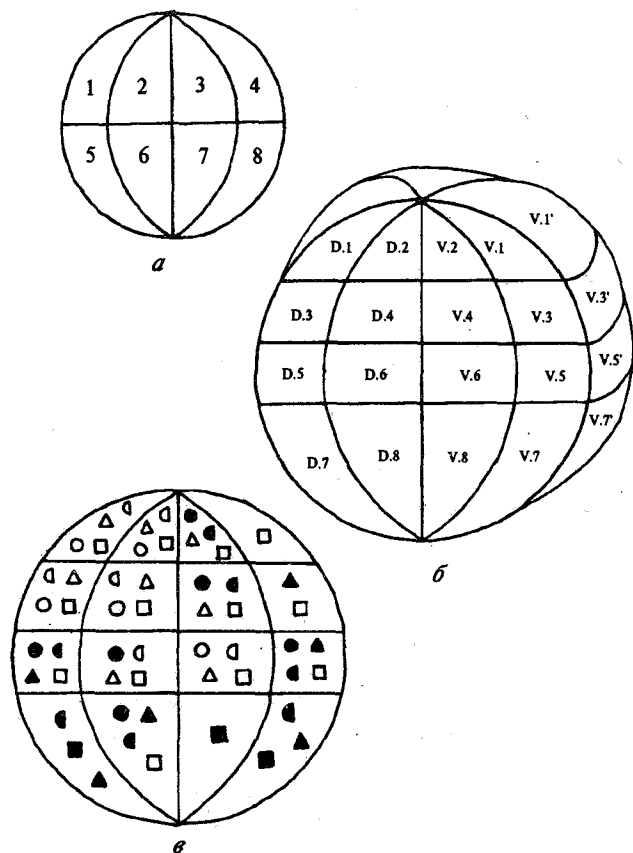


Рис. 1. Схемы ранних стадий дробления зародышей шпорцевой лягушки и представительство потомков меченых бластомеров в отделах нервной системы (по М. Jacobson, 1985a; Moody, 1987; Takasaki, 1987).

а — зародыш на 16-клеточной стадии развития. Потомки 1-го бластомера формируют сетчатку, мозг и обонятельные плакоды, 2-го бластомера — сетчатку, дорсальную часть мозга и обонятельную плакоду, 3-го бластомера — хрусталик, дорсальную часть мозга, обонятельную плакоду, 4-го бластомера — хрусталик, дорсальную часть спинного мозга, 5-го бластомера — вентральная часть головного мозга и спинного мозга, 6-го бластомера — присутствуют во всех отделах мозга, 7-го бластомера — дорсальную часть головного мозга, 8-го бластомера — дорсальную часть спинного мозга.

б-в — зародыш на 32-клеточной стадии развития. Пояснения к обозначениям на схеме б — даны в тексте; в — значками обозначено представительство потомков бластомеров в четырех основных зонах

головного и спинного мозга: о — prosencephalon, ∩ — mesencephalon, Δ — rhombencephalon, □ — spinal cord. Значки не закрашены, если потомки бластомера постоянно встречаются в соответствующем отделе мозга; значки закрашены в том случае, если потомки бластомера встречаются в данном отделе не всегда, а индивидуально у различных особей

бластомеров, меченных на ранних стадиях дробления (Jacobson, Hirose, 1978, 1981; Hirose, Jacobson, 1979; Jacobson, 1982). Первые работы этих авторов показали, что уже на 16-клеточной стадии строго определенные клетки дают столь же строго детерминированные зачатки. Была обнаружена высокая степень детерминации отдельных бластомеров и их потомков в формировании определенных органов зародыша и структур головного мозга. В каждом эксперименте Джекобсона потомки меченых одинаковых бластомеров занимали одно и то же положение в головном мозгу. На основании хорошо воспроизводимых экспериментов Джекобсон создал карту локализации клеток-предшественниц на различных стадиях дробления зародышей шпорцевой лягушки. Детерминативный характер мозаичного развития ее головного мозга был столь очевиден, что в 1982 г. Джекобсон отверг существование индукционного влияния хордомезодермы на нейроэктодермальный зачаток нервной системы. С его точки зрения, в индукционных взаимодействиях нейроэктодермы и хордомезодермы нет необходимости, поскольку первая уже детерминирована на 64-клеточной стадии. Отказавшись от идеи существования индукционных процессов, Джекобсон создал клональную модель развития головного мозга, сущность которой состоит в следующем. Отдельный бластомер является клеткой-предшественницей, которая, пройдя несколько пролиферативных циклов, формирует группу потомков — клон клеток. В процессе развития потомки клеток одного клона не смешиваются и составляют ограниченные части морфологических паттернов. Паттерн, по Джекобсону, — это потомки клеток одного клона, которые составляют отдел или структуру головного мозга. С его точки зрения, на поздних стадиях развития различные клоны дают различные типы клеток. Формирование морфологических и гистологических паттернов зависит от того, как клетки в различных областях эмбриона становятся запрограммированными и вступают на различные пути развития. Он считает, что программирование включает в себя иерархическую серию переключений, которые приводят к ограничению клеточной судьбы. При этом иерархическое переключение клеток является в первую очередь результатом клеточных линий (последовательных поколений потомков одной клетки-предшественницы), клеточного положения и, в последнюю очередь, результатом межклеточных взаимодействий.

В 1984 г. М. Джекобсон признал роль индукционных процессов в формировании нервной системы, но включил их в свою модель как одно из второстепенных звеньев в системе межклеточных взаимодействий. В его модели интересна интерпретация глубинных источников ограничения клеточных судеб. Джекобсон полагает, что клональное ограничение судеб клеток происходит первично, из наследования бластомерами цитоплазматических компонентов,

которые регионально локализованы в яйце зародыша. Следовательно, модель предполагает неравноценное распределение между бластомерами цитоплазматических компонентов. Уникальность распределения клеточной информации между бластомерами на поздних стадиях развития достигается в результате закономерного дробления. По мнению Джекобсона, именно в этот момент клетки приобретают индивидуальные качества, которые являются основой для межклеточных взаимодействий. Межклеточные взаимодействия, в свою очередь, приводят к прогрессивному ограничению судеб клеток и окончательной детерминации клеточных типов.

М. Джекобсон и Хироэ (Jacobson, Hirose, 1978, 1981) создали первые удачные карты судеб отдельных бластомеров, которые позволили установить локализацию клеток-предшественниц нервной системы на ранних стадиях дробления. Эти карты позволили им создать изложенную модель развития нервной системы позвоночных. Предложенная модель предусматривает жесткую детерминацию судеб отдельных бластомеров, однако авторы отмечают, что отдельные клеточные линии могут детерминироваться в разное время. Иллюстрируя это положение, Джекобсон показывает, что выделение бластомеров — предшественников рогон-бирдовских клеток — на 512-клеточной стадии и дальнейшее их культивирование не приводят к специфической дифференцировке (Jacobson, 1981 a, b; Moody, Jacobson, 1983; Jacobson, Moody, 1984). Следовательно, детерминация рогон-бирдовских клеток наступает позднее, чем клеток других клонов. Согласно данным Джекобсона, эти клетки детерминируются между 10-м и 13-м делениями. Если это так, то детерминация рогон-бирдовских клеток противоречит модели Джекобсона, поскольку после 13-го деления они перестают пролиферировать и выходят в дифференцировку.

Продолжая исследование, Джекобсон проанализировал судьбу отдельных бластомеров на 123-, 256-, 512-клеточной стадиях (Jacobson, Hirose, 1981; Jacobson, 1983, 1985 a, b). Он показал, что границы между клонами значительно менее четкие и воспроизводимые, чем представлялось ранее. Эти эксперименты, в которых проводилось мечение бластомеров на разных стадиях, а также работы по трансплатации отдельных бластомеров поставили под сомнение модель Джекобсона. Тем не менее он считал, что региональная детерминация клеток является результатом клеточных линий, клеточного положения и индукции (Jacobson, 1981 b, 1985 a; Smith, Slack, 1983). К 1987 г. модель развития нервной системы Джекобсона претерпела ряд существенных изменений. Он предположил, что границы клонов, а следовательно и детерминации, начинают определяться у зародышей эмбрионов шпорцевой лягушки на 512-клеточной стадии. Образование границ приводит к формированию морфологических компартментов, которые

являются популяцией потомков групп исходных клеток. Компартменты, в свою очередь, формируют определенные структуры или отделы головного мозга. Джекобсон допускал, что компартменты могут перемешиваться на своих границах, а их клетки могут участвовать в образовании одной и той же структуры. Моделью предусматривалось, что исходные клеточные группы у эмбрионов на 512-клеточной стадии, принадлежащие соседним клонам, должны быть разделены на 49% случаев и перемешаны в 51% случаев. Понятно, что ответить на вопрос о степени перемешивания клеток из двух соседних клонов с помощью только одного красителя нельзя.

Для решения этой задачи был применен метод маркирования бластомеров с помощью витальных люминесцентных красителей (Sheard, Jacobson, 1987). В этих экспериментах также использовались эмбрионы шпорцевой лягушки на 512-клеточной стадии. В бластомеры вводились: фито-лизиндекстран и ритц-лизиндекстран, которые дают красную и желто-зеленую люминесценцию. Красители вводились внутриклеточно в бластомеры, принадлежащие двум соседним клонам. Метились бластомеры, расположенные на границах и в глубине клонов. Было установлено, что между потомками бластомеров из различных клонов существует перемешивание. Положение меченых клеток показывало, что разделение клонов имело место в 46% случаев, тогда как интенсивное перемешивание клеток наблюдалось в 54% случаев. Таким образом, введение контрастных красителей в бластомеры, соприкасавшихся клонов не выявило унимодального распределения меченых потомков. Следовательно, положение модели Джекобсона о клональной ограниченности судеб потомков меченых бластомеров не подтвердилось. Однако данные этих авторов согласуются с гипотезой ограниченного развития компартментов в нервной системе. Эта гипотеза подразумевает, что потомки клеток-предшественниц дают первично ограниченные клоны нейроэпителиальных клеток, которые в дальнейшем развитии формируют морфологические компартменты. Компартменты, в свою очередь, отвечают за формирование определенных структур мозга. Отдельные компартменты могут частично перемешиваться друг с другом, но их морфологическая органоспецифичность остается строго детерминированной. Иначе говоря, потомки клеток-предшественниц нервной системы могут формировать только нервную систему и никакой другой орган.

Таким образом, М. Джекобсон от представлений о строгой детерминации судеб отдельных бластомеров пришел к взглядам о компартментализационной детерминации групп потомков клеток-предшественниц.

Метод внутриклеточного пероксидазного маркирования использовал Такасаки (Takasaki, 1987) в исследованиях на 32-клеточных зародышах шпорцевой лягушки. Автор изучал развитие

дорсальных экваториальных бластомеров (см. рис. 1). Он метил эти бластомеры и прослеживал их судьбу вплоть до 38-й стадии (по Детлаф, Рудновой, 1975). Было установлено, что бластомеры, помеченные на рис. 1 как V3, V3' и V5, V5', локализовались на стадии бластулы в зоне первичного организатора. Потомки этих клеток формировали прехордальную пластинку, нотохорд, сомиты, энтодерму и частично нервную трубку. Его исследования показали такую же специфичность распределения потомков клеток-предшественников, как и в работе М. Джекобсона.

Рассматривая вопрос о детерминации бластомеров на 32-клеточной стадии, Такасаки удалял средние два или четыре бластомера. Удалялись два симметричных бластомера с обеих сторон зародыша, в результате чего большинство тканей не развивалось, а сама голова редуцировалась. На основании этих экспериментов автор делает вывод, что уже на 32-клеточной стадии развития бластомеры детерминированы вплоть до полной дифференцировки и образования осевых мезодермальных структур. Одновременно он показывает, что удаление этих клеток не может быть компенсировано потомками соседних с ними бластомеров. Эти результаты, по мнению автора, демонстрируют аналогичную детерминацию соседних бластомеров. Согласно Такасаки, развитие аномальных эмбрионов после удаления дорсальных экваториальных бластомеров с двух сторон тела демонстрирует характерную особенность мозаичного развития амфибий. Однако в его же опытах было установлено, что удаление бластомеров с одной стороны часто давало нормальных эмбрионов с симметричной головой и без серьезных отклонений в развитии органов. Следовательно, продолжая рассуждения автора, необходимо допустить отсутствие детерминации симметрии зародыша, а это противоречит представлениям о строгой детерминации судеб бластомеров.

С другой стороны, Кагура и Ямана (Kageura, Yamana, 1983, 1984), проводя аналогичные эксперименты, обнаружили нормальное развитие эмбрионов в случаях культивирования половинок от двух- или восьмиклеточных дробящихся яиц. Ими было установлено, что нормальные эмбрионы формируются в том случае, если они содержат хотя бы два бластомера. Причем на восьмиклеточной стадии достаточно оставить один бластомер на дорсальной и один на вентральной стороне зародыша. Это говорит о том, что до формирования у зародыша шпорцевой лягушки бластоцели и пластовой организации зачатков можно безболезненно удалять большую часть бластомеров. Нормальное развитие не нарушится, хотя часть цитоплазмы яйца необратимо утратится.

Опыты Такасаки и Кагура показывают значение пластовой организации зародыша и роли межклеточных коммуникаций, которые возникают на поздних стадиях дробления. Рассматривая организацию бластомеров из области первичного организатора,

Такасаки говорит о том, что удаление бластомеров V.3 и V.3' вызывает такой же дефект, как удаление бластомеров V.5 и V.5'. Он предполагает существование морфологической эквивалентности между этими клетками, которая позволяет им частично заменять друг друга после удаления одного бластомера. Данным Такасаки противоречит сообщение Гимлиха (Gimlich, 1986), показавшего, что удаление клеток третьего слоя (типа V.6, V.5 на рис. 1) и последующее их культивирование свидетельствует об автономности развития осевой мезодермы, тогда как клетки второго слоя (типа V.4, V.3 на рис. 1) неавтономны.

Сходные с Гимлихом результаты представили Машо и Кубота (Masho, Kubota, 1986), которые отметили у восьмиклеточного зародыша автономность развития дорсальных клеток. Такасаки видит причину противоречий результатов у разных авторов в индивидуальной изменчивости эмбрионов. Его данным противоречит исследование Ньюкопа с соавт. (Nieuwkoop et al., 1985). Они провели ряд детальных экспериментов по рекомбинациям отдельных бластомеров, на основании которых высказали предположение о том, что клетки амфибий в раннем эмбриогенезе не детерминированы и полипатентны. По мнению Ньюкопа, судьба каждой клетки зависит от того, в каких взаимодействиях окажется она в развитии. Однако его рассуждения касаются только анимальной половины зародыша. С точки зрения Ньюкопа, вегетативная половина зародыша детерминирована, а анимальная полипатентна, т.е. судьба каждой клетки-предшественницы головного мозга определяется по вероятностному принципу. Исходя из представлений Ньюкопа можно допустить почти равные возможности клеток анимальной половины зародыша на стадии дробления. Его опыты показали, что потомки любого дорсального бластомера, оказавшись в соответствующих условиях, могут дифференцироваться в нейроэпителий и его производные. Ньюкоп полагает, что мезодермальные клетки, которые изучал Такасаки, детерминируются именно от вегетативной половины зародыша. С такими представлениями согласны Гимлих Браун (Gimlich, Braun, 1985; Gimlich, 1986), которые установили в опытах по трансплатации, что дорсальные вегетативные клетки у 32-клеточного эмбриона (D.6, D.5, V.6 на рис. 1) могут индуцировать осевую мезодерму, чего в нормальном развитии никогда не бывает.

Таким образом, эксперименты, посвященные трансплантациям отдельных бластомеров, показывают значительную полипатентность клеток-предшественниц нервной системы.

Представляло большой интерес, как экспериментально выявленная полипатентность клеток-предшественниц нервной системы реализуется в нормальном развитии зародыша. Для экспериментатора вопрос звучит следующим образом: могут ли потомки одного бластомера с равной вероятностью появляться или исчезать в определенных структурах головного мозга разных зародышей.

Если это так, то детерминация клеток-предшественниц носит общий характер и определяется межклеточными взаимодействиями на относительно поздних стадиях развития. Ответы на эти вопросы дали работы Мооди (Moody, 1987 a, b), в которых также использовалась пероксидазная метка отдельных бластомеров на 32-клеточной стадии. Этот исследователь поставил более простую задачу, чем изучение детерминации клеток-предшественниц. Она заключалась в прослеживании судьбы бластомеров от стадии 16–32 клеток до формирования хвостовой почки. На этой, последней стадии Мооди делал серийные срезы целого зародыша, что позволило выявить локализацию каждой клетки-потомка меченого бластомера, причем они описывались как по положению в зародыше, так и по фенотипу. Мооди установила, что большинство органов состоит из потомков клеток, происходящих от разных бластомеров. Потомки одного бластомера, хотя и смешиваются с соседними клетками, но все-таки имеют более или менее характерное положение в дефинитивном зародыше. Идентичное мечение бластомеров в разных зародышах позволяет предсказать общую топографию потомков каждого из них. Однако вариации в локализации меченных клеток были достаточно часты и повторялись в каждом исследованном эмбрионе.

Автор также показал различия в судьбах бластомеров на 16- и 32-клеточной стадиях. Эти различия являются нелинейными и могут быть разбиты на несколько групп. В первую группу он включил случаи, когда две дочерние клетки могут давать равное количество клеток в один орган. Для второго случая характерно такое распределение клеток, когда потомки одной дочерней клетки могут составлять большую часть органа, который формируется из материнского бластомера. Для третьего варианта характерна локализация всех потомков дочерней клетки в органе, возникшем из материнского бластомера на 16-клеточной стадии. На основании этих данных Мооди предположила разделение судеб клеток при дроблении как в симметричной, так и в асимметричной манере.

Разделение судеб еще не является детерминацией развития, поскольку потомки одних и тех же бластомеров демонстрируют поливариантность своего распределения в органе. На рис. 1 показано распределение потомков бластомеров в головном мозге на стадии хвостовой почки, меченных на 32-клеточной стадии. Из этих данных Мооди видно, что ряд бластомеров неизбежно преобразуется в клетки нервной системы. Потомки других бластомеров могут с равной вероятностью локализоваться в различных органах. Появление этих клеток в нервной системе непредсказуемо и зависит от комбинации межклеточных взаимодействий, в которые они вступят на поздних стадиях развития зародыша.

Детальное исследование Мооди расширило число бластомеров 32-клеточной стадии, дающих потомков в нервную систему. По

данным М. Джекобсона с соавт. ((Hirose, Jacobson, 1979; Jacobson, Hirose, 1981; Jacobson, Moody, 1984), потомки бластомеров, обозначенных на рис. 1 как V.3, V.7, V.5, V.8, не входят в нервную систему. Мооди же показала, что они могут включаться в состав спинного мозга зародыша, однако их включение является вероятностным процессом: у одного зародыша они могут дифференцироваться в мотонейроны, а у другого вообще отсутствуют в спинном мозге.

Сходные исследования были проведены на рыбах и мышах (Ziomek, Johnson, 1981; Ziomek et al., 1982). Важно, что в них как, и в работах Мооди, показана только общая направленность развития отдельных бластомеров. Детальной детерминации развития нервной системы установить не удалось. По-видимому, путь жесткой детерминации развития характерен только для беспозвоночных. Действительно, у пиявок (Weisblat et al., 1980, 1984) и нематод (Sulston et al., 1983) развитие бластомеров и их потомков полностью детерминировано. Можно предположить, что в процессе эволюции нервной системы первым возник детерминативный тип развития, на что указывает детерминация судеб бластомеров асидии (Wishida, Satoh, 1983), которая сходна с морфогенезом беспозвоночных.

Подводя итог обсуждению работ, посвященных происхождению предшественников нейроэпителиальных клеток, можно сказать, что нервная система развивается из восьми ростродорсальных бластомеров (см. рис. 1) на 32-клеточной стадии развития зародышей. Остальные бластомеры анимальной половины зародыша также принимают участие в формировании нервной системы, однако их участие носит вероятностный характер. Потомки почти любого бластомера из дорсальной половины зародыша могут дифференцироваться в нервные клетки, если окажутся в соответствующей системе межклеточных взаимодействий. Эти представления подтверждаются экспериментами по трансплатации отдельных бластомеров (Yeasman et al., 1986). Полипотентность клеток-предшественниц нервной системы сохраняется и на более поздних стадиях развития, что давно установлено в опытах по трансплатации участков нейроэпителия и нервной трубки (Гексли, Бер, 1936; Speman, 1938).

Таким образом, возвращаясь к центральной проблеме раннего развития нервной системы, необходимо сказать, что региональная детерминация ее предшественников является результатом клеточного положения и межклеточных взаимодействий. Роль клеточных линий имеет меньшее значение, чем представлялось раньше. Если мы констатируем, что детерминация присутствует в развитии нервной системы в самом общем виде, то естественным является вопрос о природе и формах межклеточных взаимодействий, которые определяют развитие нейроэпителия. Для разработки перечисленных вопросов необходимо обратиться к организации

нейроэпителия, который возникает из клеток-предшественниц, рассмотренных в этой главе.

## 1.2. ФОРМИРОВАНИЕ НЕЙРОЭПИТЕЛИЯ

Нейроэпителий образуется из потомков клеток-предшественниц. Начиная со стадии дробления эти клетки пролиферируют, а их потомки формируют небольшую зону на анимальном полюсе зародыша (рис. 2 а). Она выглядит как сектор сферы, расположенный между анимальным полюсом и дорсальной губой бластопора. На этой стадии развития потомки клеток-предшественниц не перемешиваются друг с другом, а формируют ограниченные клоны (Jacobson, Hirose, 1981; Jacobson, 1983). На 512-клеточной стадии у зародышей шпорцевой лягушки каждый клон состоит из 18–22 клеток. На 1024-клеточной стадии число бластомеров в клонах увеличивается непропорционально, хотя границы между отдельными клонами сохраняются (Jacobson, 1984, 1985; Jacobson, Klein, 1985). Всего М. Джекобсон выделяет 7 клонов, которые, по его мнению, формируют 7 компартментов, определяющих развитие и дифференцировку всего мозга. С его точки зрения, презумптивный нейроэпителий зародышей шпорцевой лягушки расположен у анимального полюса в виде восьмерки (рис. 2, г).

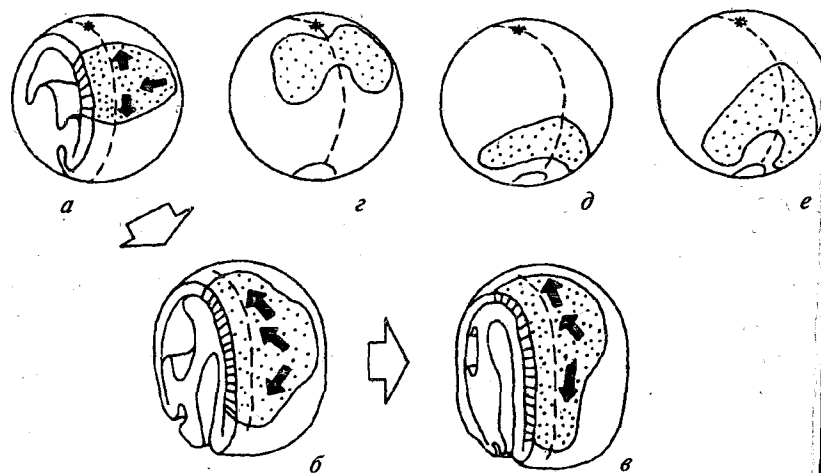


Рис. 2. Схема локализации нейральной эктодермы на стадиях гаструлы и нейрулы.

а, б, в — трансформация нейроэктодермального зачатка в монослойном варианте у хвостатых амфибий; г, д, е — локализация нейроэктодермы у зародыша шпорцевой лягушки (по различным авторам) в тексте. Точками отмечена локализация нейроэктодермы; закрашенные стрелки — направления смещения нейроэпителиального пласта

Другая точка зрения высказывалась Келлером (Keller, 1975, 1976). Используя технику витального окрашивания, он показал, что форма нейрального зачатка у шпорцевой лягушки серповидная (рис. 2, е). По его данным, нейральный зачаток совершает движения, характерные для крыши первичной кишки, когда она двигается по направлению в бластомеру. Используя топологию распределения клеток с РНК-богатой цитоплазмой, Имо (Imoh, 1984, 1985) пришел к выводу, что область презумптивного нейроэпителия простирается и в центральную половину зародыша. Имо (Imoh, 1985), как и Джекобсон (Jacobson, 1983; Jacobson, Moody, 1984), предполагали существование детерминации у презумптивных клеток нейроэпителия шпорцевой лягушки до стадии 10, 5 (начало гаструляции), когда еще нет взаимодействия между проспективным нервным полем и хордомезодермой. Отрицание обоими авторами необходимости контакта нейрального зачатка и хордомезодермы вызвало серию специально поставленных опытов, которые показали необходимость хордомезодермальной индукции нейрального зачатка. Эти вопросы детально обсуждены в специальных работах, посвященных эмбриональной индукции (Михайлов, 1988).

Локализация зачатка презумптивного нейроэпителия изучалась и с помощью естественных маркеров. Так, Сузуки и Харада (Suzuki, Harada, 1986) использовали зародышей *Xenopus laevis* и *Xenopus borealis*. Ядра клеток у этих видов различно окрашиваются квинакрином — люминесцентным красителем акрихинового ряда. Эти авторы срачивали анимальные и вегетативные половинки ранней гаструлы от зародышей различных видов. Химерных эмбрионов культивировали до стадии хвостовой почки и изучали распределение клеток в различных системах органов. Ими было показано, что перспективное поле нервной системы более сжато в дорсальном направлении, о чем сообщали Имо и Келлер. По данным Сузуки и Харада (Suzuki, Harada, 1986), зачаток нервной системы шпорцевой лягушки представляет собой поясовидное поле, в которое не входит маргинальная зона гаструлы (см. рис. 2, д). Они считают, что боковая нейроэктодерма мигрирует в течение гаструляции к дорсальной средней линии, а не к бластопору, как полагал Келлер.

По-видимому, реальную картину топографии нейрального зачатка шпорцевой лягушки на стадии гаструляции дал М. Джекобсон (Jacobson, 1981), так как он использовал наиболее адекватные методы внутриклеточного маркирования нейроэпителиальных клеток. Его данные согласуются с работами, выполненными на хвостатых амфибиях, у которых локализация презумптивного нейроэпителия не вызывает сомнений. Почти у всех видов хвостатых амфибий нейральный зачаток организован одинаково (см. рис. 2, а). Весьма вероятно, что на стадии ранней гаструлы в

нейроэпителии хвостатых амфибий существует клональная ограниченность между потомками отдельных клеток-предшественниц. С началом гастрюляционных движений пластов зародыша начинается активная перегруппировка клеток презумптивного нейроэпителия. Он растягивается в кранио-каудальном направлении и сжимается по направлению к оси зародыша, как показано стрелками на рис. 2, а. Краниальная граница презумптивного нейроэпителиального пласта достигает анимального полюса зародыша, а каудальная опускается к бластопору (см. рис. 2, б). Необходимо отметить более активную перегруппировку клеток по направлению к бластопору, что приводит к неравномерности перераспределения материала нейроэктодермы. Гастрюляционная инвагинация мезодермы вызывает вытягивание каудальной области нейрального зачатка и, как следствие, сжатие к средней линии (см. рис. 2, в). Основную морфогенетическую нагрузку выполняет дорсальная губа бластопора, через которую мигрирует хордомезодерма. Миграция хордомезодермы — ведущее событие гастрюляции, которое определяет морфогенез других систем, в том числе и нейроэпителия.

Пассивность донейруляционных перемещений нейроэпителия подтверждается характером изменения формы клеток в презумптивном зачатке нервной системы. Если у хвостатых амфибий на поздней стадии дробления толщину нейроэпителия принять за 100%, то к моменту окончания гастрюляции она составит 50–70% от начальной величины. Следовательно поляризация клеток, которая отражает их вытягивание вдоль по нормалю к пласту, будет уменьшаться (рис. 3). Надо учитывать, что в этот период клетки быстро уменьшаются в объеме за счет деления, но их длина сокращается по другим причинам. Основным источником уменьшения длины клеток — растягивание нейроэпителия при миграции хордомезодермы во внутрь зародыша. Мигрирующая хордомезодерма тянет за собой прилежащие участки эктодермы. Более всего подвергается растягиванию презумптивный нейроэпителий, так как он непосредственно связан с инвагинирующей хордомезодермой. Таким образом, можно сказать, что донейруляционное распределение зачатка нейроэпителия в кранио-каудальном направлении пассивно и определяется движением хордомезодермы через дорсальную губу бластопора.

В период гастрюляции происходит первичная эмбриональная индукция, которая морфологически состоит в том, что инвагинирующая во внутрь зародыша хордомезодерма вступает в контакт с нейроэпителием. Во время контакта между двумя эмбриональными пластами клеток происходит активация нейроэпителия, что дает начало нейральной дифференцировке. Первичная эмбриональная индукция хорошо изучена как морфогенетический процесс, но ее химическая природа до настоящего времени не-

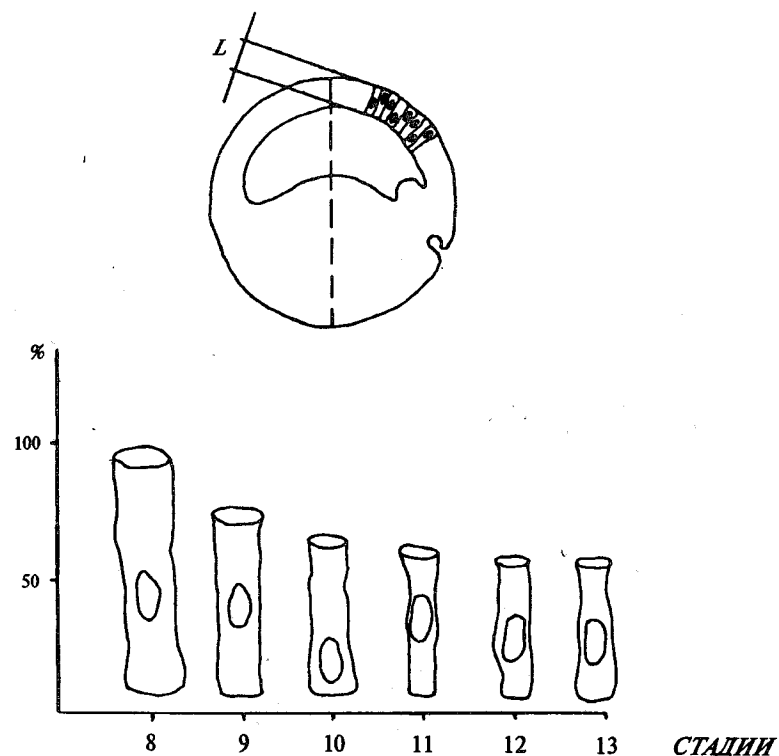


Рис. 3. Динамика изменения длины клеток от стадии дробления (8) до конца гастрюляции (13) в монослойном нейроэпителии хвостатых амфибий.

L — длина клеток в пласте на стадии 8 принималась за 100%. Во время дробления и гастрюляции объем и длина нейроэпителиальных клеток плавно уменьшается

известна (Саксен, Тойвонен, 1963; Jacobson, 1970, 1982; Белоусов, 1980; Михайлов, 1988).

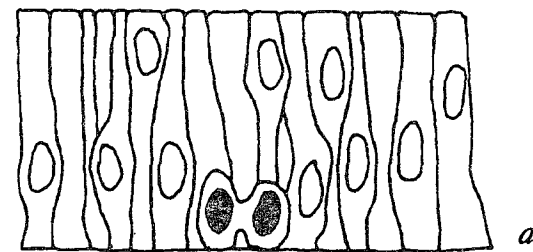
Первичная эмбриональная индукция является не однозначным процессом, а совокупностью интегрированных морфогенетических реакций как индуктора, так и индуцируемой ткани. Индуктор — хордомезодерма — неоднородна по своим характеристикам. Известно, что в начале гастрюляции она преимущественно индуцирует к нейруляции структуры головного мозга. В конце гастрюляции хордомезодермальная индукция вызывает образование как спинномозговых, так и мезодермальных структур. Однако еще в опытах Шпемана (Speman, 1938) было показано, что любой участок хордомезодермы может вызывать формирование спинной и головной части нервной системы. Следовательно, говорить о зависимости региональной дифференцировки нервной системы от

неоднородности индуктора нельзя. Влияние индуктора на нейроэпителий является только одной стороной вопроса, другая сторона — способность нейроэпителия воспринимать индукционно воздействие. Способность воспринимать индукционное влияние была названа компетенцией ткани. Компетенцией к первичной индукции обладает вся эктодерма зародыша амфибий, как было показано в опытах по трансплантации индуктора (Spemann, Mangold, 1924; Михайлов, 1938). Как оказалось, в нервную систему может дифференцироваться любая группа эктодермальных клеток, которая вступит в контакт с индуктором. Мультипотентность эктодермальных клеток зародышей амфибий говорит о том, что программа их индивидуального развития определяется экзогенными факторами. Тем не менее следует отметить, что функции индуктора могут выполнять самые разные вещества. Это могут быть экстракты из печени, мозга, убитые нагреванием ткани, или агенты небиологического происхождения (Саксен, Тойвонен, 1963). Следовательно, область зародыша, содержащая презумптивный нейроэпителий, обладает внутренней готовностью к нейруляции. Для начала формирования спинного и головного мозга достаточно любого неспецифического стимула. Внутренним источником готовности нейроэпителия к восприятию индуктирующего стимула может являться растягивание нейроэпителиального зачатка инвагинирующей хордомезодермой. Вполне возможно, что возникающих из гаструляции механических неоднородностей вполне достаточно для нейруляции, но необходим стимул, функции которого выполняет хордомезодерма.

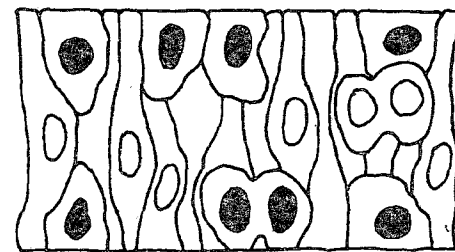
### Организация нейроэпителия

К моменту начала нейруляции формируется нейроэпителий, который сохраняет свою организацию до замыкания нервной трубки. В нейроэпителии позвоночных выделяют апикальную, базальную сторону пласта (рис. 4). Апикальной стороной называется наружная поверхность эктодермы, базальной — ее внутренняя поверхность, которая обращена к хордомезодерме. На ранних стадиях развития клетки нейроэктодермы одновременно связаны с обеими поверхностями пласта. К окончанию гаструляции организация нейрального зачатка видоспецифично изменяется. У большинства хвостатых амфибий и большей части млекопитающих мембраны клеток нейроэпителия выходят одновременно на базальную и апикальную поверхности. Однако у бесхвостых амфибий и ряда рептилий нейроэпителиальные клетки выходят на поверхность только одной из сторон пласта.

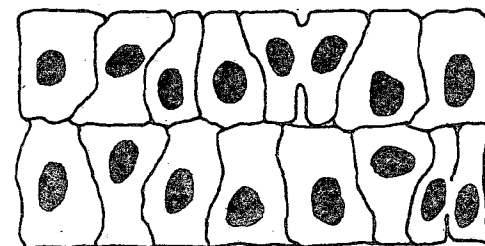
Расположение клеток в пласте определяет существование двух основных типов организации нейроэпителия: многослойного и однослойного. Оба типа нейроэпителия встречаются у хордовых.



a



b



v

Рис. 4. Три основных типа организации нейроэпителия у позвоночных: а — однослойный нейроэпителий, б — нейроэпителий смешанного типа, в — двухслойный нейроэпителий.

Нейроэпителии различаются по закрепленности клеток на базальной и апикальной поверхности пласта. Ядра закрашены у клеток, закрепленных только на одной из поверхностей

изученных видов амфибий. Многослойным нейроэпителием обладают представители родов *Xenopus*, *Xyla*, а однослойным — большинство видов *Urodela* (см. рис. 4). До начала нейруляции однослойный пласт состоит из клеток одного типа, которые, как правило, имеют одинаковую форму (Burnside, Jacobson, 1968; Durnside, 1973; Shoenwolf, 1982, 1984; Савельев, 1987). В однослойном нейроэпителии клетки закреплены одновременно на базальной и апикальной поверхностях пласта. Связь с одной из мембран могут

утрачивать клетки, находящиеся в пролиферативном цикле. Однородность организации монослойного нейроэпителителя накладывает ряд ограничений на клеточные и пластовые морфогенетические реакции. В монослойном эпителиальном пласте невозможны тангенциальные миграции отдельных клеток. Если клетки, тем не менее, двигаются друг относительно друга, то это означает существование скользящей миграции отдельных групп клеток или целого участка пласта. Этот процесс легко промоделировать на 500–600 спичках, если их поставить на торцы, обвязать резиновым жгутом, а небольшую часть окрасить. При легком тангенциальном сжатии модели и ее вращении двумя руками по часовой стрелке, можно наблюдать расползание окрашенных спичек и их перемешивание с неокрашенными. Степень перемешивания спичек определяется силой тангенциального сжатия модели. Аналогичные процессы происходят и при миграции клеток в монослойном нейроэпителиальном пласте (Burnside, Jacobson, 1968; Савельев, 1987). По-видимому, базальный конец клетки в монослойном эпителии может менять свою локализацию в процессе пролиферации. Во время деления связь клетки с базальной стороной пласта утрачивается, а отросток втягивается в округляющуюся клетку. Клетка проходит телофазу и отростки дочерних клеток вновь устремляются к базальной поверхности пласта. Возвращается ли отросток дочерней клетки в зону локализации материнского отростка — неизвестно. Вполне допустимо, что зона локализации базального отростка после пролиферативного цикла изменяется, но детально этот процесс до сих пор не изучен.

Для многослойного эпителия характерна закрепленность клетки только на одной из поверхностей пласта (см. рис. 4, а). Когда клетка расположена в середине пласта, она не закреплена ни на одной из его сторон. При такой организации нейроэпителителя клетки отличаются большим разнообразием форм и высокой степенью гетерогенности взаимодействий. Клетки многослойного нейроэпителителя могут смещаться в горизонтальной плоскости относительно друг друга, что исключено для однослойного нейроэпителителя. Тангенциальная подвижность клеток в многослойном пласте может сочетаться с радиальной миграцией клеток от внешней до внутренней поверхности пласта. Такая встречная интеркаляция клеток эпидермального и гиподермального слоев нейроэпителителя была выявлена у шпорцевой лягушки сразу после нейруляции (Schroeder, 1970).

Между двумя крайне различными формами организации нейроэпителителя существует широкий спектр переходных форм, которые сочетают в себе признаки, характерные как для однослойного, так и для многослойного нейроэпителителя. Смешанные типы организации нейроэпителителя встречаются среди представителей рода *Truturus* и у ряда бесхвостых амфибий. Возможно, что этот тип организации нейроэпителителя распространен гораздо шире,

но специальных исследований до сих пор не проводилось. Для смешанной организации нейроэпителителя характерно наличие трех типов клеток, которые различаются по положению в пласте (см. рис. 4, б). К первому типу следует отнести клетки, одновременно выходящие на базальную и апикальную поверхности пласта. Второй тип составляют клетки, выходящие только на апикальную поверхность пласта, третий тип включает клетки, связанные с базальной поверхностью.

Каждый из перечисленных трех типов организации эмбрионального нейроэпителителя имеет ряд особенностей, которые накладывают отпечаток на весь морфогенез нервной системы. В первую очередь, структура нейроэпителителя влияет на становление форм мозга, которая начинается с нейруляции.

### 1.3. НЕЙРУЛЯЦИЯ

Нейруляция — это первый период развития, когда нервную систему можно выделить как анатомический зачаток, структура которого отличается от других тканей зародыша. До начала нейруляции нейроэпителителей можно локализовать только на основании экспериментов по витальному маркированию клеток-предшественниц, так как он неотличим от окружающих его клеток эктодермы.

У большинства видов позвоночных, за исключением костистых рыб, нейруляция включает в себя несколько более или менее выраженных периодов. Она начинается с изменения формы клеток, расположенных в зоне нейрального зачатка. Изменение формы клеток приводит к увеличению толщины нейроэпителителя, что выделяет его из окружающего презумптивного эпидермиса. Утолщение нейрального зачатка сопровождается появлением медуллярных валиков, которые ограничивают нервную пластинку (рис. 5, а). Валики поднимаются над поверхностью эпидермиса зародыша и замыкаются, образуя нервную трубку (рис. 5, б, в). Этот несложный эмбриологический процесс формирования нервной трубки издавна привлекал пристальное внимание исследователей. Начиная с Гиса (His, 1892, 1894), предпринимались попытки объяснить природу наблюдаемого процесса в сворачивании нервной трубки, но до настоящего времени вопрос остается открытым (Gordon, 1985).

Лучше всего исследовано формирование нервной трубки у цыпленка, бесхвостых и хвостатых амфибий, крыс и мышей (Burnside, 1971, 1973; Schroeder, 1970; Schoenwolf et al., 1988; Smith, Schoenwolf, 1988). Несмотря на видимое анатомическое единство органогенеза, нельзя игнорировать особенности нейруляции, характерные для животных с различными типами организации нейроэпителителя. Поэтому имеет смысл рассмотреть нейруляцию

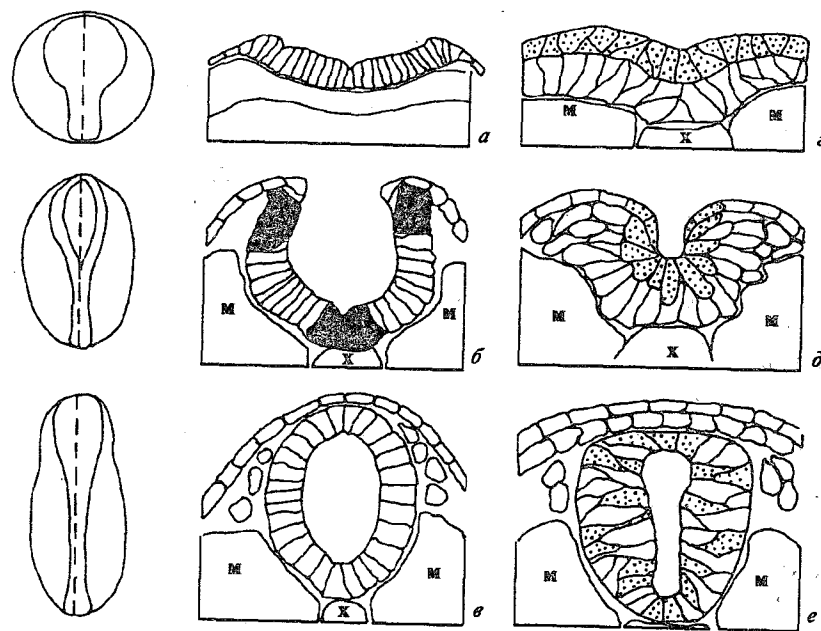


Рис. 5. Три стадии нейруляции в монослойном (а, б, в) и двуслойном нейроэпителии (г, д, е).

Основная причина нейруляции в монослойном нейроэпителии связана с изменением формы клеток. В двуслойном нейроэпителии изменение формы клеток сопряжено с проникновением клеток гиподермы к апикальной мембране эпидермального пласта, который помечен точками. В монослойном нейроэпителии черным закрашены зоны локализации колбовидных клеток, вызывающие скручивание нервной трубки. X — хорда, M — миотомы

хотя бы при двух крайних формах организации нейроэпителия в однослойном и многослойном нейроэпителии. Различия в нейруляции носят принципиальный характер, что делает результаты экспериментов, выполненных на видах с двуслойным нейроэпителием, несопоставимыми с данными для видов с монослойным нейроэпителием (M. Jacobson, 1982, 1983). Столь же затруднительно распространять на организмы с многослойным нейроэпителием закономерности, обнаруженные при анализе формирования нервной трубки цыпленка или *Urodela*. Эмбрионы многих амфибий, птиц и млекопитающих обладают в процессе нейруляции монослойным нейроэпителием, что делает этот вариант морфогенеза наиболее распространенным среди позвоночных.

#### Нейруляция в монослойном эпителии

Нейруляция начинается с утолщения нейроэпителия в зоне будущей нервной трубки. По данным А. Джекобсона (Jacobson,

1981), у тритона со стадии гаструляции (13) до стадии ранней нейрулы (15) нейроэпителиальные клетки увеличиваются в длину почти на 50%, что сопровождается уменьшением апикального и базального края клетки (см. рис. 5). Длина клеток увеличивается с 58 до 94 мкм, а площади апикального и базального полей уменьшаются с 245 до 146 мкм<sup>2</sup> (рис. 6). На этой стадии развития клетки нейроэпителия имеют столбчатую организацию, их апикальные и базальные участки по форме не отличаются друг от друга. После начала выпячивания клеток (поляризации) нейроэпителий можно выделить как анатомический предшественник нервной системы. Если давать строгое определение, то только с началом поляризации клеток-предшественниц можно говорить о появлении нейроэпителия — специфической нейральной структуры. До этого развития целесообразнее именовать область локализации клеток-предшественниц нейральным или нейроэмбриональным полем. Как только клетки нейроэмбрионального поля эктодермы начинают поляризоваться, клетки презумптивного эпидермиса уплотняются, уменьшая толщину эмбриональной эктодермы (Burnside, 1971; A. Jacobson, 1981). Необходимо отметить, что поляризация клеток происходит неравномерно. В одном месте нервной пластинки клетки вытягиваются в большей степени, а в другом — в меньшей. По данным Бернсайда (Burnside, 1971), у *Taricha torosa* (хвостатые амфибии) в передней части нервной пластинки на стадии 15 клетки имеют длину  $94 \pm 0,9$  мкм, а в задней части длина клеток составляет 76 мкм. Различаются диаметр и форма клеток. Если в ростральной зоне нервной пластинки клетки колбовидные, то в каудальном районе они сохраняют столбчатую структуру. Таким образом, величина поляризации клеток не одинакова в разных частях нервной пластинки. За время нейруляции клетки, расположенные в районе презумптивного головного мозга, поляризуются в большей степени, чем клетки спинного мозга. Из этого наблюдения ясно, что вклад клеток в сворачивание нервной трубки зависит от их положения в нервной пластинке.

Причем, судя по опытам, проведенным А. Джекобсоном и Гордоном (Jacobson, Gordon, 1976), региональная величина поляризации клеток детерминирована на 13-й стадии развития — до начала нейруляции. Они брали участок головного нейроэпителия на 13-й стадии, когда зародыш еще не начал вытягиваться вдоль оси тела, и пересекали его в презумптивное поле спинного мозга. Затем, на 15-й стадии (средняя нейрула) зародышей фиксировали и на срезах измеряли величину поляризации клеток. Авторы установили, что клетки трансплантированного участка нейроэпителия поляризовались, как в головной части зародыша в нормальном развитии. Эти клетки вытягивались больше, чем окружающие их клетки спинномозгового нейроэпителия. На основании этих экспериментов А. Джекобсон и Гордон делают вывод о программировании величины поляризации нейроэпителиальных

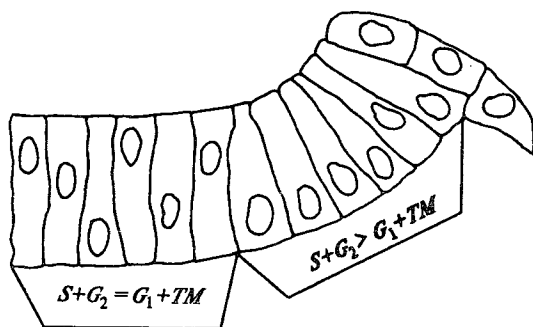
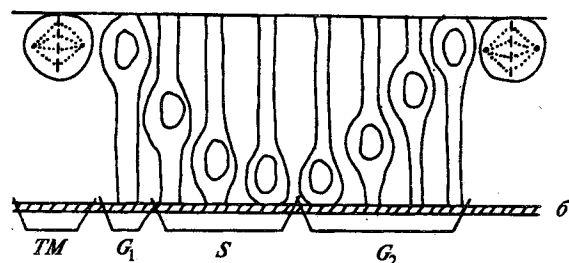
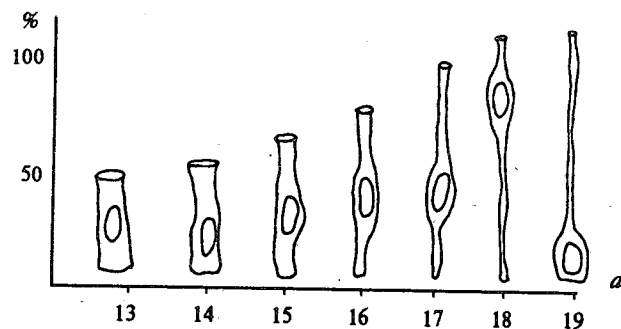


Рис. 6. Схема изменений формы клеток и пролиферативных циклов во время нейруляции.

а — увеличение длины нейроэпителиальных клеток от стадии гаструлы (13) до окончания нейруляции в монослойном нейроэпителии (19). Если до гаструляции нейроэпителиальные клетки вели себя относительно пассивно и уменьшались в размерах (рис. 3), то после начала нейруляции сворачивание нервной трубки сопровождается активной поляризацией клеток.

б — динамика внутриклеточной миграции ядер во время пролиферативного цикла в монослойном нейроэпителии (по Smith, Schoenwolf, 1988).

в — различия в продолжительности фаз пролиферативного цикла в перегибах нервной пластинки у цыпленка. Изменение продолжительности отдельных фаз деления направлено на максимальное удержание ядер в базальном слое, что приводит к изгибу пласта

клеток на стадии поздней гаструлы. Эти данные противоречат экспериментам, проведенным на испанском тритоне (*Pleurodeles waltlii*). В этих опытах между нервными валиками стадий средней нейрулы вводили кусочек нейроэпителия, который препятствовал замыканию нервной трубки. Нейроэпителиальные клетки стенок нервной трубки реципиента поляризовались в 1, 5–2 раза больше, чем в нормальном развитии, и сразу прекращали поляризоваться, если нервная трубка замыкалась. Чем дольше была задержка в замыкании нервной трубки, тем выше была степень поляризации клеток. На основании этих экспериментов был сделан вывод о том, что величина поляризации клеток монослойного нейроэпителия не является запрограммированным процессом. В пользу последнего предположения говорит факт, установленный А. Джекобсоном (Burnside, Jacobson, 1968; Jacobson, Cordon, 1976): клетки ростральной и каудальной части нервной пластинки за равные промежутки времени поляризуются на разную величину. Если это так, то скорости поляризации у этих клеток различны. Учитывая этот фактор, было бы необходимо кусочек нейроэпителия, взятый из головного региона донора на 13-й стадии, пересаживать реципиенту на 14-й стадии развития. Тогда к моменту замыкания нервной трубки донорный и реципиентный эпителий были бы одинаковой толщины. Если бы пересаженный головной участок продолжал поляризоваться после замыкания нервной трубки, то можно было бы говорить о раннем программировании величины поляризации клеток разных регионов нервной пластинки.

Поляризация нейроэпителиальных клеток в период сворачивания нервной трубки является однонаправленным процессом, на что указывают опыты Гольтфретера (Holtfreter, 1946, 1947). Он показал, что пласт поляризованных нейроэпителиальных клеток сохраняется в культуре. Следовательно, на первом этапе нейруляции происходит вытягивание нейроэпителиальных клеток — формируется колончатый нейроэпителий, причем степень вытягивания (поляризации клеток) имеет региональные отличия. Максимальная поляризация клеток наблюдается в головной части нервной пластинки, а минимальная — в спинной. Неравномерность поляризации создает более или менее выраженный градиент, который идет от головы до хвоста зародыша (Jacobson, Cordon, 1976).

Причины, вызывающие поляризацию клеток, неизвестны. Одними из первых высказали мысль о зависимости между ориентацией микротрубочек и удлинением клеток Бур и Портер (Buers, Porter, 1964; Porter, 1966). У амфибий роль микротрубочек в формировании нейроэпителия была исследована рядом авторов (Waddington, Perry, 1966; Schroeder, 1970; Karfunkel, 1971; A. Jacobson, 1981; Schoenwolf et al., 1988). Решающую роль в исследовании причин вытягивания нейроэпителиальных клеток сыграла электронная микроскопия. Было обнаружено, что при удлинении клеток микротрубочки ориентировались вдоль длинной оси

клетки. Подсчет числа этих парааксиальных микротрубочек на поперечных срезах с разных уровней поляризованной клетки не дал существенных различий (Burnside, 1971, 1973). Это позволило сделать вывод о том, что парааксиальные микротрубочки внутри клетки являются одной популяцией. Количество парааксиальных микротрубочек клетки значительно уменьшается, когда клетка вытягивается. Однако прямой связи между числом микротрубочек и величиной поляризации клеток не выявлено. Эти данные позволили установить, что микротрубочки контролируют клеточное удлинение и некоторые транспортные механизмы. На это указывает и анализ клеток эктодермы, окружающих нервную пластинку в период нейруляции. Было показано, что пассивно растягиваемые эпидермальные клетки демонстрируют случайную ориентацию микротрубочек и узелков толстых филаментов (70–100 Å в диаметре), которые напоминают тонофибриллы и присутствуют в десмосомных соединениях клеток (Burnside, 1973).

После начала нейруляции среди веретенновидных клеток появляются колбовидные клетки. Колбовидные клетки отличаются от веретенновидных клеток тем, что у них сжат апикальный и расширен базальный участок мембран. По данным Шенвольфа и соавт. (Schoenwolf, Franks, 1984), полученным на цыпленке, только около 10% веретенновидных клеток нервной пластинки становятся колбовидными. Колбовидные клетки распределены в сворачивающейся нервной пластинке неравномерно. Они находятся в непарной средней зоне нервной пластинки, расположенной над зачатком хорды, и в парных дорсолатеральных зонах, расположенных на расстоянии 6–8 клеточных диаметров от медуллярного валика (см. рис. 5, 6). Между этими зонами нейроэпителиальные клетки остаются веретенновидными (Schroeder, 1970; Brun, Garson, 1983; Schoenwolf, Franks, 1984).

Механизмы, которые трансформируют нейроэпителиальные клетки из веретенновидных в колбовидные, точно не известны. Нейроэпителиальные клетки могут становиться колбовидными в результате апикального сжатия, базального расширения или в результате одновременного проявления обоих этих процессов. Ультроструктурное изучение колбовидных клеток показало, что апикальный конец клеток содержит круговую группу микрофиламентов, которые, вероятно, обладают контрактивными функциями. Опыты по деполимеризации апикальных микрофиламентов приводят к различным дефектам нервной трубки (Schoenwolf, 1982, 1984), однако долгое время роль апикальных микрофиламентов была неясна. Считалось, что деполимеризация микрофиламентов с помощью цитохалазина В играет решающую роль в остановке нейруляции (Löfberg, Jacobson, 1974; Karfunkel, 1972; Linville, Shepard, 1972; Messier, Auclair, 1974, 1977; Lee, Kalmus, 1976; Greenaway et al., 1977; Shepard, Greenaway, 1977; Webster, Langman, 1978; Wiley, 1980; Morris-Kay, 1981; O'Shea, 1981; Austia et al., 1982; Morris-Kay

Tuchett, 1985; Tuchett, Morris-Kay, 1985; Smedley, Stanisstreet, 1986; Smits-van Prooije et al., 1986).

Однако исследования Шенвольфа и соавт. (Schoenwolf, 1988) показали, что использование цитохалазина D, имеющего большую специфичность, чем цитохалазин В, не останавливает нейруляцию. Формирование нервной пластинки имело место при полном отсутствии апикальных микрофиламентов в нейроэпителиальных клетках. Авторы обрабатывали нервную пластинку цитохалазином D на поздних стадиях нейруляции, когда микротрубочки уже не чувствительны к действию этого препарата. Следовательно, можно сделать вывод, что сворачивание нервной пластинки является следствием удлинения клеток, которое зависит от сборки парааксиальных микротрубочек (Schoenwolf, Powers, 1987). По данным Шенвольфа и соавт. (Schoenwolf et al., 1989), деполимеризация аксиальных микрофиламентов все же сказывается на скорости сворачивания нервной трубки. После обработки цитохалазином D края медуллярных валиков не сливаются друг с другом, а между ними сохраняется узкая щель (Lee, Nagel, 1985). По-видимому, апикальные микрофиламенты контролируют слияние медуллярных краев нервной пластинки и регулируют более тонкие механизмы формообразования, нежели микротрубочки.

Базальное расширение клеток нейроэпителия происходит одновременно с ретракцией апикального участка цитоплазмы. Когда веретенновидные клетки трансформируются в колбовидные, их ядра двигаются в сторону базального конца клетки. Эта миграция ядер вызывает формирование базального расширения клеток (Schoenwolf, Franks, 1984). Аналогичные процессы наблюдались в нервной трубке (Савельев, 1985). Было показано, в частности, что миграция ядер при изгибании нейроэпителиального пласта всегда направлена в сторону распределяющегося участка мембраны клетки, причем независимо от того, расширяется базальный или апикальный конец клетки. Однако до настоящего времени не известно, чем контролируется позиция ядра поляризованной клетки.

Некоторые исследователи полагают, что микрофиламенты непосредственно воздействуют на интеркинетическую миграцию ядра, посредством этого регулируя его положение (Hinds, Ruffett, 1971; Lee, Kalmus, 1976; Webster, Langman, 1978). Эти предположения не подтвердились в дальнейших исследованиях (Massier, 1976; Messier, Anelair, 1977).

Определенную ясность в вопрос о причинах миграции ядер внесли исследования Смита и Шенвольфа (Smith, Schoenwolf, 1988), которые показали, что на подвижность ядра в клетке и опосредованное его движением расширение базального конца клетки влияет пролиферативный цикл. Известно, что интеркинетическая миграция ядер нейроэпителиальных клеток является результатом изменения позиций ядра во время клеточного цикла (Saner, 1935;

Saner, Chittenden, 1959; Fujitu, 1962; Martin, Langman, 1965; Waterson, 1965; Langman et al., 1966). Однако Смит и Шенвольф поставили перед собой другую задачу: выяснить, как влияет на форму клеток в пласте пролиферативный цикл. Они использовали эмбрионы цыпленка, обработанных  $H^3$ -тимидином. Параметры клеточного цикла, положение ядра и размер клетки, оценивались на поперечных срезах через средний мозг. Для оценок были выбраны три зоны: непарная медиальная и парные дорсолатеральные области нервной пластинки (см. рис. 5). Из предыдущих исследований было известно, что медиальная зона нервной пластинки содержит преимущественно колбовидные клетки, а латеральная — веретенноподобные (Schoenwolf, Franks, 1984). Была известна и динамика зональных трансформаций веретенновидных клеток в колбовидные. До начала сворачивания нервной пластинки в медиальной зоне около 30% клеток были колбовидными и более 70% — веретенновидными. После завершения нейруляции 70% клеток в средней зоне и 55% в латеральной зоне становятся колбовидными. Эти сведения не вступают в противоречия с ранними данными авторов, поскольку общее количество колбовидных клеток в нервной пластинке не превышает 10%.

Возникновение колбовидной формы клеток зависит от пролиферативного цикла. Для большинства позвоночных характерна апикальная пролиферация нейробластов (см. рис. 6, б). Независимо от видовой специфики ядра клеток в монослойном нейроэпителии делятся преимущественно по апикальной поверхности пласта, причем телофаза латеральных клеток продолжается дольше, чем у медиальных. Поэтому их дочерние клетки находятся в базальном районе меньше время, чем клетки медиальной области. В результате этого в латеральной зоне формируется меньше колбовидных клеток, чем в медиальной. Дочерние клетки входят в фазу  $G_1$  и  $TM$  в апикальном районе нервной пластинки, но находятся там очень короткое время. Так как авторы обнаружили инвертированные колбовидные клетки с  $H^3$ -тимидиновой меткой, они пришли к выводу, что ядра находятся в  $S$  фазе до начала миграции. Ядра клеток синтезируют ДНК, пока они неподвижны, т.е. когда начинают двигаться базально и когда возвращаются назад. В медиальной зоне, где колбовидных клеток больше, чем в латеральной, ядра находятся в базальной части клеток на протяжении  $S$  фазы клеточного цикла (см. рис. 6, б, в). Ядра, вошедшие в  $G_2$  фазу, также остаются в этой фазе дольше, чем клетки латеральной зоны пластинки. Базальная локализация ядер в период  $S$  и  $G_2$  увеличивает колбовидность клеток медиальной зоны. Общее время генерации клеток в латеральных зонах короче, чем в медиальных, а сами клетки латеральных зон значительно длиннее. В результате ядра латеральных клеток дольше мигрируют от апикального до базального слоя и уменьшают колбовидность этих клеток (см. рис. 6, б, в). Следовательно, основной причиной

региональной специфичности в расположении колбовидных клеток являются продолжительность  $S$  и  $G_2$  фаз и длина клеток. Возможно, что разница в  $S$  фазе связана со специфическим биосинтезом и влияет на дальнейший морфогенез клетки (Smith, Schoenwolf, 1988). С точки зрения этих авторов, наблюдаемое различие клеточного цикла может быть связано с другими феноменами, не зависящими от колбовидности клеток, в том числе и с надклеточным уровнем организации нервной пластинки.

Подводя итог обзору вероятных механизмов сворачивания нервной трубки в однослойном эпителии, надо отметить, что основной и доказанной причиной нейруляции является поляризация клеток — вытягивание вдоль длинной оси за счет формирования пула парааксиальных микротрубочек.

Вторым по значимости процессом, приводящим к замыканию нервной трубки, является возникновение колбовидных клеток. Хотя колбовидность клеток и имеет место, ее роль в формировании нервной трубки недостаточно ясна. Известно, что микрофиламенты апикальной части колбовидных клеток не играют роли в нейруляции, а природа базального расширения нейроэпителиальных клеток неизвестна. Можно только констатировать наличие колбовидных клеток во время нейруляции, но являются ли эти клетки причиной или следствием сворачивания нервной пластинки, сказать нельзя. Открыт и вопрос о причинах зональных различий в поляризации клеток нервной пластинки, а также о механизмах, интегрирующих согласованные действия отдельных нейроэпителиальных клеток.

### Нейруляция в двуслойном нейроэпителии

У ряда видов позвоночных животных нейроэпителии многослойны. Среди наиболее изученных видов самому детальному анализу подвергалась нервная пластинка шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Hugehes, 1957; Ltrup, 1965; Baker, Schroder, 1967; Schroeder, 1973; M. Jacobson, 1982). Особенность нервной пластинки шпорцевой лягушки — ее двуслойная организация. Нервная пластинка состоит из двух слоев: эпидермального и гиподермального слоя эктодермы (см. рис. 4, в). Эпидермальный слой лежит снаружи и на поздних стадиях развития включается в дно, внутренние стенки нервной пластинки и формирует наружный слой эпидермиса. Гиподермальный слой пигментирован значительно сильнее, за что получил название «темной» эктодермы (Newkoop, Florschütz, 1950). Гиподермальный слой дает производные нервной системы: дно нервной пластинки и латеральные стенки нервной трубки. Кроме того, из этого слоя дифференцируются клетки нервного гребня и пигментированный слой эпидермиса. В отличие от однослойного эпителия клетки эпидермального и гиподермального слоев

могут двигаться друг относительно друга, что накладывает на нейруляцию шпорцевой лягушки ряд специфических особенностей. У нее происходит не сворачивание нервной пластинки, а постепенное наплзание клеток, расположенных в зоне валиков, на клетки в медиальной зоне нервной пластинки (см. рис. 5, а, б, в). Поверхностные слои клеток скользят к средней части нервной пластинки по внутренним и сливаются по средней линии. Фактического подъема медуллярных валиков нет. Изменяется миграция поверхностно расположенных клеток эпидермального слоя нейроэктодермы. Когда нервная пластинка замыкается (стадия 20), формируется очень маленькая полость внутри трубки — желудочек мозга. Просвет желудочка спинного мозга меньше, чем диаметр одной клетки (Schroeder, 1970). Только спустя некоторое время после замыкания нервной трубки (к 22-й стадии развития) формируется достаточно обширная полость головного и спинного мозга. По сути дела, если пренебречь размерами первичной полости, то можно сказать, что она возникает шизоцельным путем в результате встречной миграции клеток эпидермального и гиподермального слоев нейроэктодермы.

Из приведенного описания нейруляции ясно, что этот процесс осуществляется гораздо более сложными механизмами, чем в однослойном нейроэпителии. В клетках эпидермального слоя нейроэктодермы *Xenopus* и *Hyla* были найдены высокоупорядоченные группы микрофиламентов, сходные по организации с апикальными микрофиламентами однослойного нейроэпителия. Однако апикальное сжатие не объясняет механизмов миграции клеток и независимых нейруляционных движений эпидермального и гиподермального слоев клеток. Как и в однослойном эпителии, инициация замыкания нервной пластинки является результатом того, что кубовидные клетки начинают деформироваться в колбовидные. Поляризация клеток обусловлена сборкой микротрубочек, а ретракцию апикального участка клеток связывают с активностью микрофиламентов (Schroeder, 1970). Остается неясной роль гиподермальной части нейроэпителия, так как перечисленные особенности организации характерны для эпидермального слоя клеток. Открыт вопрос и о причинах перемещения клеток эпидермального и гиподермального слоев нейроэпителия при формировании мозговых желудочков.

Перечисленные особенности нейруляции двуслойного нейроэпителия характерны и для нервных пластинок смешанного типа, когда пласт организован из клеток, связанных одновременно с одной или двумя мембранами. Но в таких нейроэпителиальных пластах процесс нейруляции зависит от процентного соотношения между клетками этих двух типов. Если больше половины клеток связаны с обоими краями пласта, то нейруляция пойдет по типу, характерному для однослойного нейроэпителия. В том случае,

если преобладают клетки, связанные только с одной из поверхностей пласта, будет преобладать миграционный тип нейруляции, характерный для многослойного нейроэпителия.

Механизмы нейруляции как в однослойном, так и в многослойном нейроэпителии изучены весьма плохо. В нейруляцию могут быть вовлечены как внутренние, так и внешние силы (Schroeder, 1970; Burnside, 1973; Karfunkel, 1974; Schoenwolf, 1982). К настоящему времени существует по меньшей мере 13–14 моделей нейруляции, которые в большей или меньшей степени отражают реальный процесс сворачивания нейроэпителиального пласта в трубку (см. обзоры: Gordon, 1985; Jacobson, 1981; Schoenwolf et al., 1988). Однако ни одна из предложенных гипотез не ответила на вопрос о причинах сворачивания нейроэпителиального пласта в трубку.

В самом простом случае, когда мы имеем дело с однослойным нейроэпителием, можно предположить источники сил, приводящие к формированию нервной трубки. Стимулом к началу нейруляции является сам факт взаимодействия между клетками нейроэктодермы и хордомезодермы. По-видимому, процесс индукции может быть результатом механических взаимодействий между клетками эктодермы и хордомезодермы. На это указывают опыты Дюпра (Duprat et al., 1990), в которых показано, что нейральная дифференцировка легко стимулируется диссоциацией клеток нейроэктодермы в отсутствие хордомезодермы.

Индукционное воздействие вызывает поляризацию клеток в области нейроэктодермы. Это приводит к увеличению толщины эктодермального пласта в области зачатка нервной пластинки. После вытягивания по нормалям к пласту нейроэпителиальные клетки из столбчатых становятся колбовидными, что сопровождается редукцией мембран, выходящих на внешнюю поверхность пласта, и расширением базальных участков мембраны. Колбовидность клеток увеличивается и за счет миграции ядер в расширенную часть клеток (см. рис. 6, в). В результате сокращения наружной поверхности пласта и расширения внутренней поверхности края нервной пластинки приподнимаются над поверхностью зародыша. Этот процесс усиливается механическими силами, действующими на нейруляцию. По данным Джекобсона (Jacobson, 1981), нервная пластинка на стадии нейруляции испытывает ретрокаудальное растяжение. Роль этого механического воздействия можно оценить в эксперименте с кусочком ткани или носовым платком. Для этого необходимо расстелить платок на гладкой поверхности стола и указательными пальцами рук потянуть за края. Между пальцами возникнет растягиваемая зона, иллюстрирующая основную поверхность нервной пластинки, а ее края приподнимутся, моделируя начальные стадии формирования нервной трубки. Понятно, что смоделированное на ткани механическое натяжение усиливает сворачивание нервной трубки.

# ФАЗЫ НЕЙРУЛЯЦИИ

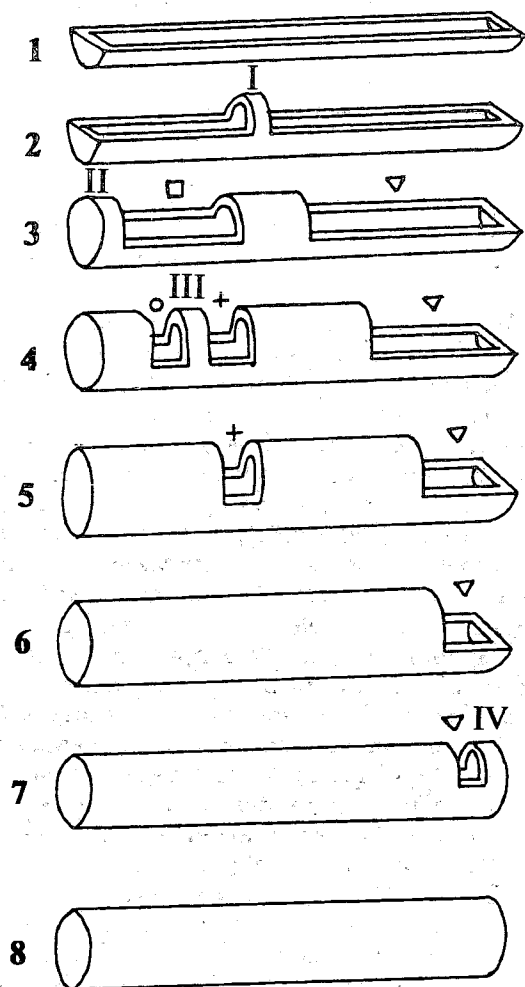


Рис. 7. Сворачивание нервной трубки у эмбриона мыши. Нейруляция проходит в восемь этапов (№1-8). Передний конец тела слева. I-IV — зоны независимого смыкания участков нервной трубки. ▽ — каудальный нейропор, □ — передний нейропор, + — заднемозговой нейропор, o — переднемозговой нейропор (по Sakai, 1989)

Таким образом, в основе нейруляции лежит несколько процессов, усиливающих друг друга и приводящих к формированию нейроэпителиального цилиндра с полостью внутри.

Заканчивая краткий обзор формирования нервной трубки, следует подчеркнуть, что замыкание краев пластинки не является столь простым процессом, как представлялось ранее. Детальное изучение сворачивания нервной трубки у мыши выявило, по меньшей мере, восемь морфологических фаз нейруляции (Sakai, 1987, 1989). На рис. 7 приведена схема этого автора, иллюстрирующая фазы формирования нервной трубки. Из схемы ясно, что нейруляция как формообразовательный процесс несет в себе пространственную разметку основных отделов мозга, хотя количественное соотношение между зачатками в развитии быстро меняется. Анализ нейруляции у мыши позволил автору описать несколько новых нейропоров — зоны открытой нервной трубки, ограниченные смыкающимися нервными валиками. Кроме рострального нейропора и кишечно-мозгового канала он обнаружил переднемозговой и заднемозговой нейропоры (см. рис. 7). По-видимому, для большинства позвоночных характерна более простая нейруляция, но достоверными данными на этот счет мы не располагаем.

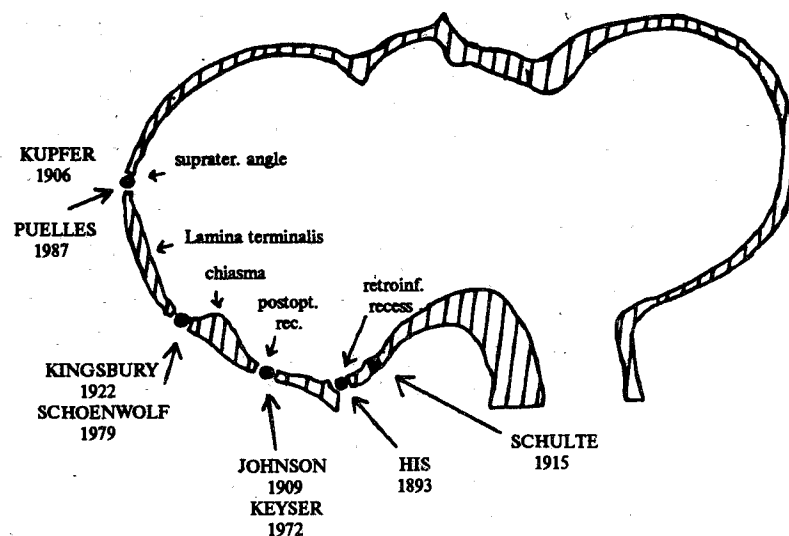


Рис. 8. Схема сагиттального сечения головного мозга цыпленка, на которой обозначена локализация нейропора по данным разных авторов. Окончательная локализация нейропора была установлена в опытах Puelles с соавт. (1987)

Нейруляция завершается замыканием нервной трубки. Однако на первых порах в ней остаются два отверстия: нейропор и кишечно-мозговой канал (рис. 7, 8). Оба отверстия существуют

непродолжительное время, а затем зарастают. Время существования отверстий имеет высокую видоспецифичность. У одних видов они существуют долго, тогда как у других закрываются вскоре после нейруляции. В целом кишечно-мозговой канал существует дольше, чем нейропор, что делает нервную трубку открытой системой. Надо отметить, что кишечно-мозговой канал существует во время всего периода раннего формирования мозга, что исключает бытовавшие в конце XIX в. идеи о гидростатической природе выпячивания мозговых пузырей.

Если относительно локализации кишечно-мозгового канала существует единство взглядов, то на локализацию переднего нейропора даже у хорошо исследованного зародыша цыпленка существует несколько точек зрения (рис. 8). Только недавно в изящных опытах испанских исследователей была найдена истина (Puelles et al., 1987). В этих опытах в полость нервной трубки вводили черную нейлоновую нить. После нейруляции она оказывалась в нейропоре. По локализации нити, проходящей через нейропор, установлено, что его отверстие перемещается во время нейруляции. Нейропор смещается из вентрального в дорсальное положение. Авторы подтвердили правильность представлений Купфера о локализации нейропора на уровне обонятельных плакод зародыша. Однако наибольший интерес представляет факт подвижности отверстия нейропора после завершения нейруляции.

Таким образом, нейруляция как морфологический процесс исследован недостаточно полно. Тем не менее ясно, что события, связанные с замыканием нервной трубки, несут в себе запас топологической информации, который используется в дальнейшем морфогенезе нервной системы.

#### 1.4. СЕГМЕНТАЦИЯ НЕРВНОЙ ТРУБКИ И ФОРМИРОВАНИЕ ОСНОВНЫХ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Начиная с работ Бэра (Baer, 1837), Станиуса (Stanisus, 1854) и Миклухо-Маклая (1870) сложилась широко распространенная схема развития эмбрионального мозга, которая, не претерпев почти никаких изменений, сохранилась до настоящего времени (Kuchlenbeck, 1927; M. Jacobson, 1978). Согласно этой схеме, развитие формы мозга складывается из нескольких этапов. На первом этапе, после нейруляции, формируется гомоэнная нервная трубка со значительным изгибом в головной области (рис. 9, а). Вторая стадия заключается в разделении головной части нервной трубки на два отдела: prosencephalon и mesencephalon. На третьем этапе prosencephalon расчленяется на mesencephalon и telen-diencephalon (рис. 9, б). Формируются три мозговых пузыря: передний, средний и задний. Затем из этих трех мозговых пузырей развиваются пять. Передний мозговой пузырь дифференцируется на

парные полушария переднего мозга и промежуточный пузырек diencephalon; каудальный мозговой пузырь разделяется на задний (metencephalon) и продолговатый (myelencephalon) пузыри. Таким образом, мозг приходит к пятипузырной стадии, которая морфогенетически закреплена в существовании пяти дефинитивных отделов мозга (см. рис. 9, в). Эта схема развития мозга широко используется для сравнительноэмбриологических работ и построения эволюционных концепций (His, 1892; Kingsbury, 1922; Huettner, 1953; Campbell, Hoelos, 1970; Ebbeson, 1984). Однако среди исследователей до настоящего времени не существует единого мнения о последовательности дифференцировки отделов мозга, а работы Таккет (Tuckett, Morris-Kay, 1985 а, б) поставили под вопрос образование мозговых пузырей за счет поперечных перетяжек нервной трубки.

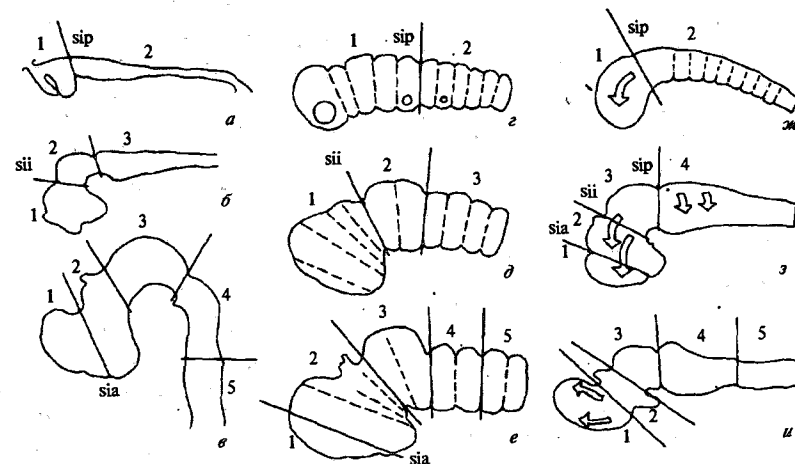


Рис. 9. Схематическое изображение трех гипотез сегментации мозга после нейруляции.

а-в — наиболее известная схема расчленения нервной трубки за счет мозговых бороздок; г-е — нейроморфная модель сегментации мозга (по Bergqvist, 1956 с изменениями), ж-и — модель развития мозга, сочетающая перемещение нейроэпителиальных пластов и подразделение на основные отделы. Межмозговые бороздки: SIP — sulcus intraencephalicus posterior, SIA — s.i. anterior, SII — s.i. intermedius.

Цифрами отмечены мозговые пузыри, которые возникают после появления мозговых бороздок; стрелками отмечены основные направления движения пластов клеток

На протяжении последних ста лет исследователи пытались объяснить нейроморфогенез, углубляя и детализируя сведения об изменениях формы мозга (Griggs, 1910; Sumi, 1926; Baker, 1932; Graves, 1959) или подчиняя полученные данные какой-либо общей идее (Bergqvist, Kallen, 1954, 1955; Kallen, 1955, 1965; Bergqvist, 1956; Meier, Tam, 1982).

Начало подробным исследованиям формы эмбрионального мозга положил Григгс (Griggs, 1910), который, анализируя ранние стадии развития центральной нервной системы, показал существование бороздок на нервной пластинке амбистомы, которые он гомологизировал с границами будущих отделов мозга. Первой подробной работой, посвященной изменению формы мозга после нейруляции, было исследование Суми (Sumi, 1926). Он с помощью объемных пластических реконструкций целого мозга и его желудочков показал, что после нейруляции мозг *Hynobius nebulosis* (Amphibia) разделяется на два отдела за счет бороздки (sulcus intraencephalicus posterior-S.I.P.), отделяющая prosencephalon и rhombencephalon. Каудально от этой бороздки на стадии хвостовой почки Суми выделял четыре нейромера, соответствующих зонам дифференцировки черепномозговых нервов. Этим автором была реконструирована еще одна стадия — эмбрион 5 мм, на которой он обнаружил разделение мозга на три пузыря: prosencephalon, mesencephalon и rhombencephalon. Реальную границу между prosencephalon и mesencephalon он обнаружить не смог, а ориентировался на мозговые выпячивания. К концу этой же стадии мозг разделяется на четыре пузыря за счет S.I.A., а к вылуплению — на пять пузырей (см. рис. 9, ж-и). К сожалению, Суми реконструировал только две стадии развития мозга до момента вылупления личинок. Однако его данные свидетельствуют о том, что S.I.A. возникает вторично, а не является сохранившейся границей нейромера. В этом выводе он противоречит работе Григгса (Griggs, 1910), поскольку предполагает независимую от нейромеров дифференцировку пузырей мозга.

Сходными методами были выполнены работы Бур (Burr, 1922), Бейкера и Грэйвса (Baker, Graves, 1932). Хотя Бур и не ставил перед собой задачи описания развития головного мозга амбистомы, ему пришлось проанализировать несколько стадий развития мозга, которые были связаны с замыканием нейропора. Бур реконструировал из воска мозг амбистомы, начиная с 30-й стадии развития, что позволило ему адаптировать эксперименты к изменению пространственной организации ростральных отделов мозга.

По этому же пути шли и другие исследователи, сталкиваясь с необходимостью каждый раз делать ортогональные реконструкции мозга, чтобы избежать топографических ошибок в экспериментах или описании развития (Jonston, 1909, 1923; Warren, 1905; Coghill, 1928, 1930; Herrick, 1925, 1937). Последней попыткой подробно исследовать ранний морфогенез головного мозга амфибий была работа Бейкера и Грэйвса (Baker, Graves, 1932). По всей видимости, они не знали о существовании опубликованной ранее в Японии работы Суми (Sumi, 1926), чем объясняется их заявление об уникальности и детальности собственных исследований. Они рассматривали развитие мозга амбистомы от стадии поздней нейрулы до начала питания личинок. Для этого авторы, как и Суми

(Sumi, 1926), использовали последовательные пластические реконструкции и стереотаксические координаты для анализа развивающегося мозга. Однако они проанализировали только три стадии в эмбриональном развитии мозга: от нейрулы до вылупления амбистомы и три — от вылупления до активного питания личинок (Baker, Graves, 1932). Используя координаты с точкой отсчета в S.I.P., они показали связь увеличения размеров мозга с движением формирующихся зачатков мозга в ростральном направлении, что совпадает с данными Суми (Sumi, 1926) и согласуется с работами по перетеканию пластов клеток у крыс (Tuckett, Morris-Kay, 1985 а, 1986). Бейкер и Грэйвс использовали единичные стадии для анализа раннего эмбриогенеза мозга, что не позволило выявить закономерностей развития мозговых пузырей и трансформации границ отделов мозга. Авторы фактически отказались рассматривать развитие мозга с точки зрения дифференцировки мозговых пузырей, а опирались в описании на формирование зачатков отдельных структур мозга. Этот подход осуществлялся для описания позднего развития мозга Когхиллом и Хэрриком (Coghill, 1928, 1930; Herrick, 1938), которые использовали его для описания функциональной дифференцировки созревающего мозга. Надо отметить, что работа Бейкера и Грэйвса является до настоящего времени отправной точкой для исследования раннего развития мозга позвоночных (M. Jacobson, 1982).

После длительного перерыва в исследовании формообразования головного мозга возникла идея о чисто нейромерном происхождении мозговых пузырей и большинства структур мозга (см. рис. 9, з-е) (Bergqvist, 1952, 1956; Kallen, 1954). Согласно этой модели, в развитии мозга выделяются четыре морфогенетических периода. На раннем этапе формообразования мозг состоит из двух частей: archencephalon и deuteroencephalon. Границей между этими отделами является S.I.P., которая одновременно выполняет функции нейромерной границы (Griggs, 1910; Bergqvist, 1956). Эта бороздка выделяется на протяжении всего онтогенеза и сохраняется у взрослых животных. Причины возникновения этой бороздки выявлены еще в работах Шпемана (Spemann, 1936), а затем уточнены в работах Бергквиста и Каллена (Bergqvist, Kallen, 1954). В основе образования S.I.P. лежит влияние нотохорда, который подстилает prosencephalon (deuteroencephalon), тогда как prosencephalon (archencephalon) развивается над прехордальной пластинкой. Различные влияния структур, подстилающих эти отделы, приводят к формированию на их границе теменного изгиба, каудального выпячивания воронки и определяют форму мозговой части гипофиза (Гурвич, 1909; Jonston, 1923; Baker, Graves, 1932; Bergqvist, Kallen, 1955). Существование этого морфогенетического этапа подтверждают сторонники как классической схемы онтогенеза мозга (Baker, Graves, 1932; Meier, 1982), так и пронеуромерной схемы развития (Bergqvist, 1956).

На первом этапе эмбрионального развития мозга, с точки зрения нейромерной модели, формируются нейромеры, разделяющие мозг на два крупных нейромерных блока: *prosencephalon* и *rhombencephalon*. Любые возникающие после нейруляции поперечные перетяжки мозга рассматриваются как нейромеры 1-го порядка, хотя они могут разделять далеко стоящие друг от друга отделы. Быстрая интернейромерная фаза II, которая характеризуется образованием перетяжек в нейромерах 1-го порядка переходит в постнейромерный период. На постнейромерной стадии Бергквист (Bergqwist, 1952) выделяет 11 нейромеров, которые включают в себя весь головной мозг. Из первых двух нейромеров образуется передний мозг; третий, четвертый и пятый нейромеры дают промежуточный мозг; шестой и седьмой — средний мозг, а нейромеры с восьмого по одиннадцатый формируют задний мозг (см. рис. 9, г-е). С точки зрения авторов нейромерной гипотезы развития мозга, каждый нейромер должен закладывать основу для подразделения головного мозга на черепномозговые нервы. Этим они подтверждают функциональную детерминированность и независимость морфогенетического развития нейромеров (Bergqwist, 1952, 1956; Kallen, Lindskey, 1953; Bergqwist, Kallen, 1954, 1955; Kallen, 1955).

Авторы нейромерной гипотезы эмбриогенеза мозга констатируют независимую от соседних нейромеров дифференцировку и миграции клеток в области нейромеров, рассматривая их как морфогенетические обособленные субъединицы. Однако более поздние исследования на птицах (Vaage, 1969), млекопитающих и других позвоночных (Tam, Meier, Jacobson, 1982; Tuckett, Morris-Kay, 1985 а, б) не подтвердили взглядов сторонников нейромерной модели развития и происхождения нервной системы (Meier, 1982; Meier, Tam, 1982; Tuckett, 1984; Tuckett, Morris-Kay, 1985 а, б).

В серии наиболее интересных работ Такетт с соавт. (1984, 1985, 1986) отрицается нейромерно-градиентный подход к сегментации мозга. Авторы показывают, что головная нейруляция завершается образованием двух мезомеров (нейромеров среднего мозга) и девяти ромбомеров, в которые включается и преопитическая бороздка. Такетт и Моррис-Кей (Tuckett, Morris-Kay, 1985) не обнаружили сегментацию в *prosencephalon* ни с помощью сканирующей электронной микроскопии, ни с помощью световой микроскопии. Радиоавтографический анализ нервной трубки также показал отсутствие дифференциальных митозов в нейромерах. Их морфологические границы формируются на основе локального ограничения бороздками зон митозов в базальной части мозга. Для исследования природы и особенностей развития нейромеров Такетт и Моррис-Кей (Tuckett, Morris-Kay, 1985 а, б) провели экспериментальное исследование с применением колхицинового и цитохалазинового блоков развивающейся нервной трубки эмбриона мыши. На основании экспериментального и морфогенетического

исследования развития нейромеров была предложена гипотеза их происхождения. В гипотезе предполагается, что долготные нейроэпителиальные выпуклости между микротрубочковыми блоками присутствуют внутри межнейромерных дуг, а причина выпуклостей — развитие формы пласта вдоль линии меньшего сопротивления. Фактически цикл этих исследований приводит к трем выводам: 1) развитие нейромера зависит от образования или редукции микрофиламентов; 2) пролиферация не связана с формообразованием нейромеров; 3) причины изменения формы мозга надо искать в ориентации и форме клеток.

Надо отметить, что еще в 1926–1930 гг. Когхилл (Coghill, 1926, 1930), занимаясь исследованием корреляции морфологических изменений в нервной системе с физиологическими процессами, не смог обнаружить локализованных митозов и внутринейромерной дифференцировки нейробластов. Подробно исследуя амфибий, он провел количественный анализ развития мозга, который показал отсутствие понейромерного распределения числа нейробластов, что совпадает с выводами, сделанными Такетт и Моррис-Кей.

Таким образом, к настоящему времени сложились три точки зрения на раннее развитие головного мозга. Первая точка зрения связывает развитие мозга с постепенным усложнением и дифференцировкой эволюционно сложившихся отделов и структур мозга (Jonston, 1909, 1923; Herrick, 1925). Вторая точка зрения предусматривает жесткую клональную или понейромерную детерминированность судьбы каждой клетки и ее потомков, начиная от стадии бластулы (Bergqwist, 1954, 1955; M. Jacobson, 1978, 1982; Jacobson, Meier, 1984). Третья точка зрения предполагает частичную свободу развития клеток и пластов мозга, которая сочетается с пространственной детерминацией положения некоторых групп клеток и структур мозга (Tuckett, Morris-Kay, 1985; Савельев, 1987 б).

Для того, чтобы понять причины разногласий по вопросам о сегментации мозга, необходимо более подробно, чем это делалось ранее, проследить раннее развитие формы головного мозга. Такое исследование было проведено на сибирском углозубе *Hynobius keyserlingii* (Amphibia, Urodela) (Савельев, 1987). В этом исследовании проанализировано 14 последовательных стадий развития головного мозга от периода формирования нервной трубки до начала активного питания личинок. В работе использовались последовательные пластические реконструкции, витальное мечение перемещающихся клеток и количественный анализ развития основных отделов мозга и периферических анализаторов.

Пластические реконструкции развивающегося мозга сибирского углозуба позволили заключить, что головной конец нервной трубки вначале образует два пузыря (*prosencephalon* и *rhombencephalon*), затем четыре (*prosencephalon* разделяется на передний, промежуточный и средний мозг) и, наконец, пять пузырей

(rhombencephalon разделяется на задний и продолговатый мозг) (см. рис. 9, ж-и). Подобная последовательность формообразования отличается от общепринятых представлений о морфогенезе мозга позвоночных, согласно которым головной отдел нервной трубки проходит двух-, трех- и пятипузырные стадии (Kuhlenbeck, 1927). Однако эти данные не следует распространять на все виды позвоночных, поскольку у двоякодышащих и костистых рыб известны двух-, четырех- и пятипузырные стадии морфогенеза мозга. У близкородственного сибирскому углозуба вида *Hypobius nebulosis* описаны двух-, трех-, четырех- и пятипузырные стадии развития мозга (Sumi, 1926). Не исключено, что дальнейшие исследования расширят число примеров вариаций формообразования эмбрионального мозга. С нашей точки зрения важно, что различные варианты морфогенеза во всех случаях завершаются канализованным итогом — образованием пяти мозговых пузырей.

Одновременно с образованием четырех мозговых пузырей в rhombencephalon сибирского углозуба появляются пять поперечных вздутий — нейромеров. Они исчезают после деления rhombencephalon на задний и промежуточный мозг. На наш взгляд, не следует смешивать транзитные образования — нейромеры — с постоянно существующими отделами мозга.

В результате исследования мозга сибирского углозуба удалось картировать основные перемещения пластов клеток мозга на различных стадиях эмбриогенеза (см. рис. 7, 8). Из рostrальной части среднего мозга нейроэпителиальные пласты перемещаются в каудальном и вентральном направлениях к заднему и промежуточному мозгу; из вентральной части промежуточного мозга — в вентральном направлении к переднему мозгу и в каудальном — к воронке. Кроме наших исследований на мозге сибирского углозуба (Савельев, 1987) перемещение пластов клеток из зачатка среднего мозга в промежуточный и передний показано только в работах Такетт и Моррис-Кей (1985) на эмбрионах крыс. Если сопоставить направления перемещения пластов клеток с ориентацией роста нервных волокон (Herrick, 1925; Coghill, 1928, 1930), то обнаружится их полное совпадение. Это позволяет предположить наличие общих преформированных путей для перемещения клеток и роста их отростков (Katz, Lasek, Mauta, 1980; Trincaus, 1985). В нашей работе (Савельев, 1987) показано, что в период активного изменения формы мозга (выпячивание глазных пузырей, мозговых пузырей, закладка воронки и парных полушарий) число клеток остается практически неизменным, хотя наблюдается перераспределение их численности по отделам мозга. Сходные результаты были получены на эмбрионах аксолотлей (Coghill, 1928, 1930) и крыс (Tuckett, 1985 a, b). По-видимому, активное формообразование мозга и клеточная пролиферация являются мало совместимыми процессами.

Таким образом, развитие мозга сибирского углозуба подтверждает существование смешанного пути формообразования. В развитии мозга этого объекта присутствуют рostrальные миграции, деление мозга на постоянные отделы и нейромерная организация заднего мозга (Савельев, 1987). По всей видимости, наиболее близка к реально существующим процессам схема, изображенная на рис. 9, ж-и. Опираясь на собственные и литературные данные, можно предположить следующую последовательность формообразовательных событий. На первом этапе мозг разделяется на два пузыря, в которые может входить любая комбинация закладок будущих мозговых отделов (см. рис. 9, ж-и). Затем, начинаются интенсивные миграции нейроэпителиальных клеток в рostrальном направлении. Это приводит к перемещению клеточного материала и закладке переднего мозга. Массовое перетекание клеток завершается после сегментации мозга на основные отделы. Независимо от расчленения мозга постоянными бороздками, задний мозг сегментируется временно существующими нейромерами. Исчезновение нейромеров и дифференцировка нейробластов завершают период активного формообразования. Рассматривая выделение основных отделов головного мозга, надо отметить, что несмотря на общую схему сегментации, существует масса видоспецифических особенностей. Даже в пределах одной систематической группы можно выделить видоспецифические характеристики образования мозговых границ, которые отражаются и на фоне мозга после нейруляции (рис. 10, 11). На этих рисунках представлена внешняя форма мозга после замыкания нервной трубки у трех видов хвостатых амфибий. Представители одной группы имеют не только различную внешнюю форму мозга, но и различную систему его сегментации. Эти данные указывают на то, что сам процесс выделения основных отделов головного мозга является не результатом направленного отбора, а продуктом закономерностей формообразования.

Дальнейшее развитие формы зависит от локализации зон пролиферации и дифференцировки. Поэтому, рассмотрев в общих чертах развитие анатомической организации мозга, необходимо проанализировать топологию первичной дифференцировки.

### 1.5. ТОПОЛОГИЯ ПЕРВИЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НЕЙРОЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Дифференцировка нейроэпителиальных клеток является одним из ключевых вопросов нейробиологии (M. Jacobson, 1978; Cowan, 1982; Будко с соавт., 1985). Этот процесс включает в себя множество аспектов, среди которых кинетика пролиферации, стимуляция к выходу в дифференцировку и установление паттерна клеточных связей являются ключевыми. Эмбриологические исследования показывают, что нейробласты дифференцируются в головном мозгу

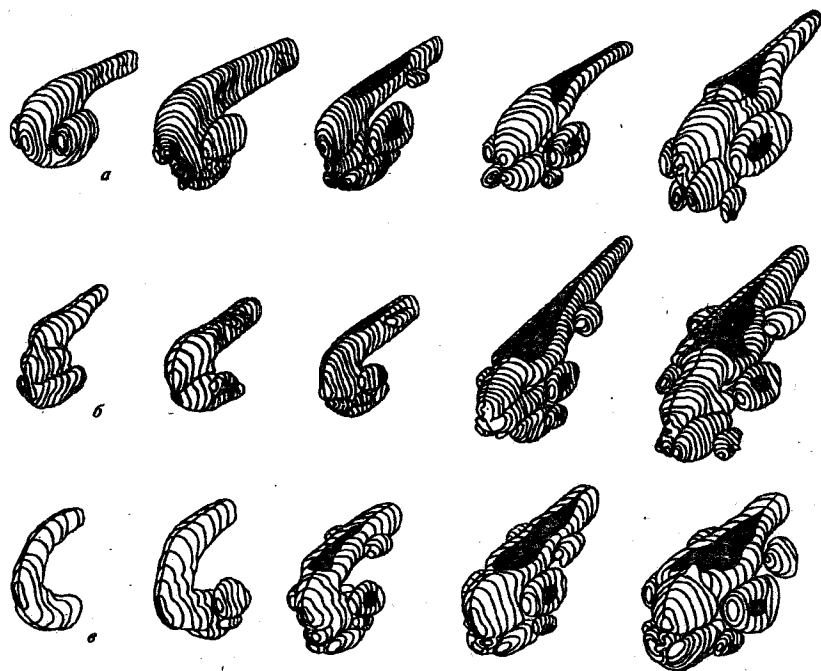


Рис. 10. Рисунки, сделанные по восковым пластическим реконструкциям развития мозга у трех видов хвостатых амфибий после нейруляции: а — сибирский углозуб, б — иглистый тритон, в — обыкновенный тритон.

Реконструкции охватывают период от окончания нейруляции до начала активного питания личинок. Заметно, что даже внешняя форма развивающегося мозга у представителей одной систематической группы сильно различается.

в различное время (Coghill, 1924, 1926, 1930; Herrick, 1937; O'Rahli et al., 1988; Muller, O'Rahli, 1988), причем в гиппокампе — и после окончания эмбрионального периода развития (Резников, 1981).

Отсутствие одновременности при выходе в дифференцировку создает условия для появления центров первичной дифференцировки нейробластов. Лучше всего топологическая неравномерность дифференцирующихся нейробластов была изучена на амфибиях. У хвостатых амфибий первые дифференцированные группы клеток появляются на латеральных поверхностях нервной трубки (рис. 12, а). Обычно зоны дифференцирующихся нейробластов появляются одновременно в различных областях головного мозга в виде ограниченных групп клеток. На первом этапе дифференцировки из пролиферации выходят не все клетки, а только 15–20% от числа клеток, находящихся под слоем появившихся отростков. Выход клеток в дифференцировку быстро нарастает, что приводит

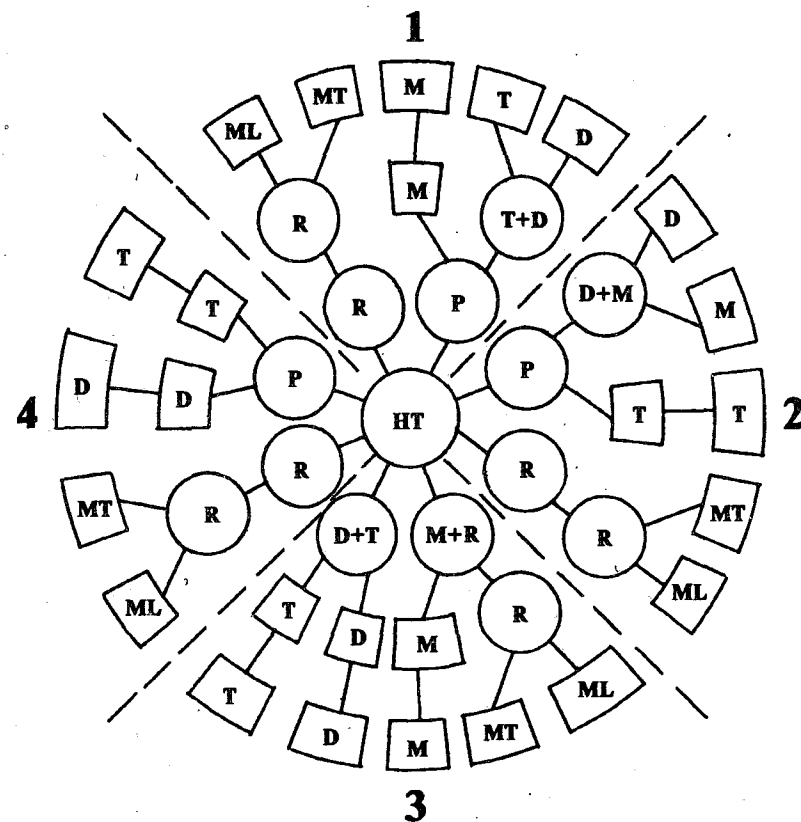


Рис. 11. Схема сегментации головного мозга на отделы у четырех видов хвостатых амфибий: 1 — *Hynobius nebulosis* (по Sumi, 1926), 2 — *Pleurodeles waltlii*, 3 — *Triturus vulgaris*, 4 — *Salamandrella keyserlingii*.

Развитие начинается от нервной трубки (HT) — (центр рисунка). о — участки мозга, включающие в себя несколько отделов, □ — окончательно выделившиеся структуры. P — presencephalon, R — rhombencephalon, T — telencephalon, D — diencephalon, M — mesencephalon, MT — metencephalon, ML — myelencephalon.

к формированию непрерывной зоны дифференцирующихся клеток и их отростков (рис. 13).

В 30-х годах Когхиллом и Херриком (Coghill, 1930; Herrick, 1937) были установлены некоторые закономерности в образовании первых связей. Ими было обнаружено, что существуют закономерности движения отростков между центрами первичной дифференцировки. Если клетка дифференцируется в непосредственной близости от центра первичной дифференцировки, то ее отросток растет по направлению к этому центру. В случае, если клетка лежит на некотором удалении от таких дифферен-

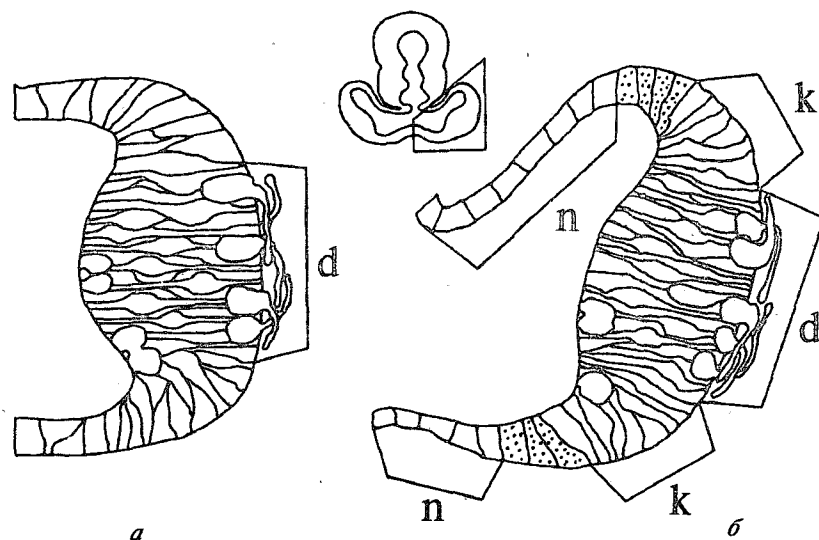


Рис. 12. Схемы поперечных срезов головного мозга хвостатых амфибий: а — на уровне заднего мозга, б — через зачаток полушария переднего мозга.

Нейробласты выходят в дифференцировку в регионах максимальной поляризации нейроэпителиальных клеток. Зоны дифференцировки окружают колбовидные клетки — *k*, которые соседствуют с полями распластанных клеток — *n*. Точками отмечены зоны перехода нейроэпителиальных клеток из колбовидной в распластannую форму

цировочных зон, ее отросток движется по границе между двумя этими центрами. Не менее важным результатом было выявление этими авторами изменения направлений движения отростков в зависимости от активности ближайшего центра дифференцировки. Отросток клетки растет в сторону области нейроэпителия с максимальной дифференцировочной активностью. Следовательно, центр с максимальной и продолжительной активностью должен «собрать» максимум первичных нервных связей. Это имеет место при нормальном развитии амфибий. Такой областью является район презумптивного заднего мозга, который дифференцируется первым и надолго сохраняет свое дифференцировочное превалирование над остальными структурами головного мозга (см. рис. 13). В раннем эмбриогенезе головного мозга существует явное колебание дифференцировочной активности в различных областях головного мозга. По мнению Когхилла (1930), разница в скоростях дифференцировки нейробластов может вызывать образование реципрокных связей. Эта модель страдает многими недостатками. С ее помощью нельзя объяснить образование межполушарных связей, одновременный рост зрительных нервов и их частичное перекрещивание (М. Jacobson, 1978). Однако причины первичного

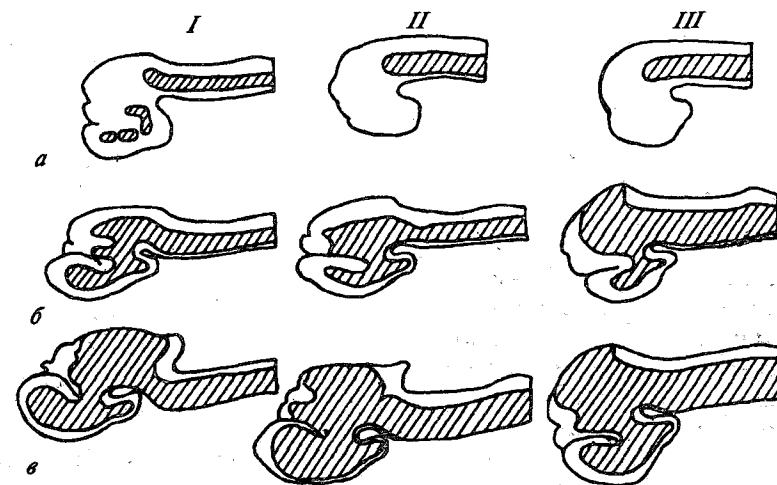


Рис. 13. Рисунки латеральных поверхностей пластических реконструкций головного мозга трех видов амфибий: I — сибирского углозуба, II — иглистого тритона, III — обыкновенного тритона.

Изображены стадии: а — начала дифференцировки, б — вылупление личинок, в — перехода к активному питанию

и ориентированного движения нейронов на поверхности нейроэпителия она объясняет удачно.

Дальнейшие исследования показали, что сложившаяся зона дифференцированных нейробластов расширяется по поверхности мозга медленно, образуя связи преимущественно внутри себя (Савельев, 1987 а, б). К моменту вылупления личинок хвостатых амфибий около 70–80% площади поверхности головного мозга покрыто волокнами. Ситуация слабо изменяется и к моменту начала активного питания, хотя площадь поверхности мозга, занятая отростками нервных клеток, значительно расширяется (см. рис. 13, а). Медленное распространение зон дифференцировки мозга связано с активным изменением формы мозга вокруг зон дифференцировки. Например, локализация дифференцированных клеток и их отростков в полушариях переднего мозга возможна только на латеральной (внешней) поверхности полушария (см. рис. 12, б, 13). Это обусловлено тем, что полушария переднего мозга продолжают активно увеличиваться в размерах на поздних этапах эмбрионального развития. Увеличение их размеров обусловлено формированием тонких медиальных и вентральных стенок полушарий. Обе стенки состоят из монослоя распластанных нейроэпителиальных клеток, которые даже не пролиферируют (см. рис. 12, б). Увеличение размеров полушарий у хвостатых амфибий достигается деполаризацией клеток краевых зон, расположенных между областями распластанных клеток монослойной стенки полушарий и районами пролиферации (см. рис. 12, б). Включение

клеток в монослойную стенку полушария увеличивает ее внешние размеры, тогда как фактический объем переднего мозга остается постоянным (Савельев, 1987, 6). Поскольку монослойный распластанный эпителий составляет большую часть медиальной, роstralной и вентральной стенок переднего мозга, зона дифференцировки сосредоточена только на латеральной поверхности полушария (см. рис. 12, 6, 13, 14).

Образование связей между клетками монослойного распластannого эпителия и зонами дифференцировок невозможно по трем основным причинам. Во-первых, в зоне плоского многослойного эпителия связи устанавливать не с кем, так как нет дифференцированных клеток. Во-вторых, если бы нервные волокна проходили по поверхности такого пласта, то надо было бы допустить возможность сжатия или значительного расширения аксонов, что в норме никогда не происходит (Сотников, 1985). Третьей причиной является отсутствие активных дифференцировочных процессов в районах распластannого монослойного нейроэпителия.

Таким образом, топология дифференцированных клеток и их отростков обусловлена процессами формообразования, в основе которых лежат различные проявления клеточной активности. Представление о невозможности выхода в дифференцировку нейроэпителиальных клеток в зонах активного изменения формы мозга формально непротиворечиво и подтверждено исследованиями на многих видах амфибий (Coghill, 1930; Baker, Graves, 1932; Heggick, 1937; Huettner, 1953). Однако объяснение направленности роста отростков первых дифференцированных нейробластов от одной зоны дифференциации к другой до настоящего времени не найдено. Если рассмотреть поперечный срез мозга (рис. 14), то ясно, что в начале дифференциации к вышедшим из пролиферации клеткам ближе находится зона дифференцировки на противоположной стороне мозга. Тем не менее, отростки двигаются вдоль одной из половин мозга и только на поздних этапах переходят на контрлатеральную сторону нервной трубки.

Понятно, что объяснить такое движение отростков исходя из позиций Когхилла-Хэррика нельзя, поскольку они не образуют связей между зонами высокоактивной дифференциации. Наоборот, связи между левой и правой половинами заднего мозга устанавливаются позднее, чем между зонами первичной дифференцировки на ипсилатеральной стороне мозга. Это явление было специально исследовано (Савельев, 1987 6), что позволило установить причину ограничения распространения отростков дифференцированных нервных клеток. При анализе развития сибирского углозуба было обнаружено, что первичная дифференцировка нейробластов происходит в зонах мозга, состоящих из поляризованных нейроэпителиальных клеток (см. рис. 14). В период дифференцировки клетки выходят на поверхность пласта и образуют отростки, причем отростки нейробластов двигаются по

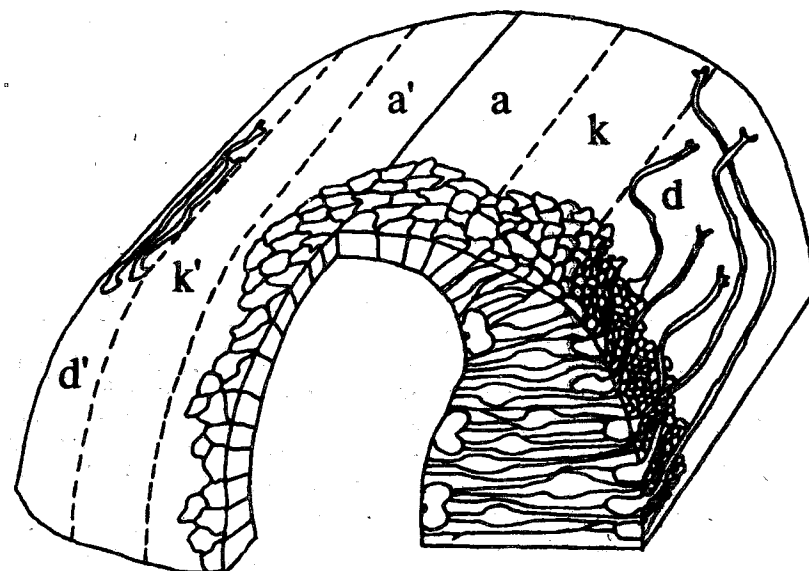


Рис. 14. Реконструкция топологии расположения клеток различных типов в начале дифференцировки.

a, a' — зоны распластанных клеток, k, k' — зоны колбовидных клеток, d, d' — зоны поляризации и выхода в дифференцировку. Отростки клеток двигаются по латеральной поверхности мозга, не пересекая областей распластанных клеток. Зоны движения отростков нейробластов ограничиваются регионами поляризованных клеток

поверхности пласта, состоящего только из торцов поляризованных клеток (см. рис. 14). Поэтому зоны дифференцировки и распространение нервных отростков топографически совпадают. Это наблюдение позволяет сделать один важный вывод. По-видимому, растущий аксон предпочитает двигаться только по неоднородному субстрату. Понятно, что гетерогенность поверхности пласта будет максимальной в зоне поляризованных клеток, потому что площадь их мембран, выходящих на поверхность, в несколько раз меньше, чем у скошенных, и в десятки раз меньше, чем у распластанных клеток (см. рис. 14). Из распределения волокон в эмбриональном мозге (см. рис. 13) видно, что отростки нервных клеток избегают движения по однородным мембранам распластанных клеток, выполняющих формообразовательные функции.

Таким образом, модель Когхилла-Хэррика может быть применена при условии, что отростки нейробластов выбирают для движения наиболее гетерогенную поверхность пласта. Тогда последовательность событий будет выглядеть следующим образом: 1) в различных отделах мозга появляются зоны дифференцировки нейроэпителиальных клеток, которые топологически совпадают с областями максимальной поляризации клеток; 2) зоны обладают

различной дифференцировочной активностью; число дифференцированных клеток нарастает быстро или медленно и меняется в процессе эмбрионального развития; 3) отростки нейроэпителиальных клеток двигаются от зон невысокой дифференцировочной активности к областям высокой дифференцировочной активности по поверхности пласта с максимальной гетерогенностью (по торцам поляризованных клеток), что ограничивает свободу движения нервных отростков.

Эта модель пригодна для моделирования топологии дифференцировки только на хвостатых амфибиях, поскольку у млекопитающих этот процесс значительно сложнее. Так, например, у человеческого эмбриона дифференцировка нейроэпителиальных клеток нервной трубки начинается еще до окончания нейруляции. Нейробласты выходят в дифференцировку в зоне первого слияния нервных валиков и образуют связи с соседними областями по мере замыкания медуллярных валиков.

Следовательно, причину топологических особенностей дифференцировки следует искать в процессах формирования, которые основаны на характерных свойствах нейроэпителиальных клеток.

## Глава 2

# МОРФОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПОДВИЖНОСТЬ НЕЙРОЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

**П**од свойствами клеток эмбрионального головного мозга подразумевается их способность выполнять те или иные функции. При выполнении морфогенетических функций они вступают на путь дифференцировки. Дифференцировка может носить обратимый или необратимый характер. В период эмбрионального развития нейроэпителиальные клетки вступают на путь обратной дифференцировки. Это обусловлено тем, что их формообразовательные функции носят временный характер. По окончании активного формообразования клетки выходят в цитологическую дифференцировку, которая в нервной системе обычно необратима. Однако и после дифференцировки известны случаи перехода клеток в эмбриональное состояние, что носит название трансдифференцировки и рассматривается при регенерации или патологии (Стокум, Миташов, 1990). Таким образом, формообразовательные функции нейроэпителиальных клеток носят эмбриональный характер и, как правило, отличаются от функций этих же клеток во взрослом организме. Необходимо отметить, что четкой границы между эмбриональными и «взрослыми» свойствами клеток провести нельзя. Это затруднено гетерохронностью созревания различных отделов головного мозга.

Участие клеток в процессах формирования, по-видимому, влияет на выбор путей более поздней дифференцировки. В этом отношении большую роль играет топографическая детерминация судьбы клетки. Клетка эмбриональной нервной ткани, оказавшись среди нехарактерного для нее окружения, может изменить свою судьбу, поэтому выяснение путей движения клеток в развитии мозга играет такую важную роль. С этим вопросом непосредственно смыкается проблема размножения и гибели клеток, которая реализуется в формировании через количественные аспекты морфогенеза эмбрионального мозга.

## 2.1. МИГРАЦИЯ КЛЕТОК

Движение клеток характерно для всего развития позвоночных. На ранних стадиях развития активно движется и сам зародыш, для того чтобы ориентировать положение клеток в пространстве. Например, центральная съемка зародышней млекопитающих показала, что бластоциста мыши перед прикреплением вращается

(Hsu, 1983). Внутри зародыша клетки мигрируют, начиная со стадии гаструляции и кончая постнатальным развитием, во всех известных частях организма. Этап миграции характерен для онтогенеза клетки, как и период пролиферации. После пролиферативного периода клетка должна переместиться на некоторое расстояние, с одной стороны, для того, чтобы выйти из зоны пролиферирующих клеток, а с другой — чтобы занять место, характерное для выполнения функций. Как правило, зоны пролиферации и зоны дифференцировки разнесены в пространстве. Чтобы преодолеть это расстояние, клетка должна пройти определенный путь — мигрировать. Однако существует и другой вариант движения клеток, который связан с развитием формы самого органа. В этом случае причина перемещений носит экзогенный характер. Клетки, составляющие пласт, могут перемещаться относительно соседнего пласта или мозга в целом. По существу это морфогенетическое движение носит кумулятивный характер и контролируется синхронными реакциями больших групп клеток. Примером может служить формирование глазного пузыря или полости IV желудочка заднего мозга. В первом случае происходит перемещение групп клеток в прогибающемся участке глазного пузыря, а во втором — в дорсальной части нервной трубки. Кроме активной подвижности отдельных клеток и морфогенетических перемещений в пространстве целых пластов клеток необходимо отметить наличие пассивных движений клеток. Перемещения этого типа обусловлены тем, что одни клетки в процессе миграции могут механически влиять на другие, создавая иллюзию движения. Чаще всего это происходит вследствие проникновения мигрирующих клеток между статично расположенными пластами или региональным изменением формы клеток.

Таким образом, можно выделить несколько основных форм движения клеток в эмбриональном мозге: а) активная индивидуальная подвижность клеток; б) пассивное движение клеток; в) пассивное или активное перемещение нейроэпителиальных пластов. Однако необходимо отметить, что исторически возникло несколько названий миграций клеток, характеризующих конкретное направление движения. Среди них наиболее распространены радиальная миграция (имеется в виду миграция клеток при формировании коры головного мозга) и тангенциальная миграция (эмбриональное перемещение клеток вместе с пластом). Учитывая общепринятую терминологию, необходимо остановиться на каждом из типов перемещения клеток.

## 2.2. ТАНГЕНЦИАЛЬНАЯ И РАДИАЛЬНАЯ МИГРАЦИЯ КЛЕТОК

Под тангенциальной миграцией мы понимаем такое перемещение клеток, в результате которого клетки передвигаются вдоль

пласта. Клетки могут смещаться относительно друг друга индивидуально или вследствие пролиферации или под воздействием соседних мигрирующих клеток (рис. 15). Все три типа перемещений обнаружены в развитии эмбрионального головного мозга, хотя специальных исследований проводилось недостаточно.

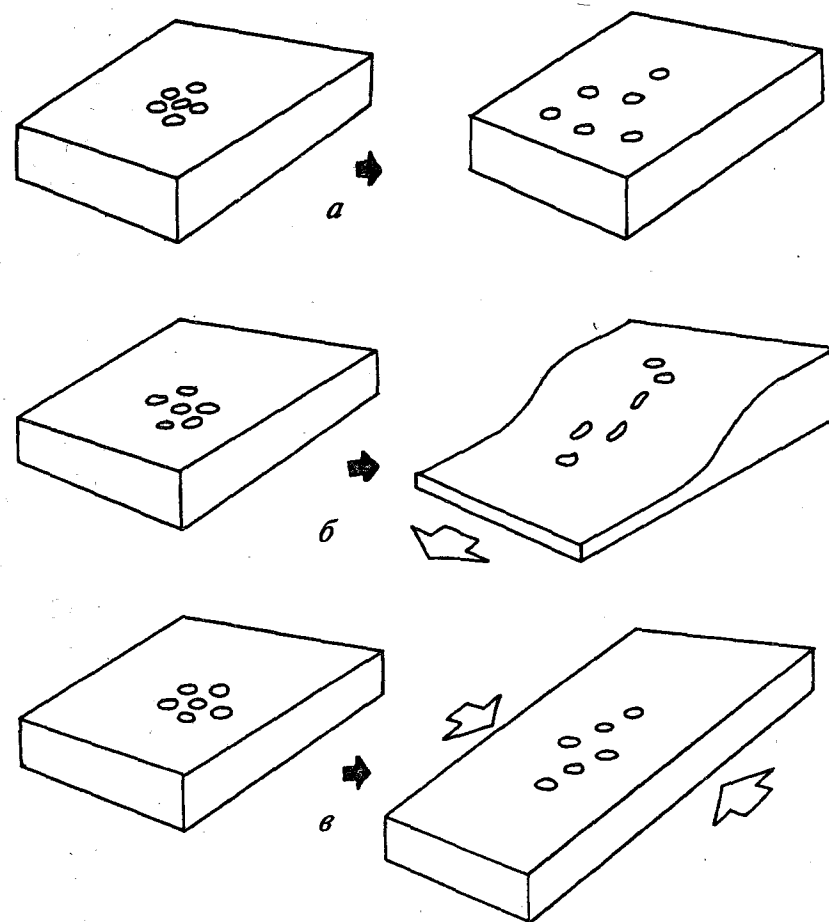


Рис. 15. Типы тангенциальной подвижности нейроэпителиальных клеток.

а — индивидуальное движение клеток, сопряженное с пролиферацией и перемешиванием потомков соседних клеток, б — разделение групп клеток при их деполаризации или растягивании пласта, в — разделение групп клеток в результате подвижности соседних клеток или деформации пласта — тангенциального сжатия. Светлыми стрелками обозначены направления растяжений или сжатий нейроэпителиальных пластов

Более семидесяти лет назад Гурвич впервые описал движение нейроэпителиальных клеток в головном мозге зародышей амфибий (Gurwitsch, 1910). Затем практически одновременно с работами Фохта (Vogt, 1929), установившими локализацию презумптивных областей нервной системы, было обнаружено движение клеток в нервной пластинке (Goerttler, 1925). Гартлер, интересуясь причиной изменения формы зародыша хвостатых амфибий от стадии поздней нейрулы до стадии хвостовой почки, метил кусочками агара, окрашенными нейтральным красным и нильским голубым, участки презумптивной нейроэктодермы. Исследуя локализацию меченых участков нервной системы на стадии хвостовой почки, он пришел к выводу, что на стадии нервной пластинки клетки головного конца зародыша смещаются в роstralном направлении, а клетки, расположенные на уровне продолговатого и спинного мозга, двигаются в каудальном направлении. Другой важный факт — постоянство локализации клеток средней части нервной трубки на уровне будущего заднего мозга. Однако в тот период главной проблемой таких исследований (Vogt, 1925, 1929) было картирование презумптивных областей нервной пластинки, а вопросы перемещения нейроэпителиальных клеток детально не изучались. До начала 50-х годов исследованием перемещений пластов мозга занимался Карпентер (Carpenter, 1932; 1937). Используя методы, разработанные Фохтом, он обнаружил роstrальные и каудальные перемещения нейроэпителиальных пластов. Перемещения клеток в самом общем виде удалось выявить почти на всех стадиях раннего эмбрионального развития.

Следующим этапом исследований было уточнение направлений перемещений клеточных пластов нейроэктодермы (Nieuwkoop, 1952). Ньюкооп показал, что каудальное смещение клеток от середины нервной пластинки связано с инвагинацией мезодермы на стадии гаструлы, однако реального объяснения роstrальных смещений клеток презумптивной нервной пластинки он не нашел.

Важным для изучения перемещений клеток были работы Якобсона (С.-О. Jacobson, 1959, 1962), который, используя подход Фохта (Vogt, 1929), довел методику витального мечения до совершенства. В работе 1959 г. ему удалось составить карту локализации презумптивных полей на стадии нервной пластинки у аксолотля. Достоинством и принципиальным отличием от предыдущих карт нервной пластинки является то, что Якобсон смог проследить локализацию клеток до 36–42-й стадии развития, т.е. метка сохранялась в течение 10–11 суток. Эти наблюдения были вдвое продолжительней тех, которые проводили Фохт и Карпентер (Vogt, 1929; Carpenter, 1937). Вместе с тем желание автора определить локализацию окрашенных участков мозга на максимально поздних стадиях не позволило выявить ранние эмбриональные перемещения. Исследуя локализацию окрашенных участков мозга на ранних стадиях (36–42), он отмечал, что меченые поля меняют

свою форму, но не связывал эти изменения с посленейруляционными миграциями. На основании этого исследования Якобсон пришел к выводу, что пространственное распределение клеток в нервной пластинке топологически сохраняется в нервной системе взрослых животных (С.-О. Jacobson, 1959). Однако спустя три года в работе, посвященной нейруляции, он показал, что клетки нервной пластинки активно и неравномерно перемещаются в каудальном и роstrальном направлениях (С.-О. Jacobson, 1962).

В отличие от работ Фохта и Гартлера, Якобсон обнаружил, что в области первичного кия клетки двигались значительно быстрее, чем на краях нервной пластинки. Так, начиная с 13-й стадии в области кия они смещаются за 4 ч. 35 мин. на расстояние в 2,5 раза большее, чем на краях нервной пластинки. Одновременно с экспериментальной работой он использовал данные фотограмм, полученные в 30-секундном материале. Это позволило составить диаграмму перемещений нервных клеток в период нейруляции. На основании анализа фотограмм была выявлена причина отсутствия роstroкаудального смещения клеток латеральных зон нервной пластинки. Якобсон обнаружил перпендикулярное по отношению к роstroкаудальной оси тела смещение латеральных групп клеток нейроэктодермы (рис. 16). Таким образом, им впервые было показано одновременное существование противоположно направленных миграций клеток нейроэктодермы.

Данные Якобсона были значительно расширены и детализированы после работы Бурнсайда и Джекобсона на нервной пластинке (Burnside, Jacobson, 1968). Используя эмбрионов саламандры *Taricha torosa*, которые имеют пигментированные клетки с четкими границами, авторы проводили 5–19-часовую кино- и фотосъемку с интервалами в 1 мин. Особенность этой работы заключается в том, что цейтраферная киносъемка проводилась при большом увеличении микроскопа. Это позволило подробно проследить миграции отдельных пигментированных клеток во всех областях презумптивной нервной системы. Важным результатом этой работы является обнаруженный факт изменения направления движения одной клетки. За время нейруляции клетка может менять направление своего движения под прямым углом. Движение групп клеток происходит с неодинаковой скоростью и по различным траекториям. Другим важным результатом работы этих авторов является попытка сопоставить движения клеток с трансформацией координат исходных границ клеточных популяций и изменением формы зародыша.

Вопросу взаимодействия клеточных перемещений эктодермы, мезодермы и нервной пластинки посвящены работы Келлера на щипорцевой лягушке (Keller, 1975, 1976). Используя витальные метки, полученные с помощью агаровой аппликации по модифицированному методу Фохта (Vogt, 1960), он показал, что клетки

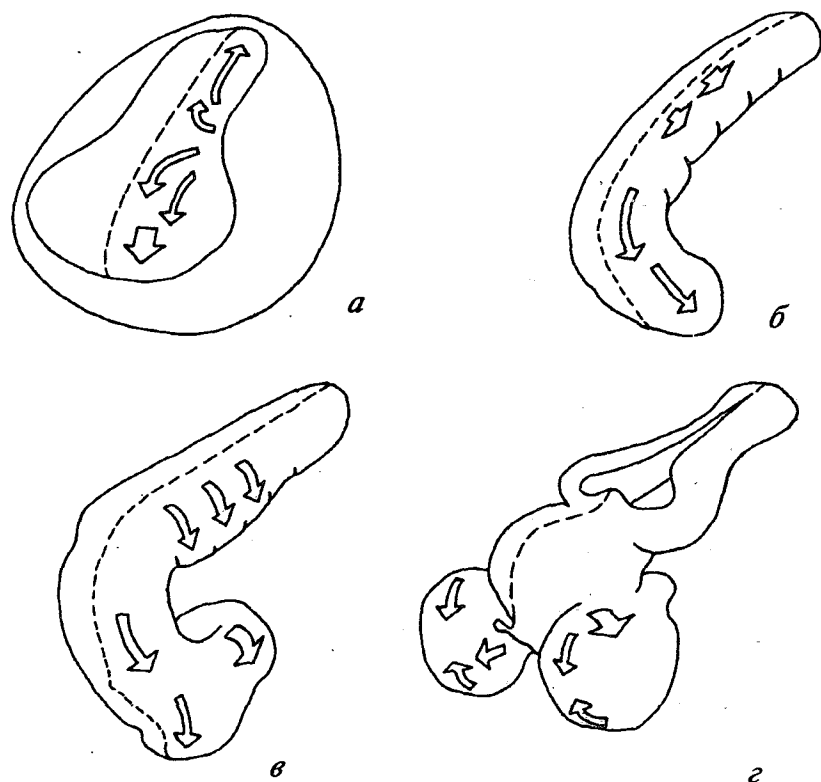


Рис. 16. Схематическое изображение основных перемещений клеток во время и после нейруляции.  
а — нейруляция, б — стадия нервной трубки, в — стадия сегментации мозга, г — стадия ранней дифференцировки. Стрелками обозначены направления смещения меченых клеток

нервной пластинки у эмбрионов шпорцевой лягушки передвигаются по направлениям, аналогичным движению нейроэктодермы у хвостатых амфибий. Этим Келлер выявил корреляцию направлений смещения клеток нейроэктодермы с движением эктодермы и мезодермы. Так, на 22-й стадии развития ему удалось синхронно маркировать дорсокаудальные смещения клеток нервной пластинки и окружающей эктодермы (Keller, 1975, 1987). Таким образом, автор показал исходную координацию направлений миграции клеток со стадии бластулы до конца нейруляции, что свидетельствует о постепенной замене общих морфогенетических перемещений частными внутрискелетными движениями клеток.

Интересной работой, анализирующей перемещение клеток нервной пластинки, было исследование А. Джекобсона и Гордона (Jacobson, Gordon, 1976). Продолжая ранее выполненные работы (Burnside, Jacobson, 1968), эти авторы смоделировали перемещение

клеток и изменение формы нервной пластинки на вычислительной машине. Компьютерный анализ показал, что площадь нервной пластинки в процессе морфогенеза уменьшается, а объем остается примерно одинаковым, поскольку сокращение апикальных поверхностей нейроэктодермы компенсируется пропорциональным увеличением высоты клеток. Одновременно была показана корреляция клеточных перемещений со степенью изменения формы отдельных клеток. К аналогичным выводам пришла группа исследователей, картировавших основные направления миграции нейроэпителиальных клеток (Katz, Lasek, Nauta, 1980).

Принципиально новые данные были получены Хироэ с соавт. (Hirose, Jacobson, 1979; Jacobson, Hirose, 1981). Они использовали внутриклеточные инъекции пероксидазы хрена для картирования бластул шпорцевой лягушки. Инъецируя отдельные бластомеры, авторы проследили судьбу клеток-потомков бластомеров. Потомство меченых бластомеров авторы рассматривали как клоны, имеющие строго определенные территории и на бластуле, и в эмбриональном мозге после замыкания нервных валиков. Вводя пероксидазу в индивидуальный бластомер на стадиях 256, 512, 1024 бластомеров, Джекобсон и Хироэ выявили четкие границы между клонами меченых клеток-потомков различных бластомеров. Эти границы разделяют нервную пластинку на 7 зон-компарментов с детерминированной судьбой. Билатеральный передний компармент формирует сетчатку правого и левого глаза, вентральные отделы переднего и среднего мозга; два передних компармента формируют дорсальные отделы переднего и среднего мозга; два заднемедиальных — дают вентральные отделы заднего и продолговатого мозга; два задних латеральных формируют дорсальные структуры двигательных отделов мозга (Jacobson, Hirose, 1981). Авторы показали, что при дальнейшем развитии мозга существуют миграции клеток, но перемещения нейробластов из компартамента в компартамент не происходит. Однако выводы авторов как об отсутствии организующей роли нейтральной индукции хордомезодермой (М. Jacobson, 1982), так и о продолжительном существовании после нейруляции жестких границ между компартаментами не подтвердились (М. Jacobson, 1983; Smith, Slack, 1984; Brun, 1985). Исследования последнего времени (Brun, 1985), проведенные с помощью цейтраферной съемки, показали существование сходных (С.-О. Jacobson, 1962; Burnside, Jacobson, 1968; Keller, 1975) путей перемещений клеток и наличие миграций между клетками нервного гребня и нейроэктодермой (Brun, 1985).

#### Перемещения клеток нервной трубки в период формирования основных отделов мозга

Проблеме перемещения клеток нервной системы в период от стадии нейруляции до образования нервных отростков дифференцированных клеток посвящено незначительное число работ.

Впервые возможность посленейруляционных перемещений клеток нервной системы учитывалась Якобсоном (С.-О. Jacobson, 1959). Составляя карту презумптивных зачатков мозга *Urodela*, он указывал на изменение формы агаровой метки как на результат перемещения пластов клеток и пролиферации нейробластов. В сущности к аналогичным выводам пришел и М. Джекобсон на шпорцевой лягушке (М. Jacobson, 1982, 1983), фактический материал которого указывает на существование значительных перемещений клеток внутри компартментов. Так, клетки вентральной зоны сетчатки и переднего мозга, перемешанные в ростральном компартменте, формируют далеко стоящие друг от друга области, что невозможно без независимых перемещений пластов клеток. Примерно такие же картины поздних перемещений клеток выявляются при анализе всех шести компартментов (М. Jacobson, 1983). Однако спустя некоторое время самим этим автором было оценено значение перемещений клеток нервной системы, принадлежавших к различным клонам. Используя двойное маркирование флуоресцентно-контрастными веществами, он показал, что в процессе развития клетки из соседних клонов перемешиваются между собой более чем на 60% (Sheard, Jacobson, 1987).

Особняком стоят работы Таккетт и Моррис-Кей (Tuckett, Morris-Kay, 1985 a, 1985 b), которые исследовали динамику перемещений клеток у крыс на стадиях 4, 8, 12, 16 сомитов. Методами радиоавтографии и сканирующей электронной микроскопии они показали, что на ранних эмбриональных стадиях существует перетекание пластов клеток из заднего мозга в средний и из среднего мозга в передний. Авторы обнаружили, что на стадии 4 сомитов область будущего переднего и промежуточного мозга выглядит как небольшое ростральное выпячивание нервной трубки, к которому двигаются пласты клеток. Фактически передний и промежуточный мозг вместе с парными зачатками глазных пузырей формируются из клеток нервной трубки, перетекающих из среднего мозга (Tuckett, Morris-Kay, 1985 a). В свою очередь, в среднем мозге существуют каудоростральные движения пластов мозга. За счет этих смещений формируются средний и задний мозг, которые по эстафете включаются в формообразовательные перемещения пластов мозга. Эти данные можно было бы принять за результаты митотической активности нервной трубки, однако авторы радиоавтографическими методами показали, что клеточные циклы на изученных стадиях замедлены, а число клеток остается постоянным (Tuckett, Morris-Kay, 1985 a). Кроме этого была показана неравномерная ориентация осей митозов в базальных, латеральных и интроемедиальных зонах; это, по мнению авторов, может вызывать перетекание клеточных масс (Tuckett, Morris-Kay, 1985 b).

Продолжая свои исследования, они выявили еще два направления перетекания клеток в эмбриональном заднем мозге крысы

(Tuckett, Lim, Morris-Kay, 1985). Одно направление совпадает с общим смещением клеток и ориентировано в каудоростральном направлении. Второе перемещение клеток ориентировано в дорсовентральном направлении, вдоль границ будущих нейромеров заднего мозга. Авторы выявили взаимозависимое скоординированное развитие мезомеров, которые объединены рострально сжимающимися пластами среднего мозга. С другой стороны, в областях нейромеров заднего мозга, где найдено дорсовентральное перемещение пластов клеток, выпячивания нервной трубки развиваются независимо. Авторы приходят к выводу, что, хотя в мозге и существуют паттерны пространственной организации — нейромеры, но жесткой упорядоченности в ростокаудальных и каудоростральных направлениях нет. Эти данные позволяют заключить, что тангенциальные перемещения клеток являются важным компонентом в раннем эмбриональном формообразовании головного мозга. Единственной работой, охватывающей относительно продолжительный период развития, были исследования Таккетт с соавт. (Tuckett, Morris-Kay, 1985 a, b). Однако исследований, оценивающих тангенциальные перемещения нейроэпителиальных клеток от окончания нейруляции до дифференцировки нейробластов, практически не проводилось (Савельев, 1987 a, б). Еще менее известно о видовой специфичности миграции клеток в эмбриональном мозге. Поэтому было бы интересно сопоставить тангенциальную подвижность нейроэпителиальных пластов у нескольких видов.

Рассмотрим наиболее общие выводы такого исследования (Савельев, 1987). В приведенной работе было исследовано три вида хвостатых амфибий: сибирский углозуб, иглистый и обыкновенный тритоны. Тангенциальную подвижность нейроэпителиальных пластов анализировали от стадии замыкания нервной трубки до начала активного питания личиной после вылупления. Топография перемещений дана на рис. 16. Информация о направлении миграций была получена при помощи витального маркирования клеток внутриклеточными флуоресцентными красителями, аннотропными зондами и механическими метками. При переводе полученной информации в трехмерную систему координат применяли метод пластических реконструкций. Сразу после нейруляции меченые пласты и отдельные группы клеток смещались в двух направлениях: от области слияния нервных валиков в вентролатеральном направлении и от зоны средней линии-киля в дорсолатеральном направлении, как показано на рис. 16. Надо отметить, что события, изображенные на рис. 16, б, в, являются прямым продолжением перемещений на стадии нейруляции (см. рис. 16 а). Какого-либо разрыва между этими событиями нет. Если рассмотреть внутренние поверхности сечений пластических реконструкций, то перемещение пластов клеток можно заметить и морфологически. После нейруляции мозг выглядит как трубка

с одинаковой толщиной стенок, а после латеральных перемещений пластов мозг разделяется на четыре зоны: две латеральные, или акцепторные, с мигрировавшими клетками и две дорсовентральные — донорные области, представленные на этой стадии в виде тонких пластов с уплощенными клетками (см. рис. 12, а). После расчленения нервной трубки на четыре области за счет первых перемещений клеток начинается движение пластов мозга в каудоростральном направлении. Данные о наличии ранних ростокаудальных перемещений после формирования нервной трубки хвостатых амфибий согласуются с результатами работ ряда авторов (С.-О. Jacobson, 1959; М. Jacobson, 1982; Hirose, Jacobson, 1979; Moody, 1987). Однако тангенциальные перемещения клеток после формирования нервной трубки менее обширны, чем при нейруляции. По данным А. Джекобсона (Jacobson, 1966), при нейруляции у тритона клетки мигрируют на расстояние до 896 мкм со скоростью 4–95 мкм/ч. Размер зародыша на этой стадии не превышает 2,5 мм. К аналогичным результатам пришли и другие исследователи (Baker, Schroeder, 1967; Jacobson, Gordon, 1976), работавшие также на нейруле.

Безусловно, перемещения клеток в нервной пластинке синхронизированы больше, чем в нервной трубке, так как нейроэпителиальные клетки в апикальных зонах связаны между собой более прочными контактами, а сам нейральный зачаток представляет собой пластинку или полусферу. Анализ движения клеточного материала у хвостатых амфибий на стадии нервной трубки показал, что расстояние максимальной миграции составляет 250–400 мкм. Это примерно в два раза меньше, чем миграционный путь нейроэпителиальных клеток на стадии нейруляции (А. Jacobson, 1966).

Надо отметить, что наибольшей подвижностью обладают клетки сразу после нейруляции. Чем больше времени проходит от замыкания нервных валиков, тем меньше масштабы миграции. Максимальные миграции в нервной трубке отмечаются только непосредственно после нейруляции. Спустя 28–48 ч клеточный материал перемещается на 200–300 мкм, а еще через 24–48 ч это расстояние снижается до 100–150 мкм; к началу дифференцировки уменьшается до 75–120 мкм. Таким образом, если рассмотреть динамику изменений перемещений, то станет ясно, что с развитием мозга дальность миграций нейробластов уменьшается. Снижение дальности миграций клеток в развитии мозга не зависит ни от видовой специфики, ни от различий в процессах формообразования.

Общая тенденция снижения дальности перемещений нейроэпителиальных клеток не зависит и от количественных различий. Мозг изученных видов амфибий после нейруляции отличается по объему в 2 раза (от 0,0075 до 0,15 мм<sup>3</sup>), а по числу клеток — в 5 раз (от 5 до 25 тыс.). Несмотря на столь значительные различия, общая тенденция уменьшения дальности перемещений наблюдается у всех изученных видов. Необходимо отметить, что при

25%-й естественной гибели клеток у тритонов на стадии бластулы и нейрулы дальнейший морфогенез проходил нормально (Imoh, 1986). Даже в тех случаях, когда гибель клеток достигала 25% и возникала более тонкая нейроэктодерма, морфогенез завершался формированием нормальной нервной системы.

Эти данные позволяют сделать вывод о независимости направлений и масштабов перемещений от количественных характеристик и размеров эмбрионального мозга. С этим выводом согласуются представления о независимости структурообразования от исходных размеров эмбриона и количества участвующих в морфогенезе клеток (Спиров, 1982). Фактически независимо от числа, размеров и объема эмбрионального мозга перемещения клеток затухают к началу первичной дифференцировки нейробластов.

Второй характеристикой тангенциальных перемещений клеток является направление движения. Основные направления миграций клеток оказались общими как для млекопитающих, так и для амфибий. По-видимому, для большинства позвоночных характерны три основных направления перемещений клеток после нейруляции. Если расположить их в порядке значимости, то наиболее общей будет каудальноростральная миграция от области будущего заднего мозга к переднему краю нервной трубки. Эти данные согласуются с наиболее общим направлением миграций клеток на стадии нейрулы (Burside, Jacobson, 1968; Keller, 1975; Jacobson, Gordon, 1976; Le Douarin, 1984). Направление миграций на обеих стадиях совпадает, но на стадиях нервной трубки клетки передвигаются на меньшее расстояние.

Ростокаудальное перемещение клеток на стадии нервной трубки наблюдали и у млекопитающих (Tuckett, Morris-Kay, 1985 а). По мнению авторов, перетекание пластов клеток в ростральные отделы мозга крысы носит более обширный характер, чем это обнаружено у амфибий (Савельев, 1987 а). Возможно, что эти различия связаны с тем, что в первой работе (Tuckett, Morris-Kay, 1985 а, б) не проводилось витальной внутриклеточной маркировки, и авторы ориентировались на хорду и теменной перегиб мозга. Однако несомненно, что движение клеток в ростральные отделы мозга встречается у большинства позвоночных на ранних стадиях формообразования. По крайней мере, вполне допустима возможность каудальной миграции до границы пронеиромера в ростральной части заднего мозга.

Второе по значимости перемещение, обнаруженное у всех исследованных видов, ориентировано в вентральном направлении и локализовано в области воронки и примордиального заднего мозга. В обоих случаях перетекание клеток из дорсальных пластов в вентральные приводит к редукции дорсальных участков пласта. В случае воронки истончается дорсальная стенка, которая к окончанию миграции состоит из монослоя распластанных и растянутых клеток.

Сходным образом осуществляется вентральная миграция в районе заднего мозга. Клетки дорсолатеральных областей нервной трубки сползают в вентральном направлении (см. рис. 16). Сползание выпшедших из пролиферации клеток сопровождается ретракцией дорсальной стенки нервной трубки. Результатом такого движения клеток в сочетании с другими процессами становится открытие нервной трубки и формирование IV желудочка головного мозга. Аналогичное движение клеток отмечалось на рыбах, бесхвостых амфибиях и млекопитающих (Picouet, 1975; Tuckett, Lim, Morris-Kay, 1985; Kimmel, Warga, 1986).

Третий тип перемещений клеток определяет формирование переднего мозга. В эмбриогенезе мозга амфибий и большинства позвоночных животных передний мозг закладывается позднее, чем другие крупные отделы. По мнению ряда авторов (Tuckett, Lim, Morris-Kay, 1985), передний мозг формируется полностью из клеток, перетекающих из каудальных структур мозга. Существует и другая крайняя точка зрения (Griggs, 1910; Bergqwist, 1956; Katz, Lasek, Nauta, 1980), согласно которой мозговые отделы детерминированы еще на стадии нейрулы и увеличиваются в размерах только за счет пролиферации. Однако при одновременном исследовании миграций нейроэпителиальных клеток и оценке изменений их количества эти представления не получили подтверждений (Савельев, 1987 а, б). В этих работах показано, что изменение числа клеток в эмбриональном переднем мозге происходит за счет миграций. Этот вывод сделан на основании того, что в период миграции количество клеток во всем мозге остается постоянным.

Надо отметить, что существует и значительная видовая изменчивость миграции нейробластов в передний мозг. Количество переместившихся клеток в эмбриональный зачаток переднего мозга может составлять у различных видов от 20 до 70%. Это различие в масштабах миграций могло стать причиной возникновения противоположных мнений, так как большинство авторов работало на различных видах животных. Возможность объединения в переднем мозге клеток из различных регионов мозга подтверждается в ряде работ (M. Jacobson, 1982, 1983; Sheard, M. Jacobson, 1987; Moody, 1987 а, б). В них показано, что клетки, принадлежащие к различным клонам и компартментам, на поздних этапах развития перемещаются в передний мозг.

Безусловно, существуют специфические перемещения клеток, которые и составляют особенности развития формы мозга каждого вида. Так например, перемещение клеток в передний мозг происходит у сибирского углозуба преимущественно из примордиального среднего и промежуточного мозга, тогда как у испанского тритона — из глазного пузыря. Однако несмотря на различия, индивидуальные особенности укладываются в описанные три тенденции. Кроме описанных миграций обнаружена общая

закономерность перемещений клеток после начала дифференцировки нейробластов. Дифференцировка нейробластов происходит неравномерно, что приводит к возникновению гетерогенных участков мозга. В областях дифференцировки миграций нет, они сосредоточены в зонах, свободных от отростков. Чем шире поле дифференцированных клеток, тем локальнее и короче перемещения нейробластов. Явление локализации перемещений отмечено у всех изученных видов.

Таким образом, тангенциальная миграция клеток непосредственно связана с формированием и перераспределением материала между отделами эмбрионального мозга. Механизмы, вызывающие тангенциальную подвижность клеток, известны плохо. Неясен даже механизм отщипывания клеток, принадлежащих к различным клонам нервной системы (Turner et al., 1988). Доказан тот факт, что движение клеток не является результатом неравномерной пролиферации клеток (Gillette, 1944; M. Jacobson, 1970). В качестве вероятных причин, вызывающих тангенциальное перемещение нейроэпителиальных клеток (Edelman, Chuong, 1982; Березин, 1986), поверхностные натяжения тканей (Grayson, 1984), межклеточные контакты (Tseng, Wang, 1984), компартментализация, клональная детерминация клеток (Satch, 1985; Jacobson, Klein, 1985) и наличие собственного отсчета времени в различных группах клеток (Satch, 1985). Кроме того, существуют представления об определяющей миграции клеток сети внеклеточных фибрилл (Nakatscji, Johnson, 1983) и о совокупности нескольких процессов, контролирующих тангенциальную подвижность пластов (Keller, 1987). Тем не менее, причины тангенциальной подвижности нейроэпителиальных клеток до настоящего времени не известны, как и не понятен эволюционный механизм возникновения такого явления.

### Радиальная миграция клеток

Под радиальной миграцией принято понимать перемещение нейробластов из зоны пролиферации в формирующуюся кору головного мозга (Rakic, 1971, 1982). Радиальная миграция хорошо исследована в этих работах, что дает возможность только кратко изложить сущность явления. В основе радиальной миграции лежит движение нейробластов по отросткам глиальных клеток, которые связывают вентрикулярную зону пролиферации и корковую зону дифференцировки. Клетки радиальной глии в этот период времени достигают длины в 1-2 мм, чем гарантируется точное попадание мигрирующих нейробластов в корковую пластинку. Интересно отметить, что в этом случае мы имеем дело с механической природой детерминации направления движений и целей миграции нейробластов. Тем не менее, известны нейральные мутанты, у которых нарушаются миграция нейробластов и

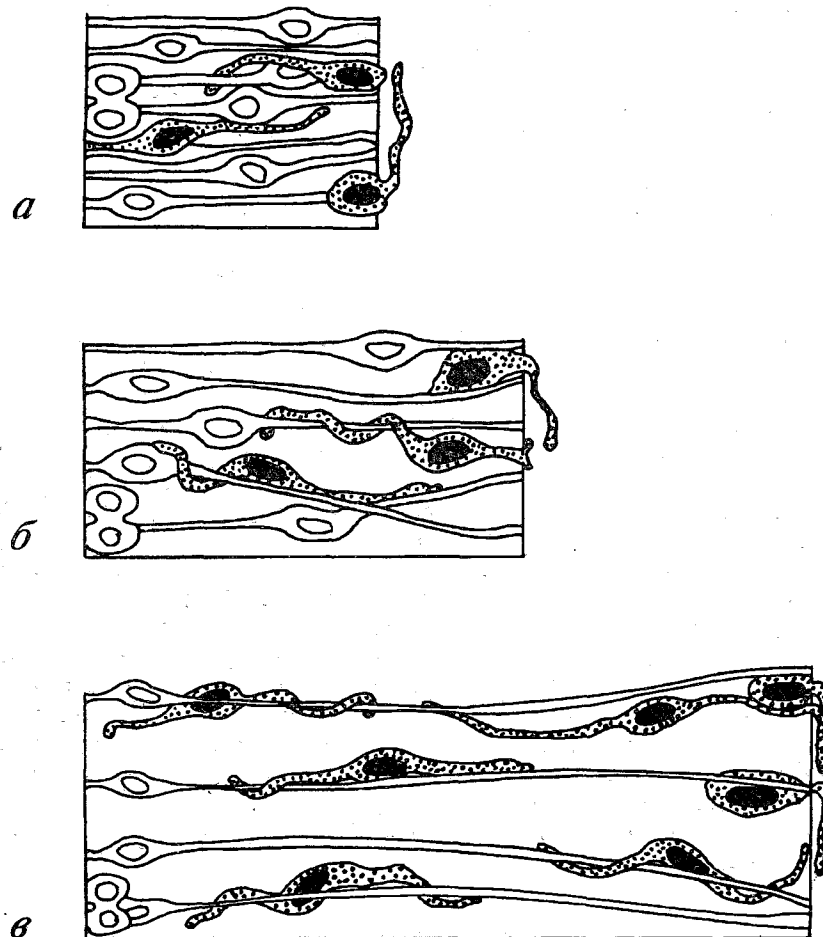


Рис. 17. Схема радиальной миграции в различных группах позвоночных.

У амфибий в качестве субстрата для радиальной миграции используются поляризованные нейроэпителиальные клетки. По ним двигаются нейробласты при выходе в дифференцировку — а, у рептилий для этих целей используются как нейроэпителиальные клетки, так и специализированная радиальная глия — б, для млекопитающих характерна миграция по клеткам радиальной глии — в

послойная организация коры (Caviness, 1980, 1982; Sten, 1981). Существование радиальной глии как морфогенетического субстрата для миграций говорит о механическом контроле за процессом перемещения клеток в кору головного мозга. Однако для раннего эмбрионального формообразования радиальные миграции клеток

не играют решающей роли, хотя их значение для дифференцировки борозд и извилин до сих пор не исследовано.

В раннем эмбриональном формообразовании головного мозга встречаются радиальные миграции, которые связаны с выходом клеток в дифференцировку или образованием вторичных зон пролиферации у млекопитающих (Резников, 1981). Клетки при завершении митотических циклов выходят в дифференцировку. При этом после последнего деления в монослойном нейроэпителии клетки мигрируют по стоящим рядом недифференцированным клеткам. Соседние недифференцированные клетки используются как субстрат для миграции (рис. 17, а). По существу воспроизводится модель миграции по радиальной глии дифференцирующихся нейробластов у млекопитающих. Можно предположить, что в процессе эволюции радиальная миграция нейробластов при формировании коры возникла из радиальной миграции выходящих в дифференцировку клеток монослойного нейроэпителия. Схема, предложенная на рис. 17, а, б, в, иллюстрирует предполагаемую эволюцию этого процесса.

### 2.3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФОРМООБРАЗОВАНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

При анализе формообразования головного мозга количественные процессы обычно не учитываются. Действительно, на первый взгляд довольно трудно представить, что колебания в количестве клеток, участвующих в формообразовании, могут играть какую-либо роль. Понятно, что масштабы вовлеченных в формообразование клеток у кашалота и лягушки различны, как различаются и размеры тела сравниваемых животных. При рассмотрении таких крайних вариантов организации становятся очевидными и видовые особенности развития. Мозг кашалота в несколько тысяч раз больше, чем вся нервная система лягушки. Однако ситуация значительно изменится, если мы сравним между собой животных, близких по размерам тела, например гребенчатого тритона и мышь. Безусловно, относительный вес и размер мозга у мыши больше, чем у тритона, но размер зародышей сразу после нейруляции сопоставим. Можно подобрать такую пару животных, у которых размеры нервной пластинки и трубки окажутся одинаковыми. В этом случае количественные различия сводятся к числу клеток, вовлеченных в формирование нервной трубки. Следовательно, один и тот же результат может быть достигнут при участии разного числа клеток. Однако это сравнение не совсем корректно, поскольку уровни организации млекопитающих и амфибий мало сопоставимы. Удобнее сравнивать животных, принадлежащих к одной систематической группе, близких по размерам и организации мозга. Единственным условием должно быть различие в числе клеток, участвующих в морфогенезе головного

мозга. Оптимальнее всего использовать амфибий, поскольку они относительно просто организованы, сопоставимы в большинстве случаев по размерам и обладают огромным разнообразием форм. Так, у гигантской японской саламандры диаметр яиц около 1,6–1,7 см, а у некоторых мелких древесных лягушек менее 1 мм. Тем не менее, среди хвостатых амфибий легко можно подобрать ряд из нескольких видов, которые будут соответствовать требуемому условию. Среди амфибий это легче сделать еще и потому, что колебания размеров мозга у них несравненно меньше, чем среди млекопитающих. У амфибий из рецентных видов самый крупный мозг только в 30–40 раз больше, чем самый маленький, у млекопитающих эта разница на два порядка выше. Обладая набором животных с близкой организацией, но различающихся по количеству нейроэпителиальных клеток, участвующих в формировании мозга, можно попытаться ответить на ряд вопросов, касающихся роли количественных процессов в морфогенезе мозга.

Во-первых, не совсем понятно, имеет ли какое-либо значение количество клеток, принимающих участие в раннем эмбриональном формировании головного мозга. Если один и тот же результат достигается при различном количестве клеток, то где тот пороговый уровень, ниже которого формирование становится невозможным?

Во-вторых, не известно, как влияет на формирование размер нейроэпителиальных клеток, поскольку у одного вида они могут быть после нейруляции длиной более 300 мкм, а у другого менее 50 мкм.

В-третьих, до сих пор нет достоверных данных о том, как формообразовательные процессы сочетаются с пролиферацией, которая ведет к увеличению количества клеток.

В-четвертых, не понятно, может ли головной мозг или ростральный отдел нервной трубки расти в период активного изменения формы. Имеется в виду не пролиферация, а параллельное с ней увеличение объема мозга.

Понятно, что однозначный ответ на большинство вопросов дать очень трудно, но попытаться ответить хотя бы на часть из них можно уже сегодня.

У хвостатых амфибий наиболее активное формирование головного мозга начинается сразу после замыкания нервной трубки, а заканчивается с вылуплением личинок и их переходом к активному питанию. Поэтому основное внимание следует сосредоточить на анализе этого отрезка развития. Исследованию количественных преобразований головного мозга сибирского углозуба, иглистого и обыкновенного тритонов был посвящен ряд работ (Савельев, 1987 а, б). В этой работе оценивалось количество клеток во всем головном мозге и в каждом из его отделов. Параллельно вычислялся объем нейроэпителиальных клеток и дифференцирующихся волокон. Одним из основных результатов

этих исследований является обнаруженная дискретность между активным формообразованием и пролиферацией клеток. Непосредственно после нейруляции происходит активное изменение формы нервной трубки в районе головного мозга. За небольшой промежуток времени мозг разделяется на отделы и пространственно обособляются зачатки основных структур (см. рис. 10). У большинства видов в этот период времени увеличения количества клеток обнаружить не удалось. По-видимому, активная перестройка мозга, сопряженная с перемещением клеток, плохо сочетается с пролиферацией. Данные по кинетике клеточной пролиферации подтверждают это наблюдение (М. Jacobson, 1978; Yamazaki-Yamamoto, 1985). Детальный анализ клеточных циклов показал, что к началу гастрюляции становились различимыми фазы  $G_1$  и  $G_2$  клеточного цикла, а продолжительность фазы  $S(T_s)$  увеличивалась более чем в 20 раз (Yamazaki-Yamamoto, 1985). По мнению этого автора, в ходе нейруляции эти стадии становились все более продолжительными.

Отсутствие клеточной пролиферации наблюдалось при активном изменении формы в любой из структур мозга. Так, например, формирование парных полушарий происходит в постоянном объеме и при неизменном числе клеток. Фактически за счет перетеканий ограниченного числа клеток внутри структуры формируется дифференцированный зачаток. На последующих стадиях эмбриональная форма изменяется за счет дифференциальных митозов, но закладка осуществляется при постоянном числе клеток. Необходимо отметить, что чем активнее изменение формы зачатка, тем меньше пролиферация нейроэпителиальных клеток. Имеет место и обратная зависимость. На поздних стадиях онтогенеза мозга форма структур меняется в значительно меньших масштабах, что делает возможным одновременную пролиферацию. Причины описанной несовместимости пролиферации и формообразования кроются в механизме деления нейроэпителиальных клеток (Sauer, 1935, 1937; Zwann et al., 1969, 1973). Нейробласты при пролиферации должны пройти цикл, при котором ядра мигрируют к наружной части пласта, затем возвращаются к внутренней мембране; апикальный отросток клетки отделяется от внешней мембраны, вытягивается в клетку, а затем наступает деление. Понятно, что столь сложный цикл в условиях миграции клеток и активного формообразования пройти клетке крайне трудно. По всей видимости, сложность митотического цикла нейробластов является причиной наблюдаемой несовместимости пролиферации и формообразования. На аналогичные явления указывал Вэк (Ueck, 1985). Рассматривая развитие пинеального органа, он обнаружил, что клетки нижнего слоя вентральной стенки супраэпифизарного кармана мигрируют в глияльную ткань, лежащую дорсально. При этом было найдено, что митотическая активность во время миграции прекращается.

Таким образом, пролиферация замедляется или прекращается совсем при активном изменении формы головного мозга. Следует отметить, что в основе изменения формы мозга лежат механические процессы. Поэтому вполне допустимо предположение о том, что механическая активность нейроэпителиальных пластов может сказываться на процессах пролиферации.

Количественная оценка объема нервной трубки в период активного изменения формы позволила установить, что у хвостатых амфибий объемного роста не происходит. Объем головной части нервной трубки остается постоянным во время выделения основных мозговых структур и сегментации мозга. Постоянство объема нейроэпителиальных пластов указывает на то, что форма нейральных зачатков изменяется не за счет локального увеличения объема одной из групп клеток, а по каким-то другим причинам. Объем мозга остается практически постоянным у сибирского углозуба, несмотря на внешнее увеличение размеров (рис. 10, 18). Таким образом, внешне хорошо заметное увеличение размеров головного мозга в эмбриональном развитии может быть не связано с ростом объема нейроэпителиальных клеток. По сути дела, объем нервной трубки сразу после нейруляции и объем эмбрионального головного мозга с хорошо дифференцированными отделами одинаковы (см. рис. 10, 18). Иллюзию роста создают дифференцированная форма головного мозга и его линейные размеры, однако вместе с ростом линейных размеров увеличиваются и мозговые желудочки. Для иллюстрации наблюдаемых количественных преобразований лучше всего подходит воздушный шарик. При наполнении воздухом его объем становится больше, а стенки тоньше. Но если измерить объем стенок, он будет постоянным. Аналогичные явления наблюдаются и при формообразовании мозга, но геометрия эмбрионального развития намного сложнее.

Надо отметить, что количественный анализ позволил обнаружить связь между пролиферацией и дифференцировкой. У исследованных видов имеется переломный период в темпах пролиферации, который приходится на 25–28-ю стадии развития и характеризуется началом дифференцировки нейробластов. Надо отметить, что повышение митотической активности совпадает по времени с началом дифференцировки. Это наблюдение показывает существование механизмов синхронизации обоих явлений. Одновременность активизации пролиферации и дифференцировки можно объяснить различными причинами. С одной стороны, возможен генетический контроль, или выделение пролиферирующими клетками некоторых факторов дифференцировки, а с другой, нельзя отрицать и более простые механизмы. Возможно, что увеличение количества пролиферирующих клеток в прижелудочковом слое создает локальную избыточность тангенциального давления, чем стимулируется выход нейробластов в дифференцировку. Одинаково приемлем и обратный вариант. Выход нейробластов

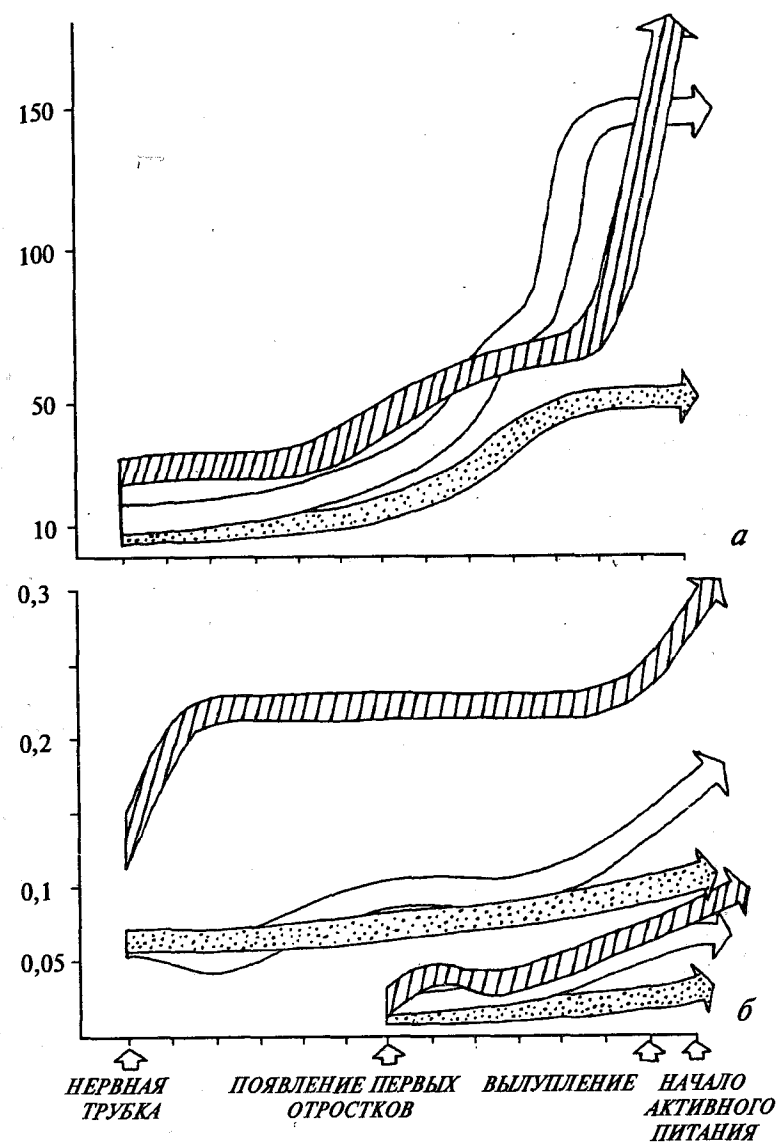


Рис. 18. Количественные изменения в головном мозге трех видов хвостатых амфибий от стадии нервной трубки до начала активного питания личинок.

Сибирский углозуб — штриховка, иглистый тритон — точки, обыкновенный тритон — светлая стрелка; а — по вертикали — количество клеток (в тысячах), б — (в  $\text{мм}^3$ ), короткими стрелками обозначена динамика изменений объема волокон дифференцирующихся клеток

в дифференцировку снижает механическую напряженность в прижелудочковом слое, чем стимулируется пролиферация. Пока не проведены целенаправленные исследования, любая из предложенных гипотез может рассматриваться в качестве рабочей модели.

Интересным результатом количественного анализа является обнаруженное сходство формы мозга эмбрионов разных видов перед вылуплением (см. рис. 10, 18). Несмотря на большие количественные различия, мозг как при нейруляции, так и в конце эмбриогенеза образовал сходные структуры. Двух- и трехкратное различие в объеме мозга и число клеток не сказывались на результатах формообразования. Эти данные перекликаются с результатами, полученными Имо (Imoh, 1986). Он показал, что у *Cynops pyrogaster*, несмотря на 25%-ю естественную гибель клеток, формируется полноценный мозг, хотя и меньшего размера.

На основании сопоставления числа клеток и объема мозга было обнаружено, что прямой зависимости между этими двумя процессами нет. В начале формообразования значительных изменений ни в объеме, ни в числе клеток не отмечалось. Затем пролиферация вызывает многократное увеличение числа клеток, а объем мозга остается практически неизменным. Это приводит нас к важному выводу о том, что в процессе раннего эмбрионального развития мозга размер клеток прогрессивно уменьшается. Возможно, что уменьшение размеров клеток может быть фактором, определяющим начало пролиферации, дифференцировки или миграции. Например, независимо от видовой специфичности дифференцировка начинается, когда число клеток в мозге достигает 20–25 тыс. Аналогичные результаты получены на нейруле (Gillette, 1944; Hutchinson, 1944), где авторы подсчитали объемы нервной пластинки и число клеток в начале и конце нейруляции. У аксолотля за время нейруляции число клеток в нервной пластинке увеличивается на 23%, а объем нервной пластинки остается прежним (Gillette, 1944). Это, по мнению автора, приводит к уменьшению размера клеток. По-видимому, нейроэпителиальные клетки уменьшаются на протяжении большей части онтогенеза мозга. По этой же причине размеры клеток, вышедших из пролиферации в начале дифференцировки, больше размеров дифференцирующихся нейробластов в конце развития.

Количественные характеристики показывают, что в развитии отделов мозга существует ряд общих и видоспецифичных процессов. Сопоставление результатов, полученных на видах с различным количеством клеток и объемом нервной трубки, показало, что темпы количественного роста нервной системы зависят от размеров исходного зачатка мозга. У сибирского углозуба в результате медленной пролиферации объем всего мозга до стадии вылупления не изменяется, а число клеток возрастает только в два раза. Сходные темпы роста наблюдаются и в других отделах мозга. Изменение объемов отдельных структур обычно связано

с перемещениями клеток из отдела в отдел. После вылупления рост носит логарифмический характер во всех областях мозга. Исключением из этого правила является rhombencephalon, темпы пролиферации у которого в 3 раза выше, чем в других отделах мозга. Сходные данные о постепенном развитии мозга получены и у испанского тритона, хотя у этого вида увеличение пролиферации перед вылуплением наблюдается раньше. Если у последнего количественные показатели объема и числа клеток резко изменяются на 1–2-й стадии до вылупления, то у испанского тритона этот период начинается на 2–3 стадии раньше (см. рис. 18).

Иная динамика количественных изменений обнаружена у обыкновенного тритона. После окончания нейруляции его нервная трубка по объему в два раза, по числу клеток в 6 раз меньше, чем у сибирского углозуба. По-видимому, эти различия изменяют темпы количественного роста. За каждые 2–3 стадии число клеток возрастает в 2 раза. Однако на стадиях, предшествующих вылуплению, пролиферация замедляется до минимума, тогда как у двух других видов наблюдается противоположное явление, причем замедление количественного роста затрагивает все отделы мозга. Сравнительные данные по количественному росту мозга показывают, что у сибирского углозуба число клеток увеличивалось до вылупления в 4 раза, у испанского тритона в 20 раз, у обыкновенного тритона в 10 раз. Различия в увеличении количества клеток за период онтогенеза связаны с размером клеток после нейруляции. Если использовать отношение объема нервной трубки к числу клеток, то окажется, что средний объем нейроэпителиальных клеток колеблется в широких пределах. У сибирского углозуба отношение объема нервной трубки к числу клеток равно  $\sim 0,00006$ , у обыкновенного тритона  $\sim 0,00002$ , у испанского тритона  $\sim 0,00001$ . При сопоставлении результатов отношений с увеличением числа клеток видно, что чем меньше исходный размер нейроэпителиальных клеток, тем больше число пролиферативных циклов она пройдет в эмбриональном развитии мозга. Данные по пролиферации мозга позвоночных, птиц и рептилий подтверждают эти выводы (Rakis, 1971, 1982; M. Jacobson, 1978; Резников, 1981; Grossland, Uchwat, 1983; Schoenwolf, 1985). Следовательно, можно предположить, что между размерами клеток и пролиферацией существует обратная зависимость.

Следует отметить, что размеры нейроэпителиальных клеток не могут не сказываться на механизмах формообразования. Действительно, свойства двух одинаковых по размерам нейроэпителиальных пластов будут различаться, если составляющие их клетки не одинаковы по размерам (рис. 19). Понятно, что пласт, состоящий из мелких клеток, отвечает на внешний сигнал быстрее, чем пласт, состоящий из крупных клеток. Это связано с тем, что по совокупности накопление генопродуктов и экспрессия генов в

мелноклеточном пласте произойдут быстрее и в больших масштабах. Более быстрая реакция мелкоклеточного пласта базируется не только на большом количестве копий генома, но и на объемах реализации продуктов биосинтеза. Осуществить перестройку цитоскелета или мембраны значительно проще в маленькой клетке, чем в большой. Наверное, поэтому у животных, обладающих нейроэпителиальными клетками крупных размеров, удлиняются процессы формообразования и дифференцировки.

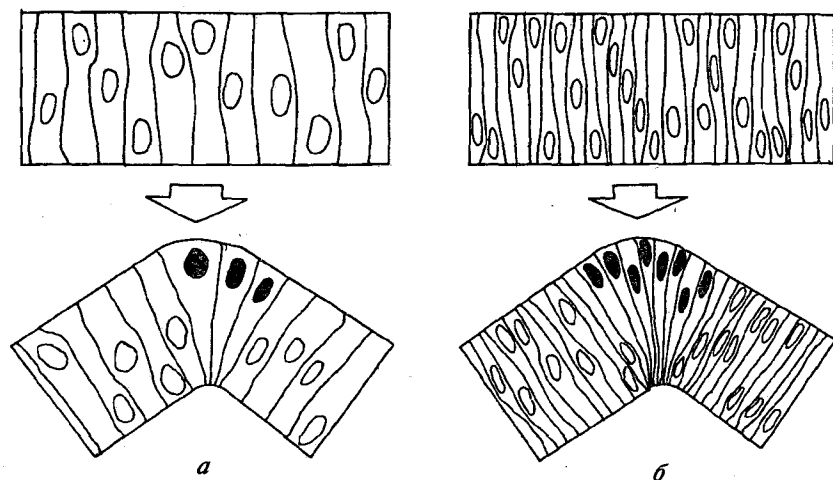


Рис. 19. Размеры клеток играют роль в формообразовании. В пласте, состоящем из крупных клеток, в морфогенетическое событие надо вовлечь несколько клеток, чтобы изменить форму зачатка — а. В пласте, состоящем из небольших клеток — б, изменение формы сопряжено с вовлечением в морфогенез большого числа клеток

Например, у шпорцевой лягушки личинки вылупляются через несколько десятков часов после оплодотворения, у сибирского углозуба — через 1,5–2 недели, а у гигантской саламандры — более чем через месяц. Интересно, что продолжительность развития очень хорошо коррелирует с размерами клеток. Если составить пропорции, то размер клеток, участвующих в формообразовании будет 1:3:16, а продолжительность развития шпорцевой лягушки, сибирского углозуба и гигантской саламандры будет соответственно 1:8:13. Однако замедленность реакции крупных клеток на внешние сигналы компенсируется ролью отдельной клетки в морфогенезе пласта у крупноклеточных видов. Изменение формы только одной клетки может повлечь трансформацию всего пласта (см. рис. 19, а). Видимо, поэтому в процессе эволюции оказалось более выгодным создавать морфогенетические системы из большого количества клеток. При такой организации меньше шансов

возникнуть аномалии развития, поскольку роль отдельной клетки уменьшается одновременно с увеличением количества клеток, вовлеченных в конкретный морфогенез.

Рассматривая количественные характеристики развития мозга, необходимо отметить динамику роста анализаторов: сетчатки, слуховой и обонятельной плакод. У сибирского углозуба сетчатка развивается импульсно, но при постоянном объеме. В ее эмбриогенезе можно выделить три периода роста числа клеток и два этапа, в течение которых число клеток остается постоянным. У испанского тритона наблюдается иная картина. Число клеток сетчатки в течение эмбриогенеза увеличивается всего в 2 раза, а за три стадии до вылупления — в 5–6 раз. На самых ранних стадиях, при формировании глазного бокала нейроэпителиальные клетки перемещаются через зачаток глаза. Третий вариант количественного развития сетчатки выявлен у обыкновенного тритона: он характеризуется увеличением объема и числа клеток в течение всего эмбриогенеза. У обыкновенного тритона также выявлен стабильный, непрерывный рост обонятельной и слуховой плакод. Обонятельные и слуховые плакodes испанского тритона и сибирского углозуба растут импульсами, которые совпадают по времени с началом дифференцировки нейробластов и со стадиями, предшествующими вылуплению.

Таким образом, для формообразования головного мозга имеет значение количество клеток. Чем клеток больше и меньше их размеры, тем тоньше можно изменять и контролировать форму развивающегося отдела или структуры и тем меньше вероятность того, что гибель нескольких клеток приведет к необратимым изменениям развития мозга. Однако большие клетки обладают заметной индивидуальной ролью в морфогенезе. В этом случае управление формообразованием упрощается, так как достаточно повлиять на небольшую группу клеток, для того чтобы изменилась форма всего зачатка. Активное формообразование почти всегда исключает увеличение объема мозга, но неизменно приводит к внешнему росту его размеров. По-видимому, при закладке основных отделов мозга пролиферация замедляется или останавливается, поскольку механические трансформации пластов затрудняют для нейробластов прохождение пролиферативного цикла.

#### 2.4. ПОДВИЖНОСТЬ СТЕНОК ЭМБРИОНАЛЬНОГО МОЗГА

Наряду с тангенциальной и радиальной миграциями изменением формы клеток и количественными изменениями развивающегося головного мозга имеет место подвижность эпителиальных пластов. Наиболее иллюстративным явлением такого порядка может быть формирование эмбриональных извилин неокортекса человека или полости IV желудочка заднего мозга. Действительно, не совсем понятно, зачем нервной трубке в районе заднего

мозга замыкаться в период нейруляции, если спустя несколько часов ей приходится раскрываться вновь. Аналогичен парадокс формирования эмбриональных извилин коры головного мозга человека. У человека первый этап развития борозд головного мозга начинается на 7–8-й неделе и заканчивается на 18–200-й неделе пренатального периода. В это время на поверхности неокортекса закладываются первичные борозды, которые исчезают к середине пятого месяца развития зародыша. Первой первичной бороздой является *fissura arcuata*. Она появляется в начале 8-й недели развития на медиальных стенках полушарий. Борозда идет от внутренней поверхности лобной области параллельно верхнему краю полушария до ростральной части клина. От *f. arcuata* в радиальном направлении по отношению к мозолистому телу отходит несколько менее протяженных борозд (рис. 20). На наружной поверхности полушария борозды выражены значительно хуже или отсутствуют совсем. Единственным ясно видимым прогибом корковой пластинки является сильвиева борозда. Она сохраняется в виде неясной волны во время всего периода эмбрионального развития и присутствует как борозда во взрослом мозге. Надо отметить, что сильвиева борозда формируется в районе полушария, связанном с подкорковыми структурами. Это вносит дополнительную гетерогенность в морфогенез переднего мозга. Поэтому первичную сильвиеву борозду правильнее считать результатом воздействия стенки переднего мозга с подкорковыми структурами, а не самостоятельным морфогенетическим образованием. К настоящим первичным бороздам относятся *f. arcuata*, *f. supraorbitalis*, *f. marginalis*, *f. parieto-occipitalis*, *f. calcarina*, *f. colateralis*. Они участвуют в эмбриональном формообразовании головного мозга на протяжении 10 недель и затем исчезают. На их месте возникают вторичные борозды, которые сохраняются во взрослом головном мозге.

Первичные борозды отличаются по организации от вторичных борозд. Они являются складками всей стенки полушария. Одинаково изогнуты как прижелудочковая зона пролиферации клеток, так и возникающая корковая пластинка (см. рис. 20). В конце своего десятинедельного существования первичные борозды сглаживаются. Этот процесс начинается с краев каждой борозды (см. рис. 20). К началу пятого месяца развития первичные мозговые борозды исчезают, и передний мозг становится лиссэнцефальным. Полушария остаются в этом состоянии вплоть до начала шестого месяца пренатального развития. Затем появляются вторичные мозговые борозды. Они отличаются от первичных тем, что формируются на поверхности полушарий и не затрагивают прижелудочковый слой нейроэпителиальных клеток.

Следовательно, эмбриональные борозды корковой пластинки человека возникают как провизорное приспособление в результате подвижности нейроэпителиального пласта. Пласты клеток

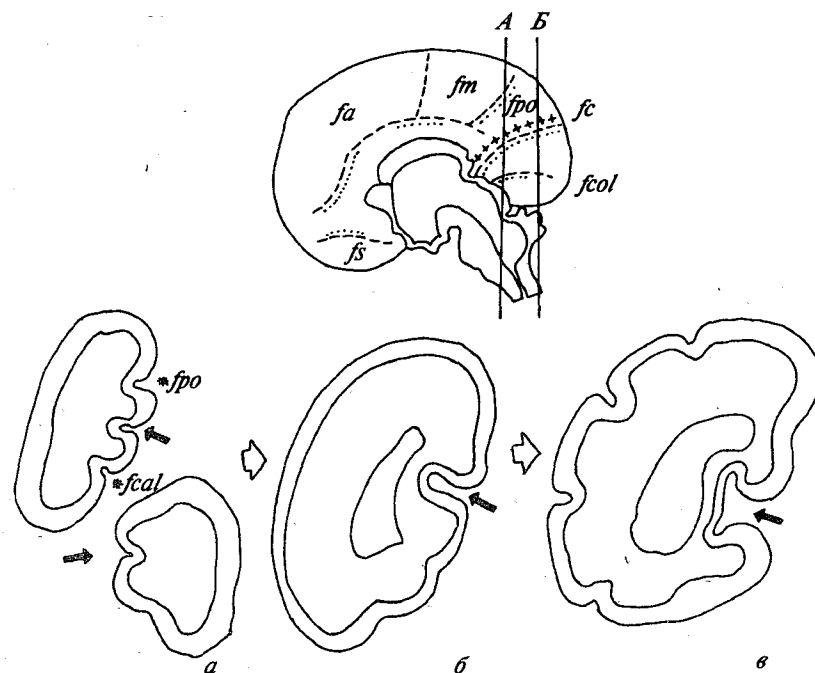


Рис. 20. Подвижность стенок эмбрионального мозга на примере образования эмбриональных извилин у человека.

На верхней части рисунка внутренняя поверхность полушария. Штрихом отмечены борозды в период наибольшей выраженности; точки — участки первичных борозд в период облитерации; крестиками обозначена постоянно существующая *f. calcarina*; линии А и Б — сечения мозга, соответствующие прорисовкам срезов на рис. а. Обозначения исчезающих в развитии эмбриональных борозд: *fa* — *f. arcuata*, *fm* — *f. marginalis sulci cinguli*, *fpo* — *f. parieto-occipitalis*, *fcol* — *f. colateralis*, *fs* — *f. supraorbitalis*. Черная стрелка — *fc* — *f. calcarina*.

В нижней части рисунка прорисовка срезов мозга человеческого эмбриона в возрасте: а — 14 недель, б — 24 недель, в — 32 недели развития. Звездочками отмечены исчезающие борозды

прогибаются в полости боковых желудочков, а затем распределяются вновь. Спустя месяц на их месте возникают вторичные борозды. По-видимому, во время формообразовательных прогибов стенки корковой пластинки происходит пространственная разметка региональной экспрессии генов, которые определяют топологию возникновения вторичных извилин. Из развития первичных и вторичных борозд выпадает только шпорная борозда, поскольку она сохраняется с эмбриональных стадий развития и не исчезает между 18-й и 20-й неделями пренатального периода (Савельев, 1989).

Кроме подвижности стенок переднего мозга человека и открывания полости IV желудочка заднего мозга, с движением нервной

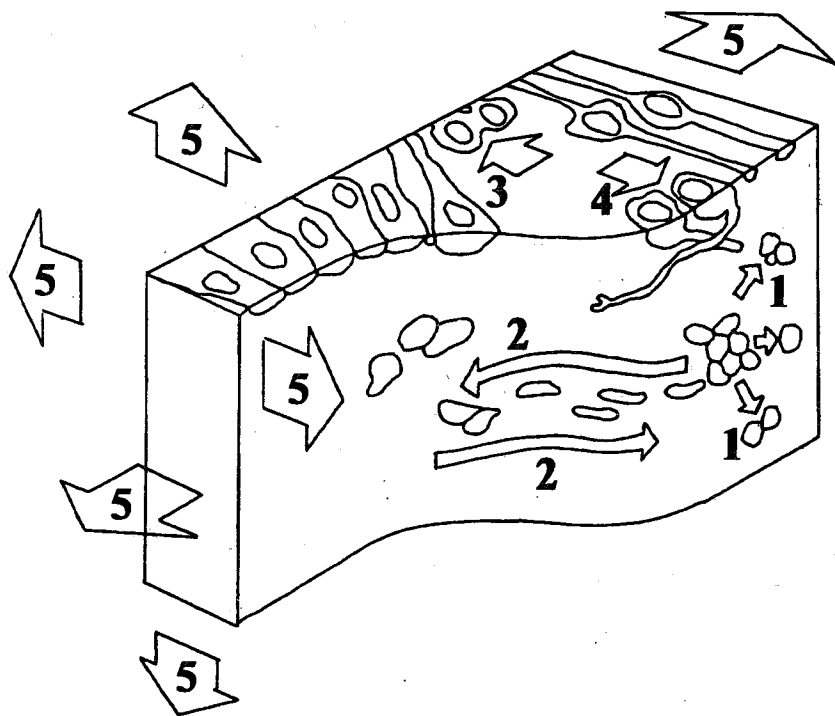


Рис. 21. Результирующая схема возможных вариантов движения нейроэпителиальных клеток.

1 — тангенциальная подвижность как результат перемешивания клеток различных клонов, 2 — движение клеток при поляризации или деполяризации, растягивании пласта, 3 — радиальная миграция при пролиферации, 4 — радиальная миграция при выходе в дифференцировку, 5 — направления смещения пласта при изменении формы мозга

трубки связаны формированием границ нейромеров, окклюзия нервной трубки (Schoenwolf, 1984) и подвижность зоны нейропора (Puelles et al., 1987). Сущность этих явлений сводится к тому, что на определенном этапе развития нейроэпителиальный пласт совершает обратимые формообразовательные движения. Так как в большинстве случаев эмбриональные движения пластов приводят к кратковременному изменению формы, биологический смысл подобных преобразований не очевиден. По-видимому, вступая в те или иные формообразовательные процессы, клетки нейроэпителиальных пластов получают новую информацию о своем положении в развивающемся головном мозге. Если рассматривать с этих позиций формообразовательные движения, то становится очевидным, что механические трансформации нейральных зачатков могут нести в себе основы позиционной информации, необходимой для более поздней дифференцировки нейробластов.

Таким образом, в процессе формообразования нейроэпителиальные клетки обладают несколькими типами подвижности. Существует тангенциальная подвижность клеток, которая приводит к их перемешиванию внутри пласта (рис. 21). Имеет место несколько типов радиальных миграций, связанных с пролиферацией и выходом клеток в дифференцировку. Кроме этого, существует подвижность клеток, связанная с поляризацией и деполяризацией, которая приводит к изменению толщины пласта и тангенциальной подвижности пластов. Наряду с движением клеток внутри пласта существует 6 степеней свободы движений всего зачатка или его небольшого участка. Он может прогибаться в полость желудочками мозга, выгибаться наружу и смещаться в любом направлении.

## МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Развитие любого органа является механическим процессом. В трехмерном пространстве нельзя изменить структуру объекта, не приложив механических усилий. В этом отношении развитие зародыша является непрерывной цепью изменения формы, а следовательно, и результатом сложных механических взаимодействий. Если для органов, выполняющих механические функции во взрослом организме, наличие механических взаимодействий в развитии кажется закономерным, то для нервной системы они не очевидны. Действительно, зачем органу, не выполняющему во взрослом состоянии механических функций и хорошо защищенному кожей, черепом и демпферной гидростатической оболочкой, выполнять какие-либо механические функции? Казалось бы, для механических взаимодействий в головном мозге нет реальных оснований. Однако существует несколько вопросов, на которые трудно ответить, не прибегая к анализу механических воздействий.

Во-первых, головной мозг обладает сложной и упорядоченной пространственной организацией как на анатомическом, так и на гистологическом уровне. Понятно, что если мы принимаем представление о том, что для изменения формы необходимы некоторые силы, то возникновение такой сложной системы, как извилина переднего мозга человека или мозговые пузыри всех позвоночных подразумевает наличие механических воздействий.

Во-вторых, хотелось бы ответить на вопрос о том, зачем вообще нужна мозгу сложная пространственная организация. По-видимому, если исходить из представлений о том, что судьба клеток довольно рано детерминируется, а пути миграции отростков нервных клеток маркированы белками или пептидами, то наличие сложной формы мозга необъяснимо. Действительно, зачем создавать извилины или бороздки, когда можно обойтись шарообразной или цилиндрической структурой без полостей внутри? Пути дифференцировки детерминированы, а аксоны смогут ползти по химически маркированным путям и без сложной пространственной организации мозга. В этом случае различия между мозгом человека, крокодила и лягушки сводились бы к различиям в весе, а не в пространственной организации мозга.

Эти два вопроса отражают две стороны формообразования. С одной стороны, мы видим существование сложной формы мозга, а с другой — не знаем, как она возникла. За счет каких именно

механических взаимодействий появилась эта трехмерная структура? По-видимому, можно допустить, что природа механических влияний на мозг может носить как эндогенный, так и экзогенный характер. При анализе природы механических взаимодействий необходима нейробиологическая модель, которую можно было бы проанализировать полностью, начиная от пространственной анатомической организации и кончая клеточными реакциями на изменение механического состояния мозга. Для этой цели более всего подходят ранние этапы развития мозга. Наиболее удачны модели на хвостатых и бесхвостых амфибиях. Эти животные обладают очень крупными клетками. Так например, длина нейроэпителиальных клеток сибирского углозуба на стадии нервной пластинки может достигать 170 мкм, а семиреченского лягушкозуба на той же стадии — до 350–450 мкм. Надо отметить, что у последнего вида нейруляция проходит при размерах нервной пластинки в 6–7 мм. Это позволяет исследовать механические реакции клеток на целом зародыше.

При исследовании механических явлений в нервной системе нельзя ограничиваться только ранними нейруляционными стадиями. Это связано с тем, что во время нейруляции органогенез нервной системы еще довольно прочно связан с дифференцировкой эктодермы и хордомезодермы. На этой стадии нервная система еще не приобрела относительную самостоятельность как орган. Только после нейруляции и формирования нервной трубки можно говорить о механических процессах в нервной системе. Однако исключать из рассмотрения нервную пластинку и клетки-предшественницы нервной системы тоже нельзя, поскольку нервная система является первым органом, который особобляется в развивающемся зародыше. Она появляется раньше сомитов, кишечника и хорды. Развиваясь, как описано в гл. 1, она интегрирует развитие всего зародыша. Тем не менее следует отметить, что первичное появление нервной системы сохраняется не у всех позвоночных. Так например, у *Elutherodactylus nubicola* (анура) почки передних и задних конечностей появляются одновременно с дифференцировкой нервных валиков (Lunn, 1942). Однако и в этом случае возникновение конечностей было индуцировано уже дифференцированной нервной пластинкой.

Таким образом, в развитии нервной системы существуют два периода, которые могут различаться по источникам механических процессов. Первый период охватывает этап развития от появления первых клеток-предшественниц до окончания нейруляции. В это время механические процессы, проходящие в нервной пластинке, интегрированы с остальным зародышем и могут носить как эндогенный, так и экзогенный характер. Источник механических напряжений может быть локализован и вне нервной пластинки. После нейруляции нервная трубка представляет собой

довольно обособленный орган. В ней должны проходить механические процессы, характерные для нервной системы и достаточно независимые от экзогенных воздействий. Поэтому существует необходимость рассмотреть по меньшей мере нервной системы и достаточно независимые от экзогенных воздействий. Поэтому существует необходимость рассмотреть по меньшей степени два этапа развития нервной системы: до- и постнейруляционные периоды.

Во время обоих рассматриваемых периодов развития нервная система претерпевает активные изменения формы. Из плоского нейроэпителиального зачатка она становится трубкой с сегментированными и неравнозначными отделами — мозговыми пузырями. Если мы рассматриваем механическую природу наблюдаемых изменений, то основным вопросом будет выяснение источников механических напряжений. Возникает естественный интерес к тому, как поддерживается и динамично изменяется форма, где находится и за счет чего функционирует видимая биомеханика. Надо учесть и то, что существуют сведения о реальном количественном выражении прилагаемых к морфогенезу сил. Так, например, были проведены опыты по исследованию величины механических сил, действующих на нейруляцию у амфибий. Для этого между нервными валиками зародыша *Triturus alpestris* были помещены два небольших гантелеобразных электромагнита. Каждый из них лежал на одной из сторон нервной пластинки. Электромагниты были ориентированы таким образом, чтобы они отталкивались друг от друга. Между магнитами сохраняли постоянное расстояние, так что нервная пластинка в этой области оставалась открытой. Понятно, что для сохранения постоянного расстояния авторы экспериментов постепенно увеличивали магнитное поле, что позволило им по разнице напряжения вычислить "силу смыкания нервных валиков". Для альпийского тритона она составила  $(4,25 \pm 0,25) \cdot 10^{-2}$  дин, а для аксолоталя  $(10 \pm 1) \cdot 10^{-2}$  дин. Из этих опытов был сделан неверный вывод о том, что полученная величина свидетельствует об очень небольшой затрате энергии при совершении сложных морфогенетических движений (Selman, 1958). На самом деле автором этой работы измерялась сила, затраченная на преодоление искусственно навязанного внешнего механического сопротивления, и никак не связанная с силой сопротивления нейруляции со стороны тканей зародыша. По-видимому, силы, ушедшие на преодоление сопротивления тканей, должны быть на порядок больше, чем силы, измеренная в данных опытах. В предложенном опыте можно было бы измерить реальные силы, действующие в ходе нейруляции, если бы во время эксперимента автор освободил края нервной пластинки от связи с эктодермой. Тогда без сопротивления эктодермы были бы получены реальные величины сил, действующих на нейруляцию. В описанных экспериментах показано наличие механических сил, действующих в

ходе нейруляции, но не дан ответ на вопрос ни о величине, ни о причинах этих сил.

Для ответа на вопрос о природе механических взаимодействий можно использовать два основных подхода. В наиболее простом случае можно просто разрушать связь между клетками, надеясь на то, что при сбросе механического напряжения края пласта каким-либо образомотреагируют. В этом варианте анализ реакций нейроэпителиальных пластов позволит выяснить, что поддерживает напряжения и чем они вызываются. Во втором варианте можно использовать ситуацию создания новых напряжений. В таком эксперименте можно ожидать специфическую реакцию клеток, которая также позволит понять природу механического изменения формы. Эти подходы будут рассмотрены в следующей главе.

### 3.1. ИСТОЧНИКИ МЕХАНИЧЕСКИХ НАТЯЖЕНИЙ

Источник механических взаимодействий должен находиться в самом развивающемся зародыше. Вопрос сводится к тому, чтобы выяснить, где именно он находится: в нервной системе или вне ее. Для ответа на этот вопрос обратимся к результатам простых опытов по сбросу механических натяжений в эмбриональном мозге при помощи микрорассечений (Савельев, 1987 б, 1990). Было проведено несколько серий опытов, в которых при помощи микроманипулятора с металлическим или обсидиановым лезвием рассекались различные участки головного мозга. Одновременно велась скоростная микрокиносъемка и осуществлялся гистологический анализ последствий рассечений. Все серии опытов проводились на однослойном нейроэпителии хвостатых амфибий трех видов: сибирского углозуба, гребенчатого и испанского (ребристого) тритонов. Для исследования механических напряжений было выбрано три отдела головного мозга: промежуточный мозг в области воронки, передний мозг — в дорсальной части полушария и задний мозг — на уровне роstralной области IV желудочка. Надо отметить, что непосредственно после нейруляции в эмбриональное формообразование вовлечены процессы миграции, пролиферации и изменения формы клеток. Эти явления необходимо учитывать при выяснении причин механических напряжений головного мозга. Поэтому в описании микрорассечений нервной трубки введены данные по радиоавтографии, пролиферации, витальному маркированию клеток проционовыми красителями и формализованное описание формы клеток. В качестве параметра, отражающего форму клетки, использован индекс поляризации  $P$ , который определяется отношением длины клетки  $L$  к ее максимальной толщине  $W$  (рис. 22, а). Известно, что в процессе нормального развития мозга форма клеток изменяется, поэтому имеет смысл ввести обозначения для индексов поляризации

различных зон отделов мозга. Пусть  $P_t$  обозначает индекс поляризации клеток, стремящихся распластаться по отношению к поверхности мозга, а  $P_n$  указывает на индекс поляризации клеток, стремящихся вытянуться по нормальям к пласту (см. рис. 22). Введя в описание перечисленные параметры на уровне отдельных структур эмбрионального головного мозга, мы можем оценить практически все морфологические изменения.

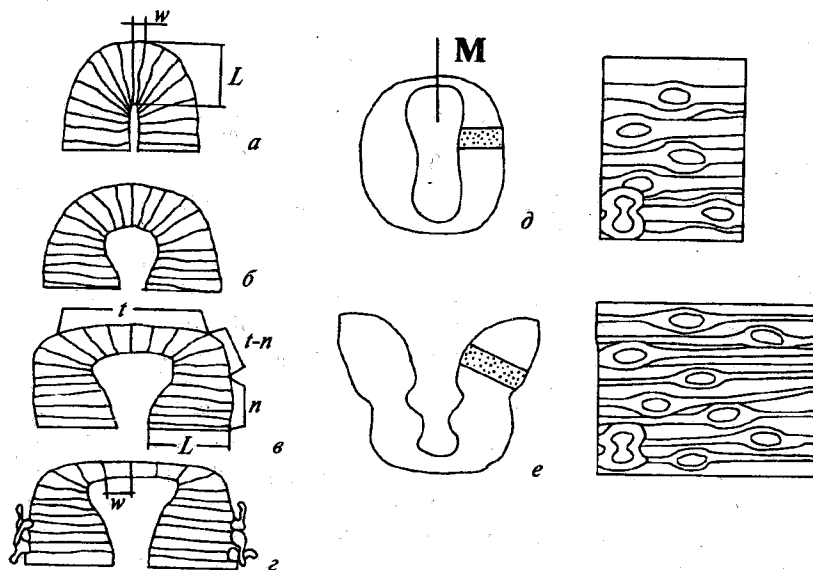


Рис. 22. Преобразования формы мозга в районе воронки промежуточного мозга амфибий (а-г); реакция нервной трубки и нейроэпителиальных клеток на рассечение пласта (д-е).

Пространственная дифференцировка воронки связана с формированием нескольких типов клеток:  $t$  — распластанных,  $t-n$  — колбовидных,  $n$  — поляризованных, вытянутых по нормальям к пласту. Для этих типов клеток характерными признаками являются отношения максимальной толщины  $W$  к максимальной длине  $L$ , чем определяется величина поляризации. При рассечении пласта по линии  $M$  стенки мозга расходятся (е), что сопровождается удлинением клеток в зонах, обозначенных точками

Рассмотрим эмбриогенез промежуточного мозга в дорсальной части воронки (см. рис. 22). На стадиях 19–21 латеральные края медулярной пластинки сливаются, не образуя полости промежуточного мозга (рис. 22, а). Индексы поляризации  $P$  клеток дорсальных и латеральных областей одинаковы. На стадиях 20–21 происходит перемещение клеток в латеральные зоны отдела, как показано на рис. 22. Перемещение клеток в вентролатеральном направлении приводит к вытягиванию нейробластов по краям растянутых зон. Клетки латеральных областей воронки к стадии

23 удлиняются по отношению к нормальям пласта на 20–25 мкм, что составляет 25–30% их первоначального размера. Одновременно клетки дорсальной области воронки укорачиваются на 40–50%, растягиваясь в горизонтальном направлении (см. рис. 22, б). Если рассмотреть динамику изменения индексов поляризации  $P$ , то станет ясно, что  $P_t$  дорсальных областей уменьшается, а  $P_n$  латеральных зон воронки возрастает. На стадиях 23–24 отношение  $P_t : P_n$  близко к отношению 1:2. В этот период, как показало инкубирование в растворе  $^3\text{H}$ -тимидина, синтез ДНК в латеральных и дорсальных областях промежуточного мозга практически не наблюдался. Распластывание клеток дорсальных областей воронки сопровождается сжатием их длинных осей по отношению к полости желудочка. К стадии 24 увеличение длины клеток, ограничивающих тангенциально растянутую область, достигает своего максимума и  $L = 120\text{--}130$  мкм (см. рис. 22, в). Клетки не только предельно вытянуты, но и значительно скошены относительно нормальей к пласту (см. рис. 22, в, г). Отношение  $P_t$  к  $P_n$  клеток латеральных зон зачатка продолжает увеличиваться. К стадии 25 соотношение индексов поляризации возрастает от 1:3 до 1:5. Разрезы в тангенциально растянутой области воронки (см. рис. 22, д, е) приводили к немедленному расхождению краев сечения, причем ширина возникшей раны была больше полости желудочка мозга. Анализ кинограммы показал, что время расхождения краев сечения составляет  $1/20\text{--}1/30$  с. Экспериментально установлено время существования устойчивого поля механических натяжений. Судя по динамике расхождения краев сечения, максимум натяжения приходится на стадии 23–25.

Выявленные периоды максимальных натяжений в пластах коррелируют с наибольшим вытягиванием клеток по краям тангенциально растянутой зоны воронки (см. рис. 22, г). Это позволяет сделать вывод о поляризации клеток латеральных зон воронки как возможной причине тангенциальных натяжений, что согласуется с моделью эпителиальных морфогенезов (Белинцев и др., 1985). Вслед за выявленными тангенциальными натяжениями дорсальный пласт клеток воронки растягивается. Растяжение клеточных тел сопровождается и сжатием их ядер. Постепенно клетки латеральных областей воронки укорачиваются ( $L = 80\text{--}90$  мкм), но вплоть до стадии 28–29 при рассечении поля натяжений края разреза расходятся. После стадии 29 рассечение не вызывает необратимого расхождения краев раны, что говорит о снижении тангенциального натяжения в пласте. Натяжение в пластах падает при  $P_t < 1$  и  $P_n < 10$ . Отношение индексов поляризации растянутых и нормально сжатых зон на этой стадии колеблется от 1:30 и 1:60. Как раз к этому времени в ядрах клеток пробуждается способность к синтезу ДНК. Инкубация эмбрионов в  $^3\text{H}$ -тимидине показала, что индекс меченых ядер (ИМЯ) наибольший в областях перехода между радиально сжатыми и растянутыми

клетками. ИМЯ<sub>n</sub> относится к ИМЯ<sub>t</sub> и к ИМЯ<sub>(t-n)</sub> переходной зоны, как 3:1:6. В зоне с максимальными ИМЯ обнаружено 43% всех выявленных митозов. Перемещение клеток внутри пластов заканчивается к стадиям 29–30, когда ядра и клетки тангенциально растянутых зон ложатся горизонтально (см. рис. 22, з). В латеральных зонах с вытянутыми клетками часть нейробластов выходит из пролиферации, смещается к наружному краю пласта и образует отростки (см. рис. 22, з). В результате описанных событий дорсальная часть воронки к моменту вылупления личинки выглядит как сильно растянутый однослойный пласт из недифференцированных клеток, выполняющий на ближайших стадиях чисто механические функции.

Несколько своеобразных черт было обнаружено при исследовании развитых форм парных полушарий переднего мозга. На стадии 24 в вентральных областях примордиального переднего пузыря образуется выпячивание, дающее начало парным полушариям переднего мозга. Непосредственно после образования выпячивания клетки от вентральных и дорсальных стенок пузыря перемещаются в латеральные области зачатка, создавая парные боковые выпячивания. В этот период  $P_t$  дорсальных зон относится к  $P_n$  латеральных областей зачатков полушарий, как 1:2. Латеральные выпячивания после морфогенетических перемещений клеток в ростродорсальные области зачатка дают начало парным полушариям. В латеральных зонах зачатка полушария клетки поляризуются, вытягиваясь на 20–25 мкм ( $L = 85–90$  мкм) (рис. 23, б). Одновременно с процессом поляризации в латеральных зонах клетки вентральных и дорсальных областей укорачиваются и сжимаются ( $L = 15–20$  мкм);  $P_n$  увеличивается, а  $P_t$  уменьшается. Отношение  $P_t : P_n$  на стадиях 25–26 колеблется от 1:3 до 1:4. Рассечения в предполагаемых областях тангенциальных натяжений — в дорсальных и вентральных областях зачатка (см. рис. 23 д) — приводят к резкому расхождению краев разреза и выворачиванию полости желудочка мозга, причем рассечение в дорсальной области пласта зачатка вызывает большее расхождение краев раны, чем рассечение в вентральной зоне. На более поздних стадиях рассечение вентральных областей переднего мозга приводит к быстрому смыканию краев разреза, тогда как дорсальные рассечения до стадии 36 вызывают расхождение краев пласта. Максимальное расхождение краев пласта при рассечении дорсальных зон совпадает по времени с наибольшей величиной поляризации клеток в латеральных областях и приходится на стадии 26–28 (см. рис. 23).

Как показали опыты с инкубацией в  $^3\text{H}$ -тимидине, наибольший ИМЯ на стадиях 31–32 сосредоточен в областях перегибов пластов мозга на границах тангенциальных натяжений и зон поляризованных клеток. Первые дифференцированные клетки переднего мозга появляются на стадиях 28–29 в латеральных зонах

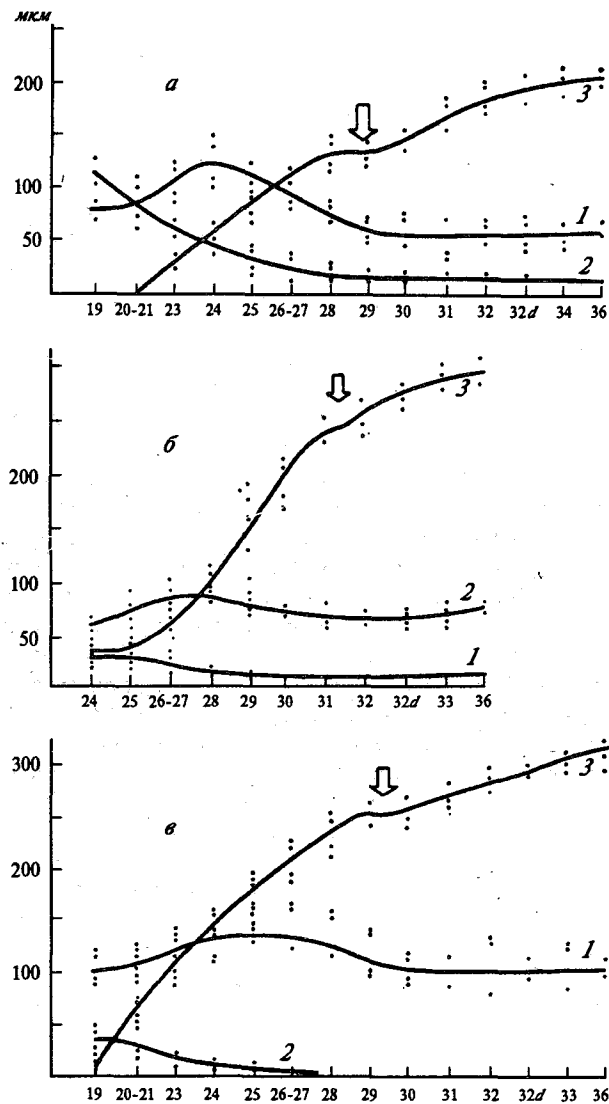


Рис. 23. Изменение длины клеток в нормальных к поверхности пласта направлениях на различных стадиях развития от нейруляции до начала активного питания личинок: а — промежуточный, б — передний, в — задний мозг.

1 — длина вытянуто-поляризованных клеток, 2 — длина клеток тангенциально растягиваемых зон, 3 — смещение витальной метки. Стрелкой показана стадия прекращения движения за счет растягивания пласта мозга. По оси абсцисс — стадии развития, по оси ординат — расстояние (3) или размер клеток, (в мкм)

при максимальной поляризации клеток. К началу стадии 34 дифференцировка вызывает вторичное утолщение пласта полушария переднего мозга за счет обратной миграции нейробластов из зон деления на границе перегибов пласта.

Таким образом, в результате активных морфогенетических перемещений клеток, поляризации и тангенциального растягивания дорсального пласта переднего мозга возникают парные полушария. Пролиферация и обратная миграция от границы области тангенциальных натяжений вызывают образование примордиального гиппокампа с диффузно расположенными клетками.

Интересен морфогенез заднего мозга, так как изменение его форм приводит в конце концов к естественному разрыву нервной трубки. В целом процесс расхождения пластов клеток в дорсальной части нервной трубки на уровне заднего мозга сходен с развитием воронки и переднего мозга. Однако раскрытие полости IV желудочка интересно тем, что между разошедшимися пластами нет клеточного дорсального мостика, как в других отделах мозга. Пласты переднего мозга расходятся на такое значительное расстояние, что существующая до стадий 26–27 непрерывная клеточная стяжка полностью исчезает. Если рассмотреть график на рис. 23, то станут понятны причины отличия морфогенеза заднего мозга от других отделов. Поляризованные клетки вытягиваются на 10–15%, что наполовину меньше, чем в других предыдущих случаях. Однако они исходно вытянуты на 25–30% больше, чем клетки других структур (см. рис. 23, в). Второе отличие связано с тем, что в заднем мозге поляризация клеток не имеет выраженного временного пика и сохраняется значительно дольше, чем в других отделах мозга (см. рис. 23). Экспериментально выявлено третье отличие морфогенеза этого отдела мозга. В период наибольшей поляризации клеток с 23-й по 28-ю стадию поле тангенциальных натяжений в дорсальных отделах заднего мозга создается клетками, расположенными в латеральных и ростральных пластах головного мозга. Рассечения пластов по линиям «е» и «д» (рис. 24) на стадиях 23–24 приводило к расхождению краев разреза в латеральных направлениях, а при поперечном рассечении — к рострально ориентированному отворачиванию пласта (см. рис. 24). Возникшие натяжения существуют продолжительное время, что приводит к формированию полости IV желудочка и исчезновению к стадии 32 дорсальной клеточной стяжки между пластами заднего мозга. Индексы поляризации изначально в несколько раз больше, чем в других структурах мозга на аналогичных стадиях. Соотношение  $P_t : P_n$  уже к стадии 23 колеблется в интервале от 1:10 до 1:20, а к стадии 26 достигает 1:60. На более поздних стадиях эмбриогенеза клетки из дорсальной части заднего мозга перемещаются в дорсолатеральные отделы, где формируют ряд сенсорных и двигательных ядер. Основными причинами дальнейшего расхождения пластов заднего мозга являются поляризация

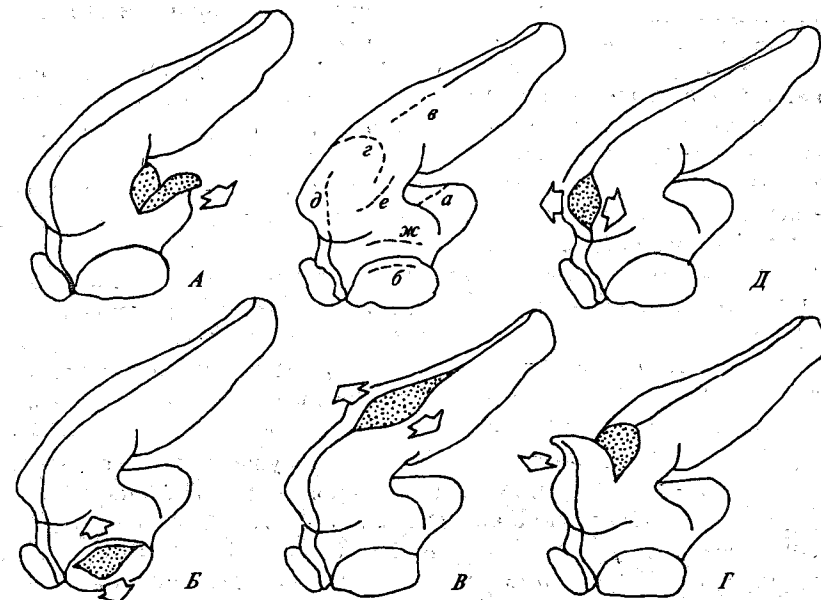


Рис. 24. Рисунок пластической реконструкции головного мозга иглистого тритона с нанесенными на него линиями рассечений (а–ж) и соответствующих им последствий (А–Д).  
Изображены первичные реакции пластов на рассечения. Стрелками обозначены направления расхождения пластов, точками — открытые полости желудочков или внутренние поверхности пластов. Рассечения по линиям е и ж не вызывали расхождений краев разреза

клеток в вентральной области и массовый выход из пролиферации дифференцирующихся нейробластов медиальной части отдела.

Во всех случаях сопоставлялись величина перемещений витальной метки, нанесенной на пласт, с растяжением и поляризацией клеток, участвующих в описанных выше процессах (см. рис. 23). В каждом случае выявлена достоверная корреляция между поляризацией, растягиванием клеток в области тангенциальных натяжений и величиной смещения метки. Однако на перемещение метки влияют и другие причины, так как пройденное ею расстояние больше того, которое может дать суммирование длин уплощенных растянутых клеток. Это связано с перемещением клеток в различных плоскостях и в незначительной степени — со сжатыванием поляризованных клеток по отношению к нормальным пласта.

Полученные результаты позволяют выделить ряд общих явлений, характерных для эмбрионального морфогенеза головного мозга. В данном случае рассмотрены те процессы формирования, которые связаны с изменением положения клеток в пласте,

обратимой поляризацией клеток и временно возникающими механическими натяжениями пластов мозга.

В нашей работе обнаружено, что исходно не дифференцированный однородный зачаток, или нейроэпителиальный пласт, расчленяется на области тангенциально растянутых и тангенциально сжатых (растянутых по нормальям к пласти) клеток. Именно вследствие этого возникают тангенциальные натяжения в источающейся зоне зачатков, что согласуется с моделью эпителиальных морфогенезов (Белинцев и др., 1985). На основании этой модели и изложенных данных можно предположить, что чередование зон механических натяжений — сжатий создает пространственную инфраструктуру внутри развивающегося мозга. Инфраструктура каждого из отделов мозга состоит из двух-трех зон тангенциальных натяжений, которые могут существовать одновременно или последовательно заменять друг друга. Такой пример мы видим в случае переднего мозга. В полушарии существуют две зоны тангенциальных натяжений: вентральная — короткоживущая и дорсальная — долгоживущая. Выполняя формообразовательные задачи, они теряют свои механические свойства и перестают существовать. Именно при взаимодействии нескольких зон механических натяжений есть основания сказать, что спад натяжений пластов в одной структуре может вызвать морфогенетические преобразования в другой, далеко стоящей от нее области. Таким образом, допустимо предположить, что целостность раннего развития формы мозга базируется на пространственной организации полей тангенциальных натяжений, возникающих за счет перемещений пластов клеток.

Полученные результаты показывают, что существует связь между положением клеток в поле натяжений, пролиферацией и способностью клеток к дифференцировке. Максимальный ИМЯ и наибольшее число митозов выявлены на границе областей тангенциальных натяжений, в зонах перегибов пластов, где клетки находятся на более крутом участке градиента механических натяжений. Раньше всего нейробласты выходят из пролиферации в зонах с максимальным значением  $P$ . Фактически первые зоны дифференцировки расположены среди сжатых (вытянутых по нормальям к пласти) клеток. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что тангенциальные натяжения детерминируют не только форму эмбрионального мозга, но и распределение пролиферативных зон и, как следствие, области первичной дифференцировки нейробластов.

Таким образом, данные по анализу микрорассечений подтверждают существование механических напряжений в нервной трубке. На возможность их существования указывал еще более 100 лет назад Гис, а многие авторы использовали их в гипотетических моделях развития нервной системы (М. Jacobson, 1978; Schoenwolf, Desmond, 1984). По сути дела, наблюдаемые изменения формы

и тангенциальные перемещения клеток создают гетерогенность пространственной организации пластов, которая приводит к образованию систем доменов (Белинцев и др., 1985 а, б), управляющих зонами поляризации клеток. Поляризованные и вытянутые клетки создают поля натяжений, которые регулируют изменение формы зачатков эмбриональных структур (Белоусов, 1978, 1979; Петров, Белоусов, 1984).

Источником механических натяжений в пластах мозга является тангенциальная по отношению к поверхности мозга поляризация клеток. Однако нет подробных сведений о механизмах, определяющих поляризацию клеток. Нет однозначного ответа на вопрос, чем запускается поляризация клеток и каким образом она останавливается. Непонятно, чем определяется в каждом конкретном случае величина вытягивания клетки по нормали к пласти.

Существует по меньшей мере два противоположных ответа на каждый из поставленных вопросов. Взгляды на наблюдаемое явление различаются принципиально следующим образом. С одной стороны, можно считать, что региональность поляризации изначально детерминирована генетически и практически необратима. В пользу такой точки зрения существуют экспериментальные подтверждения. Так, например, в опытах А. Джекобсона (Jacobson, 1981) было показано, что при переносе нейроэктодермы из головной части зародыша в спинную трансплантированные клетки сохраняют способность поляризоваться так, как это характерно для донорного региона. Фактически автор утверждает, что в нормальном развитии клетки головных регионов поляризуются быстрее, что описывалось в гл. 1, поэтому он наблюдал только различия в скоростях поляризации, а не детерминацию ее величины.

С другой стороны, существуют представления, согласно которым как региональность поляризации, так и ее пределы определяются экзогенными факторами (Белинцев и др., 1985 а, б; Белинцев, Савич, 1985). В этой модели предполагается, что величина поляризации контролируется пограничными условиями и в конечном счете зависит от силы механических натяжений, которые возникают в результате поляризации клеток. Таким образом, вторая модель предполагает наличие обратной связи. Клетки при поляризации формируют механическое натяжение в пласте (рис. 25). Затем они сами попадают под его влияние и при определенной величине возникших механических натяжений перестают поляризоваться. Если принять эту точку зрения, то для ее проверки необходимо поставить нейроэпителиальные клетки в такие условия, в которых они могли поляризоваться ~~как угодно долго~~, оставаясь при этом в целостном пласте мозга. Тогда можно будет установить, каким образом детерминируется величина поляризации клеток. Если поляризация клеток достигнет ~~наблюдаемой~~ в нормальном развитии величины и остановится, то необходимо согласиться с наличием внутриклеточного контроля масштабов

поляризации. И наоборот, если клетки будут поляризоваться намного больше, чем в норме, то надо принять другую точку зрения. Для проверки этих двух гипотез была разработана модель, которая использовалась для анализа механизмов контроля поляризации нейроэпителиальных клеток. В качестве объектов исследовались хвостатые амфибии на стадии нейруляции.

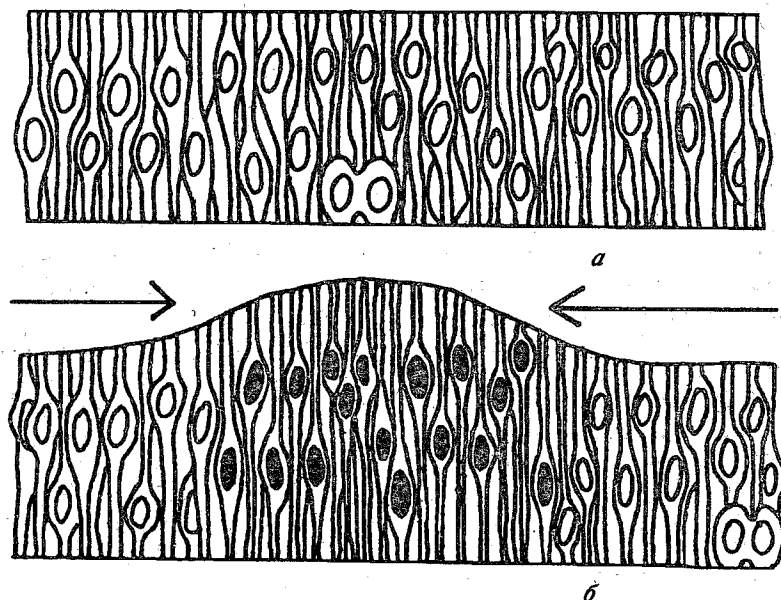


Рис. 25. Механизм возникновения тангенциального механического натяжения в нейроэпителиальном пласте.

Источником тангенциальных натяжений в пласте является поляризация группы клеток с закрашенными ядрами. В результате их вытягивания по нормальям к пласту происходит его локальное утолщение, что сопровождается растягиванием соседних участков пласта. Стрелками обозначено направление действия натяжения

Известно, что хвостатых амфибий начиная со стадии гастролы нейроэпителиальные клетки и их предшественники непрерывно поляризуются. При сопоставлении размеров клеток на стадии гастролы и нейрулы обнаружено, что их длина увеличивается в 2-3 раза. По сути дела это один из наиболее продолжительных и непрерывных периодов поляризации клеток зачатков нервной системы. Было сделано предположение, что при задержке нейруляции можно ожидать нормальной региональности контактной поляризации клеток. В противном случае поляризация будет возрастать до

физиологических пределов возможностей клеток. Нейруляция задерживалась следующим образом. В головную зону смыкающейся нервной пластинки вводили небольшой участок целостного эпителия, удаленного из нервной пластинки того же вида. Участок ткани трансплантировали с таким расчетом, чтобы у реципиента сформировалась более или менее полноценная нервная трубка с небольшим незамкнутым участком в зоне презумптивного среднего мозга (рис. 26, б). После такой операции пласты мозга не теряют сразу свою пространственную организацию.

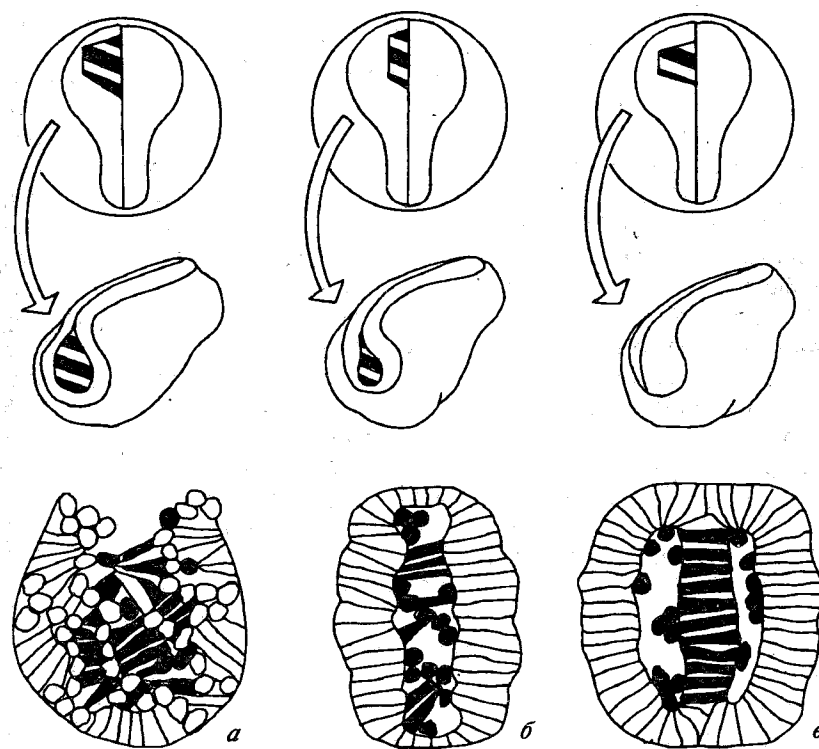


Рис. 26. Схемы опытов по трансплантации участка нервной пластинки в полость нервной трубки.

В этих опытах было установлено, что задержка нейруляции (а, б) вызывает, как и введение дополнительного эпителиального пласта в полость желудочка (в), избыточную поляризацию клеток. Клетки поляризуются до тех пор, пока не возникают тангенциальные натяжения

Трансплантат ограничен клеточными мембранами пластов нервной трубки реципиента, хотя спустя 36 ч проникновение донорных клеток в полости и пласты мозга становится заметным. Измерение длин нейроэпителиальных клеток показало, что клетки пластов реципиента поляризуются на 25-30% больше, чем при

нормальном развитии. Следовательно, поляризация нейроэпителиальных клеток контролируется механическими натяжениями, которые возникают в нервной трубке после нейруляции. Если их возникновение задержать, поляризация продолжается до тех пор, пока натяжение не достигнет некоторой пороговой величины. В этом опыте натяжение появляется после срашивания краев трансплантата и медуллярной пластинки реципиента. Механическое натяжение замыкается, достигает определенной величины и поляризация останавливается.

Этим опытом дан ответ на вопрос о механизмах, определяющих конечную величину поляризации нейроэпителиальных клеток. Вместе с тем интересны потенциальные возможности клеток поляризоваться. Как долго могут поляризоваться клетки, если их вывести из-под контроля механических натяжений? Для ответа на этот вопрос проводились аналогичные опыты по трансплантации участков нейроэпителия в полость закрывающейся нервной трубки. Отличие этих опытов от предыдущих заключалось в том, что трансплантируемый участок нейроэпителия вводили с таким расчетом, чтобы, вступив в контакт с пластами реципиента, он натянулся сам, а нервная трубка закрылась. Для этого пласт клеток вертикально подсаживали в нервную трубку. В 10% случаев удалось получить нервную трубку с третьим пластом в полости желудочка (см. рис. 26, в). Если трансплантат срастался с пластами реципиента на дорсальной и вентральной стороне нервной трубки, то он не диссоциировал на отдельные клетки, а сохранялся в виде пласта. Натянутый пласт трансплантата был ограничен базальной и апикальной мембранами, которые сохранялись после пересадки. Такая трансплантация останавливала морфогенез головного мозга реципиента. Длина нейроэпителиальных клеток достигала 160–180 мкм и почти вдвое превышала норму.

Следует подчеркнуть, что избыточная поляризация клеток распространялась те пласты мозга, которые в норме были пассивно растянуты. В этих зонах разница между экспериментальными и нормальными клетками зародышей была трехкратной. Разница между поляризованными клетками в опыте и норме была меньше и составляла около 50%. Сверхполяризованные клетки не формируют полноценных структур головного мозга. Закладка переднего мозга отсутствует полностью. В области спинного мозга формируется однородная толстостенная трубка, а вместо глаз образуются выпячивания из сверхполяризованных клеток. При рассечении нейроэпителиальных пластов края разреза расходились слабо, что говорит о небольшой величине механических натяжений. Реакция на рассечения была слабой и зависела от величины сверхполяризации: чем она была выше, тем слабее расходились края рассеченного пласта. Однако натяжения не достигали величин, характерных для нормального развития.

Таким образом, в проведенных опытах удалось установить максимальные величины поляризации нейроэпителиальных клеток. Клетки нервной трубки могут поляризоваться в 1,5–2 раза больше, чем в нормальном развитии. Это показывает, что в нормальном развитии потенциальные возможности поляризации нейроэпителиальных клеток используются менее, чем на половину. Из опытов также ясно, что фактором, ограничивающим величину поляризации клеток нейроэпителия, является комплекс механических натяжений, который возникает сразу после замыкания нервной пластинки. Если натяжений в пласте не возникает, клетки будут поляризоваться до своего физиологического предела, однако если нервная трубка замыкается, поляризация останавливается.

Следовательно, правомерен вывод о том, что величина поляризации нейроэпителиальных клеток не задана генетически и контролируется натяжениями ткани. Надо отметить, что попытки исследовать поляризацию клеток вне организма (в культуре ткани) привели Гольтфретера (Holtfreter, 1948) к прямо противоположным выводам. Автор показал, что после диссоциации нервной пластинки и инкубирования отдельных клеток в культуре они проявляют тенденцию к поляризации. Клетки вытягиваются вдоль своих длинных осей, как в нормальной нервной пластинке и трубке. Стремление клеток к непрерывной поляризации Гольтфретер рассматривал как исключительно внутренний фактор. Эти данные не противоречат приведенным выше, но подчеркивают вопрос о причинах первоначальной, региональной поляризации клеток. В этом отношении наиболее интересны данные Лакирева с соавт. (1988), которые показали, что перенесение участка анимальной поверхности гастролы амфибий до начала индукции на латексную подложку и ее последующее растягивание запускает поляризацию клеток и последующую дифференцировку тканей зародыша. Однако геометрия нервной трубки и головного мозга более сложная, чем в изучавшихся ранее моделях. Поэтому имеет смысл сначала оценить организацию механических натяжений в мозге после нейруляции и при дифференцировке основных отделов.

### 3.2. ТИПЫ МЕХАНИЧЕСКИХ НАТЯЖЕНИЙ И ИХ СВОЙСТВА

В предыдущей главе описаны эксперименты, показавшие наличие механических напряжений в нервной трубке и эмбриональном головном мозге амфибий. Тангенциальные натяжения вызываются и регулируются клетками, способными к поляризации и индукционной передаче поляризации друг другу (Белинцев и др., 1985 а). Известно, что, как правило, поляризация клеток компартментализована, т.е. группа клеток, вызывающая натяжение, обособляется от растягиваемых клеток, создавая морфологические субъединицы формообразования (Белинцев и др., 1985 б).

Ранее было обнаружено чередование растягивающих и растяжимых областей мозга (Савельев, 1987 а, б). Растягивающие области состоят из поляризованных клеток, которые вытянуты по нормальям пласта пропорционально силе действующего натяжения. Растягиваемые клетки пассивно передают натяжение и не участвуют в его создании. Было показано также определяющее воздействие клеточной поляризации и механических натяжений на морфогенез и дифференцировку осевых зачатков (Белоусов и др., 1974, Белоусов, 1979).

В настоящей главе излагаются опыты по выявлению сложной системы механических натяжений в эмбриональном мозге хвостатых амфибий после нейруляции. Для их анализа проводилось четыре типа рассечений, которые можно было объединить парно: 1) рассечения, при которых полностью отделялась часть мозга; 2) частичные рассечения отдельных мозговых структур.

К первой группе рассечений (Р1) относятся фронтально-сагитальные разрезы мозга, показанные на рис. 27 а, б. При таких рассечениях отделяли сектор мозга. Если рассечение проходило на уровне теменного изгиба (рис. 27, б), то наблюдали быстрые деформации пластов, которые охватывали весь мозг и заканчивались за 10–15 минут. После рассечения клетки утрачивали обычную ориентацию по нормальям к полости желудочка и располагались случайным образом (рис. 27, в, г). Спустя 20 мин пласты полностью деформировались, изгибались складками и через час начинали распадаться на отдельные клеточные элементы. В деструктурированных пластах клетки теряли нормальную ориентацию, округлялись и выходили из пласта. Через час они выглядели как гомогенат округлившись клеток эпителиальной природы. В таком гомогенате клетки выживали в течение нескольких часов, но нейральных производных не образовывали. Описанная деструкция охватывала весь головной мозг, но не распространялась на 2/3 спинной части нервной трубки. Реакцию задних отделов мозга и ростральной трети нервной трубки можно было наблюдать непосредственно после рассечения ростральных структур (см. рис. 27, г). Реакция каудальных отделов головного мозга выражалась в том, что в дорсальных областях пласты расходились, а нервная трубка возвращалась к состоянию нервной пластинки. Эта реакция наблюдалась только на 21-й и в начале 22-й стадий, когда наиболее сильны натяжения, ориентированные поперечно. В задних областях мозга исходная ориентация клеток сохранялась значительно лучше, чем в ростральных отделах, хотя часть клеток была наклонена к нормальям пласта (см. рис. 27, г).

Аналогичное, но осуществленное в меньших масштабах рассечение мозга приводило к иным результатам. Если оно проводилось по линиям, изображенным на рис. 27, а, то через 5–10 мин за районом разреза формировались валики из клеток, расположенных на краях сагиттального сечения (см. рис. 27, б). Клетки из

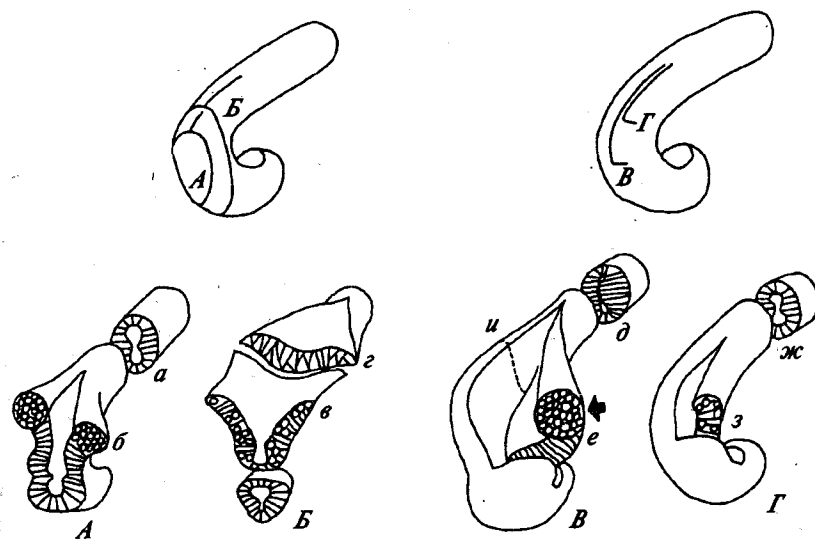


Рис. 27. Микрорассечения нервной трубки, с помощью которых выявлялись тангенциальные механические натяжения.

В верхней части рисунка буквами обозначены линии рассечений, в нижней — соответствующие им реакции нейроэпителиальных пластов. а, г, д, ж — оптические разрезы, б, в, е, з — реакции пласта в зонах рассечений

положения по нормальям к пласту переориентируются вдоль оси тела эмбриона. В разворот на 90° вовлечены клетки, расположенные в дорсальных областях мозга, по краям разреза, тогда как вентрально лежащие клетки наклонены на 25–30°, но не переориентированы по отношению к нормальям пласта. Состояние двух тяжей клеток вдоль сагиттального разреза весьма нестойкое. Спустя 1,5–2 ч система тяжей начинает деструктурироваться, теряет форму и распадается на отдельные клетки. В случае такого рассечения каудальные отделы головного мозга также остаются интактными. Даже спустя 1,5 ч после рассечения не обнаружено заметных изменений ни в форме трубки, ни в ориентации клеток в этом отделе.

Вторая группа рассечений (РII) затрагивала только незначительный участок мозга, сохраняя общую целостность структур. Сюда входили рассечения двух типов. В одном случае сагиттально рассекали значительную часть нервной трубки (см. рис. 27, а) (РIIа), а в другом (РIIб) — только небольшой дорсальный участок мозга (рис. 27, г). Оба типа сагиттальных рассечений завершали небольшой тангенциальной подрезкой правой или левой стенки мозга, из-за чего, как предполагалось, должны рассекаться линии осевых сагиттальных натяжений мозга. Тангенциальная подрезка

затрагивала только дорсальную часть одного из пластов, входя в глубину пласта на 100–150 мкм.

При РПа результаты операции затрагивали все области мозга. Подрезку пластов проводили с таким расчетом, чтобы сохранить на левой стороне все натяжения, кроме поперечных, а на правой — расцечь как поперечные, так и сагиттальные натяжения. При этом длина продольного разреза имеет существенное значение. При большом разрезе левая стенка мозга отогнулась, как показано на рис. 27, в. Нейроэпителиальные клетки в отвороте остались ориентированными, как у интактных эмбрионов, — по нормальям к полости желудочка. Клетки правой стороны, расположенные дорсальнее уровня, обозначенного на рис. 27, е черной стрелкой, образовали продольный валик из клеток, переориентировавшихся вдоль длинной оси эмбриона. Этот валик тянется вдоль всего мозга и на расстоянии 400 мкм назад от своего начала вызывает окклюзию нервной трубки (см. рис. 27, д). Просвет нервной трубки плотно смыкается, и оба пласта плотно прижаты друг к другу. Смыкание правого и левого пласта нервной трубки носит неравноценный характер. Подсеченный валик переориентированных клеток выгибается в просвет трубки, перекрывая мозговую полость (см. рис. 27, д). Переориентация пласта связана с его ретракцией в ростокаудальном направлении.

После рассечения клетки проходят три фазы, характеризующие реакцию пласта на рассечение. В первой фазе увеличивается длина клеток: они вытягиваются вдоль по нормальям пласта. Эта реакция возникает сразу после рассечения и продолжается 1–2–5 с. Затем клетки теряют связь с внешней или внутренней мембраной и вытягиваются вдоль направления ретракции пласта (рис. 28, а). Это состояние пласта продолжается 20–30 мин. Спустя 30–40 мин клетки отделяются от мембран и образуют отростки, которые вступают в контакт с соседними клетками (см. рис. 28, б). Через 2–3 ч большая часть клеток округляется, втягивая отростки. Клетки отделяются друг от друга и пласт деструктурируется.

РПа оказывает влияние как на правую половину мозга, так и на левую. На левой стороне мозга дорсальная часть отворота пласта сохраняет исходную ориентацию клеток, тогда как глубокие пласты клеток, расположенные под отворотом пласта, переориентированы так же, как клетки правой половины мозга. Первые переориентированные клетки левой половины мозга появляются на расстоянии 40 мкм от рострального полюса мозга. Группы этих клеток захватывают до 40% площади пласта на срезе и тянутся вдоль длинной оси эмбриона на расстояние 170–200 мкм, после чего сменяются клетками, ориентированными по нормальям к пласту мозга. На дальнейших стадиях развития переориентированные клетки этой области претерпевают такие же изменения, как и клетки правой стенки мозга.

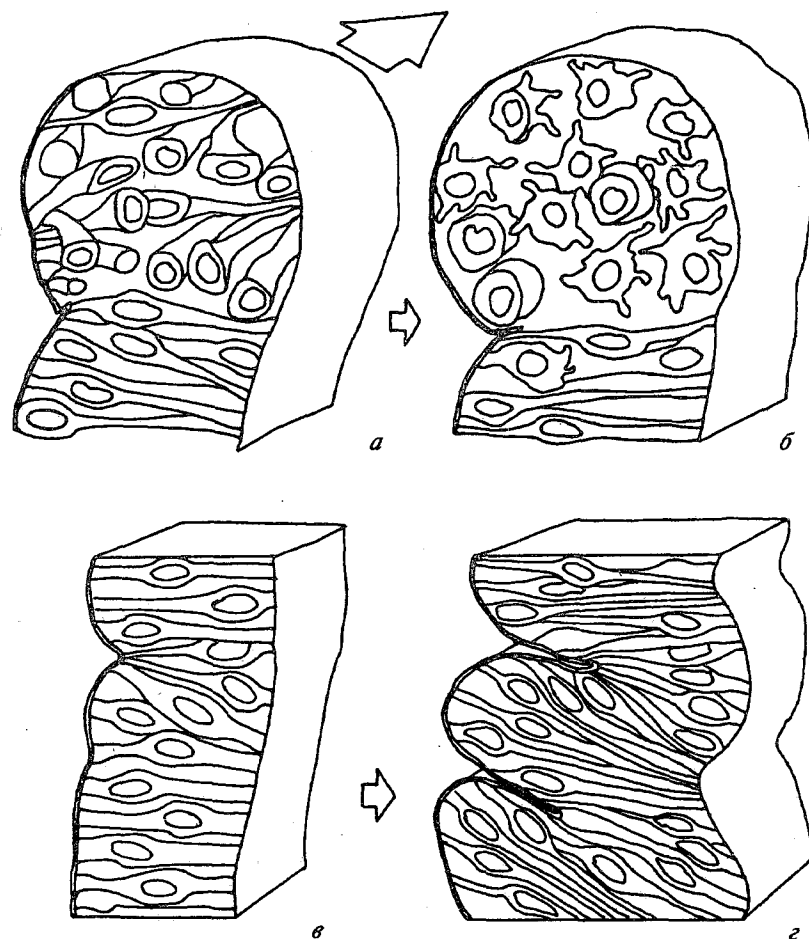


Рис. 28. Динамика изменения формы клеток при сагиттальном рассечении с поперечной подрезкой (а, б) и быстрая реакция пласта на сброс натяжений (в, г). Рисунки а и б соответствуют рассечению, сделанному по схеме на рис. 27 а: клетки в этом случае первоначально переориентируются (а), и приобретают шарообразную или амебоидную форму (б). На рисунках в и г представлены интактный пласт клеток (в) и его трансформация после сброса натяжений (г). При сбросе натяжений нейроэпителиальные клетки поляризуются, а пласт увеличивает свою складчатость

РПб осуществляли для анализа ростральных натяжений мозга. Для этого сечения наносили на расстоянии 350–400 мкм от рострального края мозга на уровне дорсальной области примордиального переднемозгового пузыря. Разрезы наносили, как показано на рис. 27, г. В этой серии опытов подсечение правой стенки мозга было незначительным и вызывало лишь небольшую

переориентацию клеток, расположенных каудальнее разреза (см. рис. 27, а). Валик из переориентированных клеток не образовывался. Большая часть клеток переориентировалась под углом 40–45° по отношению к нормальям пласта, и только 10–15% клеток развернулось вдоль длинной оси мозга, как при рассечениях типа РПа. Своеобразна реакция клеток левой стенки мозга, лежащих роstralнее уровня рассечения. Они переориентировались вдоль длинной оси мозга на расстоянии 140–180 мкм. Таким образом, оказались переориентированными клетки всей середины левой половины мозга роstralнее разреза. В то же время на правой стороне мозга роstralнее поперечного подсечения не выявлено переориентированных клеток. Не было их и в областях мозга каудальнее рассечения. Форма и просвет нервной трубки выглядят как в норме. Для контроля наличия сагиттального натяжения проводилась двойная подрезка пласта мозга в роstralной и каудальной зонах, как показано на рис. 27, и пунктиром. В этом случае должна была бы возникнуть переориентация клеток, если бы ее причины не были связаны с тангенциальными натяжениями мозга. Однако такой переориентации не выявлено, что доказывает реальность сагиттального натяжения.

Описанные выше разнообразные реакции пластов клеток были связаны с размерами и топографией рассечений. Однако несмотря на вариабельность деформации стенок мозга, реакции клеток оказались однотипными. Они были разбиты на две группы. В первую группу входят активные реакции клеток тех областей, натяжения которых сбрасывали в результате операций. Ко второй группе отнесены реакции структур, далеко отстоящих от зон рассечений и не участвующих в формировании снимаемого натяжения. Все типы рассечений показывают, что самой общей реакцией клеток на сброс натяжений является их удлинение. При этом клетки мгновенно удлиняются на 25–60% в направлениях нормалей к стенке мозга. Это удлинение клеток растягивающих зон является первичной реакцией при всех типах рассечений. Если размер раны небольшой и данная область мозга длительно переживает после операции, то после рассечения группы удлиняющихся клеток усиливают те изгибы пластов, которые были малозаметны у интактных эмбрионов (см. рис. 28 а, з). Таким образом, в растягивающихся участках пластов мозга клетки стремятся увеличить свою длину, что и может быть причиной тангенциальных натяжений стенок мозга.

Рассмотрим реакцию клеток, расположенных в области, непосредственно прилежащей к району рассечения. Здесь интересно проследить судьбы двух типов клеток: из растягивающей и растягиваемой зон мозга. Поляризованные клетки растягивающей зоны реагируют в зависимости от степени сброса натяжений. Если натяжения сняты полностью, то ориентация клеток полностью разупорядочивается. В случае частичного, но значительного

по объему рассечения, клетки первоначально переориентируются вдоль сохранившихся натяжений, а только потом деструктурируются и выходят из пласта. При незначительных размерах рассечения клетки переориентируются лишь частично. Сжимаясь, они указывают на направление действия доминирующего натяжения.

В растягиваемых областях мозга клетки ведут себя иначе. В большинстве случаев их тела быстро сжимаются в тангенциальном направлении и растягиваются по нормальям к пласту, однако это растяжение в растягиваемых зонах невелико. Поэтому клетки стягивают наружную и внутреннюю мембраны пласта по краю рассечения. Таким образом, реакция растягиваемых клеток является пассивной и зависит от зон поляризованных (растягивающих) клеток.

Рассмотрим реакции клеток, расположенных в пластах мозга, далеко отстоящих от районов рассечений. Для этого используем группу клеток, окружающую *sulcus intraencephalicus anterior* (S.I.A.), которая отделяет зачаток переднего мозга от примордиального промежуточного мозга. На поперечных срезах мозга эта область выглядит как бороздка на внутренней поверхности пласта (см. рис. 28, а). Клетки, расположенные в районе дна бороздки, укорочены на 10–20% по отношению к их первоначальной длине. Ядра клеток «дна» и клеток, окружающих бороздку, имеют овальную форму и равномерно распределены по всей толщине пласта. При рассечении далеко расположенных областей мозга снимается ряд тангенциальных натяжений, что отражается на клетках, расположенных вокруг S.I.A.

Реакция пласта характеризуется изменением формы клеток, локализацией ядер и переориентацией тел клеток по отношению к нормальям пласта (см. рис. 28, з). Клетки, расположенные в зонах «дна» бороздок, укорачиваются, а клетки, окружающие бороздку, удлиняются и саблевидно наклоняются по отношению к нормальям пласта, усиливая общую складчатость отдела. Одновременно со сжатием клетки и вытягиванием происходит быстрая миграция ядер внутри клеток. Ядра располагаются в клетках в соответствии с формой усиленных изгибов (см. рис. 28, з). Если изгиб пласта направлен в полость желудочка мозга, то ядра мигрируют к внутренней мембране, а если пласт выгибается наружу — то к внешней мембране. Опытами на холоду было подтверждено активное перемещение ядер внутри клеток. При температуре ниже 3°С ядра внутри клеток не мигрировали. Несмотря на сходство реакции ядер, поведение тел клеток различно. В участках пласта, выгнутых в полость желудочка мозга, клетки удлиняются, тогда как клетки «дна» бороздки укорачиваются в 1,5–2 раза по сравнению с интактным пластом (см. рис. 28, з). Наряду с поляризацией тел ядер с различными реакциями тел клеток происходит активная подвижка локальных групп клеток,

что было подтверждено опытами при пониженной температуре. В этих условиях движение клеток относительно друг друга не наблюдалось, что уменьшало складчатость отдела. Это радиальное движение клеток маскируется реакцией тел клеток и миграцией ядер. Однако учет всех факторов, влияющих на усиление изгибов пласта, показал, что доля радиальной подвижки в этом процессе составляет 10–15%.

Анализ результатов рассечений показывает, что в зависимости от размера и формы разреза трансформации пластов мозга носят различный характер. Выявленные различия в реакции нейроэпителиальных клеток на рассечения можно объяснить одновременно существующими разнонаправленными натяжениями пластов мозга. При этом любое рассечение мозга вызывает реакцию как близлежащих клеток, так и расположенных далеко от него. Таким образом, можно предположить существование сложной геометрии перекрывающихся натяжений, охватывающих весь мозг. Натяжения различаются по топографии, силе, направлению и времени существования. Следовательно, модель для объяснения реакции нейроэпителия должна обладать всеми перечисленными качествами, чтобы объяснить описанные наблюдения.

Предположим, что эмбриональный мозг обладает системой из трех типов натяжений (рис. 29), которые различаются по силе, размерам и форме. Самые мощные натяжения — поперечные, несколько слабее — сагиттальные и самые слабые — косые.

Рассмотрим, как можно объяснить реакцию нейроэпителиальных пластов при такой организации механических натяжений. В случае РIа мы полностью разрушаем сагиттальные, косые и большую часть поперечных натяжений (см. рис. 27, б). Такая обширная рана вызывает деформацию мозга. При РIа могут сохраняться только поперечные натяжения в самых каудальных отделах мозга.

Именно поперечные натяжения, не скомпенсированные сагиттальными, приводят к раскрытию нервной трубки в каудальных отделах примордиального заднего мозга. Этот процесс произошел бы естественным путем на стадиях 26–27, когда открылась бы полость IV желудочка. Но в силу того, что сагиттальные натяжения были полностью сняты и равновесие нарушилось, нервная трубка раскрылась на 3 сут раньше, чем это происходило в норме. Сходные изменения происходят и при РIа. Однако отличие РIа заключается в том, что рассечения происходят значительно rostro-laterally и затрагивают меньшую часть мозга. При этой форме сечения мозг сохраняет свою организацию недолго, но достаточно для того, чтобы сформировать парные валики вдоль краев сагиттального сечения (см. рис. 27, б). Это говорит о том, что сагиттальные натяжения исчезают не сразу, а постепенно. Таких отличий в форме и размерах сечений оказывается достаточно для ответных реакций задних отделов примордиального мозга.

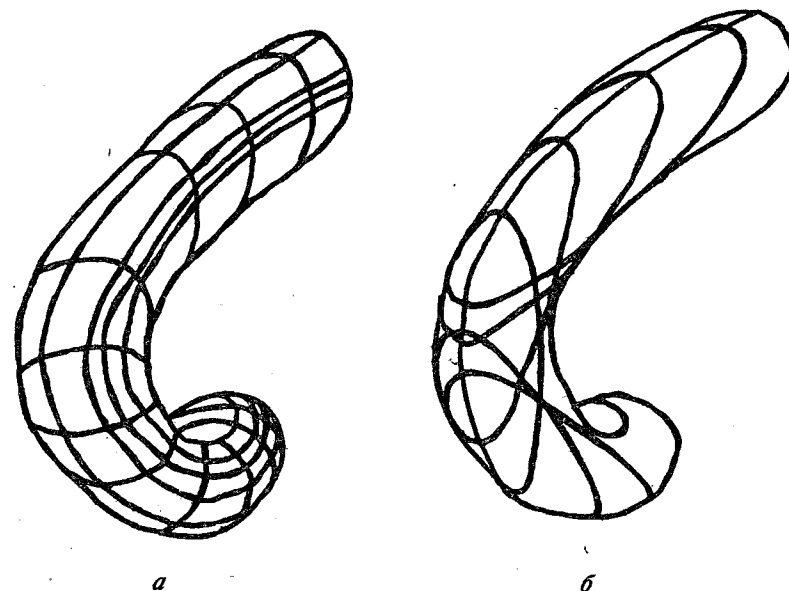


Рис. 29. Схема предполагаемой геометрии тангенциальных натяжений на стадии нервной трубки.

а — сагиттальные и поперечные натяжения, б — диагональные натяжения; совокупность их воздействий на мозг позволяет ему сохранять трубчатую форму

Фактически ответные реакции пластов задних отделов мозга не выявляются. По-видимому, сохранение части сагиттальных натяжений над теменным изгибом является достаточным условием для существования нормальной формы каудальных отделов заднего мозга.

Анализ рассечения типа РII позволяет сделать вывод о том, что в стабилизированной форме мозга существуют, по крайней мере, два взаимноперпендикулярных натяжения, которые уравнивают друг друга. При этом имеется некоторое минимальное количество клеток, лимитирующие наличие каждого отдельного натяжения. Если их остается совсем мало, как в первом типе рассечений, то натяжение исчезает, а если их лишь немногим меньше, нежели в норме, то непродолжительное время натяжение может существовать.

Рассматривая геометрию реакций нейроэпителиальных пластов во второй серии опытов, можно выявить существование более сложной системы натяжений. Поперечные натяжения снимались, как и в первой серии опытов, длинным продольным разрезом. Понятно, что если продольное и поперечное натяжение направлены друг к другу под углом в 90°, то при продольном рассечении необходима поперечная подрезка сагиттального натяжения. Поэ-

тому в ростральной части эмбриона делалось подсечение одного из пластов мозга на его правой дорсальной стороне, как показано на рис. 27, в. В результате рострального подсечения клетки переориентировались вдоль сагиттального натяжения, образовав круглый в поперечнике валик. Это свидетельствует о том, что сагиттальное натяжение действует вдоль всего мозга и релаксирует только при частичном подсечении. Необходимость подсечения для релаксации сагиттального натяжения указывает на замкнутость последнего. Действительно, только после рассечения линий замкнутого натяжения мы наблюдаем реакцию клеток, которые переориентируются вдоль снятого натяжения. Возможность морфологического проявления реакции связана с тем, что по краям продольного сечения натяжение сохранилось, но его целостность утрачена. Для пояснения этой реакции клеток можно предложить пример с натянутой резинкой. Если натянутую резинку разрезать посередине, то она сожмется, но увеличится в сечении. Сходным образом реагируют пласты мозга на частичное рассечение натяжения. Рассечение линий сагиттального натяжения на уровне примордиального среднего мозга приводит к ретракции пласта вдоль оси мозга и переориентации клеток (см. рис. 28, б). Второй конец замкнутого натяжения переходит через теменный изгиб мозга и проходит через середину пласта левой половины мозга (см. рис. 29). Поэтому клетки интактной стороны мозга переориентируются в ростокаудальном направлении при подсечении противоположной стороны мозга. Возвращаясь к аналогии с резинкой, можно сказать, что клетки, образовавшие валик, переориентировались каудальнее разреза, а клетки левой половины мозга вытянулись вдоль ростральной половины натяжения. Переориентация клеток при таком типе сечения является необратимым процессом, так как нейробласты теряют связь с одной, а затем и с другой мембраной (см. рис. 28, а). Таким образом, из описанного типа реакций пластов мозга становится понятно, что сагиттальное натяжение замкнуто и несимметрично относительно оси мозга (см. рис. 29).

Сходные результаты получены и при РПб. Единственное отличие этих натяжений заключается в том, что вокруг района рассечения есть клетки, расположенные под углом 45–40° к нормальным пласта. В некоторых случаях они составляют большую часть изменивших свою ориентацию клеток. По всей видимости, эти клетки ориентированы вдоль косых натяжений, геометрия которых показана на рис. 6, б. Думается, что это самые слабые и существующие наиболее длительное время натяжения. На это указывает изменение топографии мозга в развитии, которое невозможно без диагональных, замкнутых натяжений.

Таким образом, в каждом случае рассечения мозга мы имеем дело с тремя типами тангенциальных натяжений, от взаимодействия которых зависит конкретная реакция нейроэпителиального

пласта. Натяжения различаются по топографии на поперечные, сагиттальные и диагональные (косые). Кроме топографии, они могут отличаться по размерам, силе и времени жизни. Можно предположить, что комбинация из семи переменных величин является достаточной для создания любого типа натяжения в эмбриональных пластах. С другой стороны, комбинация из трех равнонаправленных сил является достаточным и формально непротиворечивым комплексом механических явлений, позволяющих объяснить реакции на рассечение нейроэпителиальных пластов мозга.

Сравнение картины реакций клеточных групп на рассечение мозга позволило выявить возможные причины возникновения натяжения и изменения формы эмбрионального мозга. Наиболее важна реакция клеток, расположенных в областях, вызывающих тангенциальные натяжения (растягивающие зоны). Непосредственно после рассечения тела клеток этих зон вытягиваются по нормальным к пласту (см. рис. 28, з). Поляризация клеток этих же областей в норме является активным процессом, который как раз и формирует тангенциальные натяжения (Савельев, 1987 а). Если это натяжение сбрасывается, клетки продолжают вытягиваться и удлиняются на 25–30% от их размера в интактном мозге. Иначе ведут себя клетки, выстилающие бороздки и изгибы пластов мозга. При снятии натяжения они стремятся сжаться, что усиливает складчатость (см. рис. 28, в, з). Сходные результаты были получены и на морских гидроидах (Belousov, 1973). Подрезка пластов клеток гидроидов вела к укорачиванию тел клеток, ориентированных по нормальным к пласту. Это вызывало общее удлинение свободного от натяжения пласта. Одновременно возникала складчатость, соответствующая будущей форме гидроида. Данные опытов показывают существование общих механизмов формообразования как у гидроидов, так и в мозге хвостатых амфибий.

Таким образом, можно предположить, что влияние тангенциальных натяжений на изменение формы зачатков носит ингибирующий характер. Разнонаправленные натяжения стабилизируют форму зачатков и интегрируют процесс формообразования. При частичном ослаблении одного или нескольких натяжений может возникнуть локальная деформация пласта в интактном мозге, а снятие натяжений в опыте приводит к быстрым трансформациям всего мозга. С этих позиций становится ясно, что чем проще и однородней форма, тем сложнее должна быть геометрия натяжений.

Существенное влияние на формообразование оказывает движение ядер внутри клеток мозга. Первым связь положения ядер с изменением формы клеток отметил Гурвич (Gurwitsch, 1914, 1927); это позволило ему сформулировать одну из первых гипотез формообразования. По-видимому, объединение подходов, предложенных Гурвичем, с моделью эпителиальных морфогенезов (Белинцев и др., 1985 а, б) дает возможность подойти к решению проблемы

эмбрионального формообразования. В настоящей работе обнаружена прямая связь между тангенциальными натяжениями пластов мозга и локализацией ядер в клетках. При рассечении пластов мозга и частичном снятии тангенциальных натяжений ядра клеток смещались к наружной или внутренней мембране в соответствии с формой изгибов пласта. В целом движение ядер в рассеченных пластах сходно с их миграцией в интактных пластах, прогнозирующих будущую форму мозга я (Савельев, 1985).

Таким образом, можно выделить целостный комплекс свойств, характеризующих механические процессы в развивающейся нервной системе. Самым важным является то, что в нейроэпителиальных пластах головного и спинного мозга существуют механические напряжения. Они становятся источником формирования, развития и поддержания формы головного мозга. По сути дела, вся его трехмерная организация возникает благодаря системе внутрипластовых натяжений. Как было показано в экспериментах по рассечениям пластов мозга, даже небольшое изменение комбинации натяжений необратимо изменяет форму мозга и его развитие. Не менее принципиальное значение имеет тот факт, что натяжения пластов мозга обусловлены изменением формы клеток — поляризацией. Источник механической напряженности нейроэпителиальных пластов сформирован в самих пластах и регулируется по системе обратной связи: поляризация — натяжение — торможение поляризации — сброс натяжения — поляризация. По существу, перед нами биохимическая саморегулирующаяся и саморазвивающаяся пространственная структура, которая при введении одного или двух переменных параметров пролиферации и миграции может обусловить любую форму мозга.

Производными этих свойств являются характеристики самих механических натяжений в мозге. Замкнутые сами на себя натяжения различаются по силе, причем эти различия коррелируют с его размерами количеством клеток, вовлеченных в данную механическую систему. Чем натяжение больше, тем оно короче, чем слабее, тем больше структур мозга вовлечено в его формирование. Самые маложивущие натяжения перехватывают нервную трубку поперек, но они и являются наиболее сильными. Именно с их помощью открывается полость IV желудочка и формируется воронка промежуточного мозга. Механические натяжения пластов различаются по времени жизни. И это связано с размерами и силой натяжения. Чем тангенциальное натяжение сильнее и короче, тем меньше времени оно существует в развивающемся мозге. В противоположном случае слабое натяжение может продолжаться довольно долго. Эти свойства натяжений можно выразить формулой

$$\frac{FL}{t} = \text{const},$$

где  $F$  — сила натяжения,  $L$  — его линейные размеры,  $t$  — время существования. По-видимому, это соотношение относительно постоянно в различных типах натяжений. Результаты экспериментов пока согласуются с этой точкой зрения.

Механические натяжения являются результатом относительно кратковременной поляризации нейроэпителиальных клеток и не могут сохраняться продолжительное время. В предыдущих разделах настоящей главы уже говорилось о том, что в процессе развития мозга механические натяжения исчезают. Понятно, что это провизорные образования, которые необходимы только на определенных этапах формообразования. Проверить периоды механочувствительности можно как микрорассечениями, так и путем создания кратковременных искусственных напряжений в различных отделах мозга и нервной пластинки. Если клетка обладает механочувствительностью, то она изменит свою судьбу, чем покажет наличие механозависимого периода эмбрионального развития головного мозга. Этому посвящена следующая глава книги.

### 3.3 МЕХАНОЗАВИСИМЫЕ ПЕРИОДЫ РАЗВИТИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Рассматривая роль механических процессов в развитии нервной системы, нельзя не обратить внимание на то, что изучаемые события происходят в различно организованных ее зачатках. На стадии бластулы, когда появляются первые зачатки нервной системы, клетки-предшественники практически не отличаются от своего окружения. Поэтому механические процессы на этой стадии объединяют все клетки, независимо от их дальнейшей судьбы. Понятно, что механические натяжения, существующие на бластуле, отличаются от механических взаимодействий на стадии гаструляции. Начало инвагинации хордомезодермы вызывает к жизни новую систему механических взаимодействий (рис. 30, б). В этом случае в зародыше формируется региональная система натяжений, которая несет в себе тканеспецифические характеристики. Нейруляция, начавшись с морфологического выделения нервных валиков, вносит новую гетерогенность в организацию механических натяжений зародыша. По сути дела с началом нейруляции возникает органоспецифическая система механических взаимодействий между клетками. После замыкания нервной трубки начинается новый комплекс взаимодействий, характерных для механически изолированной нервной системы (см. рис. 30, г).

Таким образом, от появления клеток-предшественниц до первичной нейральной дифференцировки существует по меньшей мере четыре периода различной организации механических натяжений. Чем же принципиально отличаются друг от друга эти периоды в механическом отношении?

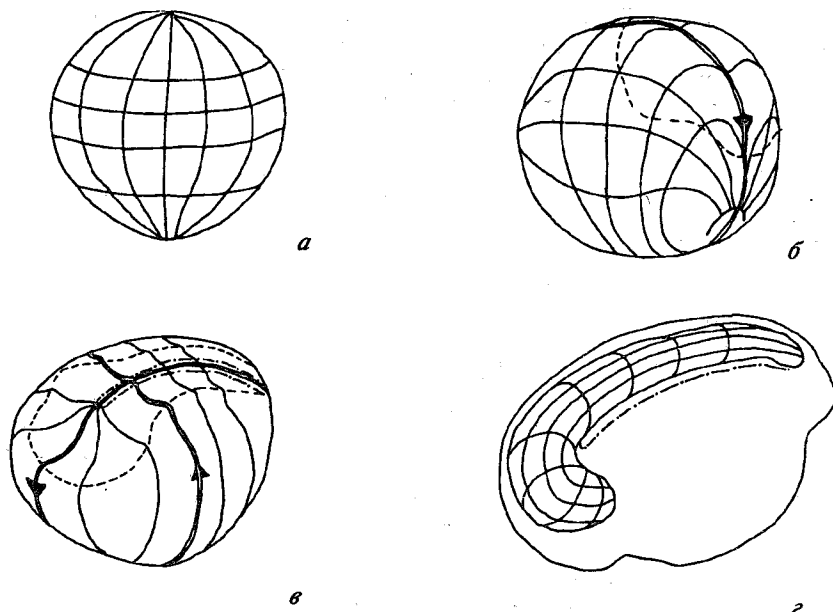


Рис. 30. Схемы линий механических натяжений на различных стадиях эмбрионального развития нервной системы.

*а* — радиальная система натяжений на стадии поздней бластулы, *б* — изменение системы натяжений на стадии ранней гаструлы; при гаструляции создается доминирующее натяжение вдоль оси тела, которое заменяет радиальную симметрию бластулы на двустороннюю симметрию гаструлы; *в* — организация линий натяжений на нейруле; ростокаудальную организацию натяжений формирует киль нервной пластинки, который плотно соединен с хордомезодермой; *г* — линии натяжений на нервной трубке, подробнее см. рис. 29. Пунктир — очертания нервной системы, пунктир с точками — зоны срастания кила с хордомезодермой, двойные линии — доминирующие натяжения

На стадиях бластулы существует дорсовентральная гетерогенность зародыша, выражающаяся в скоростях пролиферации, и, как следствие, в размерах клеток. Зародыш шарообразен и не имеет выраженной оси симметрии. Поэтому возникающие на средней бластуре натяжения являются радиально симметричными (см. рис. 30, *а*). Механическая гетерогенность существует только в дорсовентральном направлении, анимальный и вегетативный полюса зародыша являются центрами схождения линий натяжений. По-видимому, такая система организации натяжений играет важную роль в процессе дробления зародыша. В настоящее время существует модель, удачно описывающая механизм геометрически безукоризненного периода дробления яйцеклетки вплоть до стадии бластулы (Bjerknes, 1986). В основе этой модели лежит предположение, что целью дробления является сброс напряжений, которые возникают в результате сборки

системы цитоскелет-контакты между делящимися клетками. Поскольку известно, что сборка механически напряженной системы цитоскелет-контакты носит долготно-широтную упорядоченность (см. рис. 30, *а*), то и организация деления клеток будет ее повторять. Радиальная симметрия механических натяжений-сжатий нарушается после возникновения губы бластопора.

В момент начала гаструляции формируется ось симметрии зародыша. Она маркируется ростокаудальным натяжением поверхности зародыша при формировании дорсальной губы бластопора (см. рис. 30, *б*). Ростокаудальное натяжение вносит новую гетерогенность в систему радиальносимметричных натяжений бластулы. Оно не является чем-то новым по пространственной организации. Его предшественники существуют и на стадии бластулы. При формировании дорсальной губы бластопора одно из радиальных натяжений, совпадающее с осью зародыша, усиливается, создавая двустороннюю симметрию эмбриона. Продольное натяжение ткани принципиально изменяет существовавшую радиальную систему натяжений. В основе изменений лежит "размывание" дорсальной и вентральной точек схождения линий натяжения, характерных для радиальной симметрии (см. рис. 30, *б*). В возникшей ситуации меридиональные линии натяжений сходятся не в одной точке, а в довольно обширной зоне, которая увеличивается по мере гаструляции.

К моменту завершения гаструляции между хордомезодермой и зачатком нервной системы происходит ряд индукционных и механических взаимодействий. До настоящего времени природа индукционных взаимодействий не ясна (Михайлов, 1986). Нельзя исключать наличия в ней и механического компонента. Тем более, что в районе кила нервная пластинка и хордомезодерма срастаются очень плотно. По-видимому, в зоне срастания формируется зона максимальной механической напряженности (см. рис. 30, *в*). По сути дела, после размывания точки схождения линий натяжения, отражающих радиальную симметрию раннего зародыша, и срастания нейроэктодермы с хордомезодермой определяется форма нервной пластинки. Она отражает сложившуюся механическую ситуацию на поверхности зародыша.

В зоне будущего заднего моста нейроэктодерма плотно соединена с хордомезодермой. Поверхностные напряжения имеют жестко закрепленную линию схождения — киль нервной пластинки. В головном регионе картина иная. Тут нет кила и натяжения долготной направленности сходятся в круглом поле, которое перенатянуто в направлении задней части нервной пластинки (см. рис. 30, *в*). Это приводит к тому, что головной регион нервной пластинки шире и представляет собой эллипс, плавно переходящий в спинной мозг. Можно допустить, что описанная система гетерогенной организации механических напряжений на поверхности

поздней гаструлы является, наряду с индукционными взаимодействиями, причиной начала нейруляции. К этому выводу приводят данные о том, что не вся нейрализующаяся нейроэктодерма вступает в контакт с хордомезодермой.

После запуска механизмов нейтрализации происходит поляризация нервных клеток в нервной пластинке. Создаются органоспецифические натяжения нервной пластинки. Изменение формы клеток приводит к замыканию нервной пластинки в нервную трубку. Во время всего периода нейруляции усиливаются ростокаудальные натяжения. Они не только определяют двустороннюю симметрию зародыша, но и вызывают тензорные боковые сжатия нервной пластинки, что многократно использовалось в моделях развития, объясняющих феномен нейруляции (А. Jacobson, 1981). После смыкания нервной трубки ее механическая система натяжений отделяется от таковой остального зародыша. Разделение этих систем не полное, и некоторая зависимость сохраняется и на более поздних этапах развития. В результате поляризации клеток нервная трубка создает сложную систему напряжений, описанных выше. Эта система непрерывно усложняется и разбивается на ряд структуроспецифических механических систем, которые приводят к образованию таких отделов, как продолговатый и задний мозг, средний мозг и парные выпячивания пузырей среднего мозга. По мере выхода в дифференцировку нейроэпителиальных клеток механические натяжения ослабевают, а затем и исчезают совсем.

Проведенный краткий обзор развития механических систем клеток-предшественниц, нейроэпителия, нервной пластинки и нервной трубки показывает, что существуют преемственность и дискретность этих процессов. Так, до стадии средней бластулы механические натяжения, по-видимому, интегрируют пролиферацию клеток, действуя через внутри- и межклеточную систему «цитоскелет-контакты». После образования бластоцеля система натяжений выходит на пластовый уровень. Единицей взаимодействий становится не отдельный внутриклеточный цитоскелетный пучок и два мембранных контакта, а целая клетка. Она может получать и передавать информацию, содержащуюся в системе эмбриональных натяжений. Описанный переход к клеточной механочувствительности должен отразиться на развитии клеток-предшественниц. До перехода к нейруляции системы натяжений развиваются эволюционно, плавно переходя друг в друга (см. рис. 30, а-в). После начала нейруляции возникает принципиально новая механическая ситуация в развитии зародыша. В этом случае мы, по-видимому, также имеем переходный период, когда одна система натяжений заменяется другой. Еще одна смена системы натяжений происходит после смыкания краев нервной пластинки. В нервной трубке натяжения принципиально отличаются от натяжений на нервной пластинке. Наличие периодов относительно резкой смены систем механических натяжений подразумевает

существование чувствительных и нечувствительных этапов развития нервной системы. Для проверки этих представлений была разработана и проведена цепь экспериментов.

В качестве модельных объектов были использованы зародыши хвостатых и бесхвостых амфибий: шпорцевой лягушки, сибирского углозуба, испанского тритона и остромордой лягушки. Зародыши исследовались от стадии ранней бластулы до стадии формирования нервной трубки включительно. На каждой стадии создавались искусственные локальные системы механических натяжений-сжатий, как было описано раньше (Савельев, 1988). В основе такого механического воздействия лежит перенатяжение поверхности бластулы, гаструлы, нейрулы или нервной трубки при помощи двух стеклянных иглол толщиной 10–20 мкм. Иглол при помощи микроманипулятора погружались в поверхность зародыша, а затем сдвигались или раздвигались на 1/10–1/15 расстояния между ними (рис. 31). Расстояние между ними обычно составляло от 100 до 400 мкм. Предварительные эксперименты показали, что оптимальным является растяжение поверхности зародыша под углом в 45°С по отношению к оси тела в течение 7–12 мин. После растяжения иглы возвращали в исходное положение и извлекали из зародыша. Во время растяжений зародыши находились в растворе Гольтфретера, и у них сохранялась одна или две яйцевых оболочки. После операции зародыши жили от 20 ч до 14 сут, а по наличию или отсутствию аномалий в развитии определяли существование чувствительных и нечувствительных к механическим натяжениям стадий развития. Для контроля использовали введение игл без растяжения или сжатия.

Эксперименты показали, что на механочувствительных стадиях проведенного краткосрочного воздействия достаточно для изменения развития зародыша. Весь период формообразования нервной системы расчленился на ряд механочувствительных и нечувствительных к натяжениям стадий (см. рис. 31). Из приведенного графика видно, что механочувствительностью к растяжениям поверхности зародыши амфибий обладают только в определенные периоды развития. Эти периоды чередуются с этапами, не чувствительными или малочувствительными к механическим натяжениям. Поверхность зародыша, растягиваемая на стадиях ранней гаструлы, ранней бластулы, ранней нейрулы, не реагирует на проведенное воздействие. Некоторое снижение механочувствительности наблюдается и в период замыкания нервной трубки. Надо отметить, что представленная схема довольно условна, так как объединяет сведения о механочувствительных периодах развития у четырех видов амфибий. Однако несмотря на видовое разнообразие реакций, общая схема чередования чувствительных и нечувствительных к механическим натяжениям периодов сохраняется.

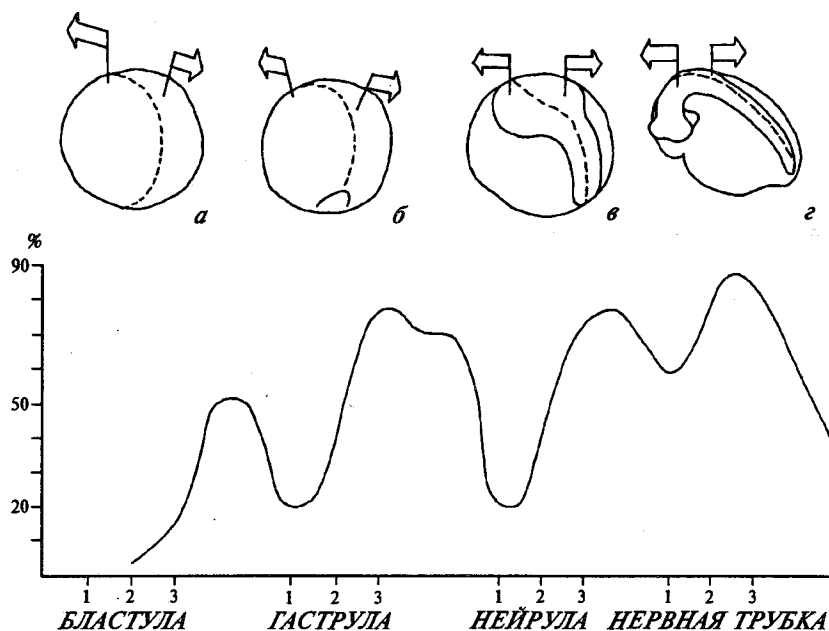


Рис. 31. Периоды механической чувствительности нервной системы к кратковременным растяжениям.

В поверхность зародыша вводили иглы и растягивали поверхностный слой клеток, как показано на верхней части рисунка. Затем иглы извлекались и зародыш инкубировался в течение 48 ч. По результатам опытов вычислялся % животных, имевших аномалии развития — на графике по вертикали, по горизонтали — стадии развития. Цифрами обозначены стадии: 1 — ранняя, 2 — средняя, 3 — поздняя

Сопоставление этих периодов развития позволяет сделать вывод о том, что повышение механо чувствительности совпадает с моментами изменений полей натяжений развивающегося зародыша. Так например, перед гастрულიей механо чувствительность зародыша снижается. В момент начала гастрულიи она возрастает, а затем плавно снижается почти до нуля. Такая же схема событий сохраняется и при начале нейрулии (см. рис. 31, в). По данным Белоусова с соавт. (1974), выявленные в этих опытах периоды механо чувствительности совпадают по времени с этапами смены полей механических натяжений в развитии зародышей амфибий.

Полученные сведения позволяют сделать два основных вывода. Во-первых, периоды механической чувствительности клеток в развитии зародыша существуют довольно ограниченный период времени. Максимальная механо чувствительность возникает только в периоды смены полей натяжений в зародыше, хотя поля механических натяжений сохраняются постоянно от стадии средней

бластулы до образования первичного паттерна нервных связей в эмбриональном головном мозге. Во-вторых, существование нечувствительных к механическим натяжениям этапов развития, на которых, тем не менее, механические натяжения обнаружены, говорит о программированном поведении клеток. Можно допустить, что клетка получает механическую информацию в период механо чувствительности. Затем она реализует ее в виде тех или иных клеточных реакций, которые формируют новую систему напряжений тканей зародыша. Возникшая новая система напряжений создает иную механическую ситуацию по сравнению с первоначальной. Эту информацию клетка может считывать на следующей стадии чувствительности к механическим натяжениям.

Представленные данные охватывают период механо зависимо го развития зародышей амфибий. С их помощью проводится попытка объяснить причину интегрированного и взаимозависимо го развития зародыша на ранних этапах онтогенеза. Основной вывод заключается в том, что в качестве механизма интеграции эмбрионального формообразования нервной системы выступают механические натяжения. Для их существования нужны только поляризация клеток и их механо чувствительность. Если поляризация клеток хорошо известна в развитии, то механизмы перевода механической информации, содержащейся в натяжениях-сжатиях, на клеточный уровень не ясны. Этому вопросу посвящена следующая глава этой книги.

### 3.4 ПРИРОДА МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НЕЙРОЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Чувствительность клеток к механическим воздействиям является одним из фундаментальных свойств организмов. Без возможности восприятия механических раздражений невозможно представить себе никакие взаимодействия между клетками или организмом и внешней средой. Каждое, особенно высокоорганизованное животное постоянно трансформирует механическую энергию в электрическую, что является необходимым условием его существования. Механо чувствительность лежит в основе ощущения движения. Ни рост растений, ни одно движение животного не происходит без трансформации механической энергии в электрическую. Очень важна механо чувствительность для контроля за органами, расположенными в полости тела. С ее помощью определяется наполнение кишечника, желудка, легких, сердца, мочевого пузыря или давление крови. Причем гладкая мускулатура и эндотелиальные клетки обладают собственной механо чувствительностью, чем формируют основу для авторегуляции давления крови (Lansman et al., 1987). Не менее универсальна механо чувствительность к осмотическому давлению, которое постоянно изменяется, чем заставляет клетку раздуваться или сжиматься

в соответствии с этими изменениями. Возникающие в таких условиях изменения в натяжениях мембраны клеток сцеплены с рядом чувствительных ионных каналов, которые могут создавать внешний сигнал (Sachs, 1987).

По-видимому, сходным образом изменение размеров клеток влияет на механическую ситуацию на ее поверхности. Если клетка увеличивается в размерах, сигнал может сформироваться внутри клетки за счет специфической проницаемости механозависимых ионных каналов. Возможно, что таким образом информация доходит до ядра, регулирует метаболизм или давление клеток. Таким образом, возникли предположения, согласно которым в основе механочувствительности лежит ионная проницаемость мембран. Эти предположения дополняли наши знания о ионных каналах, чувствительных к электрическому напряжению и лигандам, представлениями о механозависимых ионных каналах (Edwards, 1983). Первое сообщение о существовании механозависимых ионных каналов было сделано в работах, в которых исследовались скелетные мышцы цыпленка в культуре ткани (Guharay, Sachs, 1984). В дальнейшем механоактивируемые ионные каналы были найдены в прямых опытах в клетках различных типов у амфибий, рептилий, млекопитающих, в протопластах дрожжей и растений (Sachs, 1988). Было показано, что использование механочувствительными ионными каналами механической энергии для создания электрохимических градиентов через клеточную мембрану является фундаментальным свойством для таких физиологических процессов, как слух и осязание.

Во взрослом организме механочувствительные ионные каналы, по-видимому, являются дополнительным механизмом, контролирующим стрессовые механические воздействия, хотя некоторые авторы подчеркивают ведущую роль механических воздействий на возобновление кожи и ее реакции на регенерацию (Ryan, 1989). Исследование хрусталика лягушек, эндотелия сосудов крыс, клеток нейробластомы и дрожжей показало, что механоактивируемые ионные каналы могут быть проницаемы как для катионов, так и для анионов (Gustin et al., 1988; Sachs, 1988). В кишечном и почечном эпителии были обнаружены механоактивируемые калиевые каналы, которые могут действовать как прямые осморецепторы. Возможно, калий-селективные ионные каналы могут удалять воду из выпуклых клеток (Sachs, 1988). Для хрусталика и эпителия стенок сосудов специфичным является пропускание механочувствительными ионными каналами всех типов катионов, но и в других отношениях они являются неселективными (Lansman et al., 1987). По мнению этих авторов, механозависимые ионные каналы не могут быть осморегулирующими, но при их помощи возникает поток кальция, который используется как вторичный мессенджер.

Наряду с проницаемостью через механозависимые ионные каналы кальция, калия, натрия, были обнаружены и хлорные каналы

(Demarest et al., 1989), причем в почках и трахее было выявлено три типа таких каналов (Landres et al., 1989). Кроме перечисленных анионов и катионов через механочувствительные ионные каналы могут проникать и другие ионы. Вполне допустимо, что механозависимая проницаемость клеточной мембраны к ионам носит неспецифический характер и может осуществляться большим спектром как простых, так и сложных ионов.

Механозависимые ионные каналы были обнаружены не только в клетках эпителиальных тканей, в клетках мышц и ооцитах. Они были найдены в нервных клетках (Morris, Sigurdson, 1989). Их удалось выявить в клетках нейробластомы, в нейронах улитки и в культуре нейронов из дорсальных рогов ганглиев эмбрионов крысы. При анализе механочувствительности нервных клеток было установлено, что ведущую роль в механопроницаемости мембраны играет новый трансмиттер — оксид азота (NO). Для нейронов улитки оказались характерными механозависимые ионные каналы, проницаемые для калия и кальция. Надо отметить, что у нейронов улитки были обнаружены как механоактивируемые, так и механоинактивируемые ионные каналы (Morris, Sigurdson, 1989).

На основании этих факторов была построена вероятностная модель проницаемости мембраны клетки при механическом воздействии (Sachs, 1987, 1988). Согласно этой модели, механозависимые ионные каналы в мембране клетки заблокированы цитоскелетными пучками, которые расположены под мембраной. Пучки цитоскелетных элементов расположены между каналами, чисто механически блокируя их. При исчезновении цитоскелетного блокирования ионные каналы открываются. Это может происходить при растяжении поверхности мембраны или при увеличении объема клетки. Понятно, что если будет растянут участок клетки, то возникает внутриклеточный градиент ионов или изменится заряд мембраны. Затем, по мнению авторов (Ryan, 1989), происходит ингибирование протеаз, что влияет на адгезивный комплекс и определяет межклеточные взаимодействия. С другой стороны, проникновение ионов в клетку может активировать вторичные мессенджеры и изменять ее метаболизм.

Таким образом, существует способ передачи информации, содержащейся в механических натяжениях пластов, на клеточный уровень. В основе чувствительности отдельных клеток к механическим воздействиям лежат механоактивируемые и механоингибируемые ионные каналы. При растяжении или сжатии клеток проницаемость этих каналов изменяется. В клетку начинают поступать или перестают поступать ионы тех или иных элементов. В любом случае это приводит к изменению состояния клетки. На это изменение клетка реагирует специфическим или неспецифическим образом. Интеграция на уровне пласта механозависимой реакции клеток вызывает к жизни новое состояние пласта клеток.

Этот процесс носит нелинейный характер. По-видимому, механозависимые ионные каналы динамично изменяются в онтогенезе нервной системы. Возможно, что в периоды нечувствительности зародыша к механическим натяжениям происходит замена ионных каналов. Тем не менее, наличие механочувствительных ионных каналов показывает принципиальную возможность интегрировать поведение клеток в нейроэпителиальных пластах с помощью механических натяжений. Они охватывают весь зародыш, чем при наличии механозависимых ионных каналов можно объяснить как синхронизированное, так и индивидуальное поведение клеток.

#### Глава 4

### МЕХАНИЗМ КОНТРОЛЯ И ДЕТЕРМИНАЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Для развития нервной системы, как и для любого органа, правомерен вопрос о том, чем в конечном счете определяется эмбриональная судьба клетки. Как говорилось в начале книги, существуют два подхода к процессам развития: детерминационный и регуляционный. В развитии нервной системы оба присутствуют в равной степени. Между ними нет противоречий. Они встречаются в развитии каждой закладки или системы. Периоды детерминационного развития сменяются регуляционными этапами онтогенеза или сосуществуют одновременно. Проблемы возникают при переоценке роли одного из процессов в развитии. Однако независимо от того, с каких позиций рассматривать развитие нервной системы, необходимо ответить на два комплекса вопросов, которые определяют сущность развития. Во-первых, не ясно, что заставляет клетку определенного региона нервной системы вести себя в соответствии со своим положением; каким образом одинаковые клетки нейроэпителиального пласта запускают разные генетические программы развития. Неизвестно, по какой причине в клетках одной зоны мозга экспрессируются одинаковые гены, а в клетках соседней, прилежащей к ней области, экспрессируются совершенно иные комплексы генов. При этом глубокой морфологической границы между регионами зачастую нет. Наблюдаемые явления можно объяснить, допустив, что судьба клетки детерминируется надолго, начиная с нейруляции почти до окончания дифференцировки.

После детерминации, на ранних стадиях развития, поведение клетки изменяется в соответствии с эндогенными факторами — поэтапной экспрессией цепочки генов, обеспечивающих процесс дифференцировки. Паттерн их экспрессии соответственно регулирует физиологию клетки, кодирует программу миграции и окончательный тип дифференцировки. Однако в этих рассуждениях есть некоторые противоречия. Клетки в процессе развития должны узнавать об изменениях в развитии и корректировать свою судьбу. Если бы они не получали информации о состоянии окружающих клеток, то гибель одной-двух клеток приводила бы к выпадению или недоразвитию целых областей головного мозга. Поскольку подобных явлений не наблюдается, а гибель клеток в развитии головного мозга достаточно высока, необходимо допустить существование информационных сетей и возможность их влияния

на экспрессию генов. Следовательно, во второй комплекс вопросов входит проблема динамичной передачи информации между клетками.

До сих пор непонятно, каким образом клетка узнает об изменениях, происходящих в органе во время развития. Связи клетки должны быть многочисленны, так как каждая клетка нуждается в относительно полной информации о событиях, происходящих в других клетках. Эти связи должны быть оперативными и распространяться на большие расстояния. Клетки должны получать информацию о событиях, удаленных от них на расстояния, которые в сотни и тысячи раз превосходят их собственные размеры. Самое сложное состоит в том, что перечисленные параметры должны быть индивидуальны для каждой клетки или для небольших клеточных групп.

Таким образом, каждая клетка должна обладать как позиционной, так и динамической информацией. Это разделение довольно условно, поскольку обе характеристики взаимосвязаны и определяют существование друг друга. Понятно, что реализация обоих параметров осуществляется через экспрессию генов. Используя эти понятия, можно определить информационный цикл, приводящий к изменению состояния клетки или направления дифференцировки. Клетка, обладающая определенной информацией, реализует ее через направленную экспрессию генов, чем создает новую динамическую ситуацию в развивающемся зачатке. Новая морфологическая ситуация передается клетке, и происходит корректировка направления экспрессии генома. По-видимому, эта ситуация повторяется в развитии головного мозга неоднократно.

Следовательно, необходимо допустить некоторую дискретность получения информации клеткой. Дискретность поступления позиционной информации может быть осуществлена несколькими способами. В наиболее простом случае можно допустить наличие в каждой клетке внутренних часов (Satch, 1985). По этим часам клетка «включает» или «выключает» чувствительность к внешним сигналам. Такими часами могут служить автоколебательные химические реакции в цитоплазме или какие-либо другие периодические внутриклеточные процессы.

Возможен и другой путь дискретного восприятия внешних воздействий. Если мы допустим, что существует порог чувствительности к внешним воздействиям, то на сигналы ниже порогового уровня клетка не будет реагировать. Сделав такое допущение, мы должны предусмотреть ее первичную реакцию на снижение уровня внешнего сигнала. В противном случае клетка все время будет возбуждаться одним и тем же сигналом. Например, как описано в гл. 1, клетка нейроэпителлия поляризуется во время нейруляции — вытягивается вдоль по нормальям к пласту. При получении внешнего сигнала клетка должна остановить поляризацию. Однако, если полученный внешний сигнал неспецифичен,

то в ответ на него клетка должна первоначально неспецифически ответить, что ослабит внешнее воздействие ниже порогового уровня ее чувствительности. Только после такого ответа клетка может переходить к реализации информационного содержания сигнала. В этом примере рассмотрен вариант, в котором мы имеем дело с довольно общим для всех клеток сигналом и столь же неспецифическим ответом на него.

Таким образом, каждая клетка должна получать информацию о том, что ей делать в конкретные периоды времени. По-видимому, в простом сигнале должна быть интегрирована информация о том, где клетка находится и что ее окружает. Одновременно сигнал должен поступать от всего зачатка дискретными порциями, индивидуально для каждой клетки и быть неспецифическим.

Попробуем использовать этот набор условий для анализа применимости различных подходов к формообразованию мозга. В основе наиболее распространенных моделей лежат явления хемотаксиса (Ramon-y-Cajal, 1960), хемосродства, градиентов морфогенов (Crick, 1970), молекул клеточной адгезии (Edelman, Thiery, 1985), диффузионных и временных морфогенов (Вольперт, 1982; Meinhardt, 1986; Спилов, 1989). Однако прямых подтверждений ни одна из перечисленных гипотез не получила. Интересно отметить, что для всех моделей характерно несоответствие двум-трем пунктам из перечисленных выше условий морфогенеза. Наиболее труднопреодолимыми для всех моделей являются следующие параметры: информация о положении клетки, ее окружении и индивидуальность получаемой информации. Например, допустим, что в эпителиальном пласте из точки *M* движется диффузионный сигнал (рис. 32). Информация, содержащаяся в нем, запускает клеточную дифференцировку. Причем в рассматриваемом участке клеток ровно столько, сколько нужно для формирования целостной структуры. В этот момент происходит гибель одной клетки *P*. Эта гибель должна быть компенсирована. Однако крайне сомнительно, что диффузия какого-либо вещества может индивидуально распространять информацию о гибели отдельной клетки. Диффундирующие агенты обойдут погибшую клетку и, как в норме, достигнут клетки *P* (см. рис. 32). Ситуация еще более усложняется, если надо передавать информацию о нескольких параметрах на большие расстояния. Если пытаться использовать такой подход для описания развития, то надо предусмотреть десятки морфогенов как для формообразовательных процессов, так и для дифференцировки.

Аналогичные ситуации возникают при использовании других моделей. Сложности возникают в основном из-за того, что движение сигнала сопряжено с накоплением информации о проделанном им пути. Еще труднее объяснить, как с помощью морфогенов может переноситься информация о локальном изменении формы развивающегося зародыша. Если учесть, что используемые сигналы

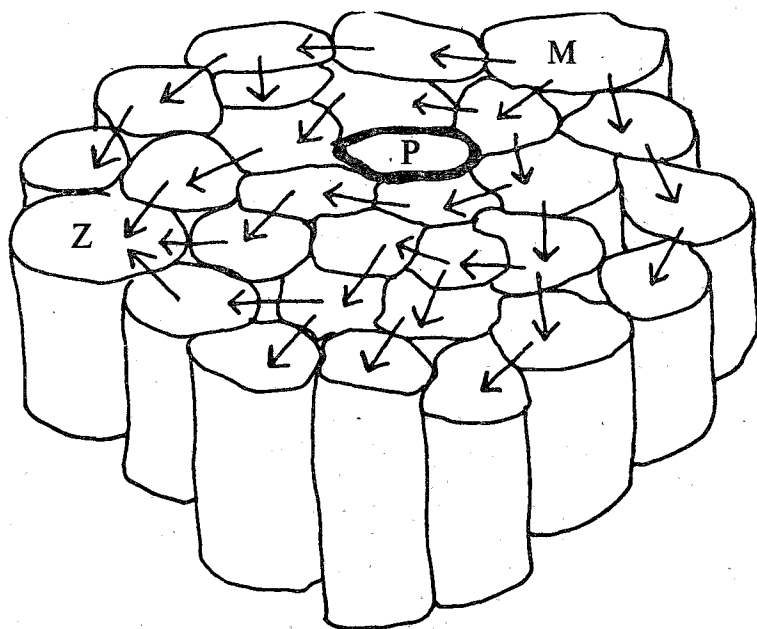


Рис. 32. Схема движения диффузионного химического сигнала в эпителиальном пласте.

Сигнал движется от клетки к клетке из точки *M*. Информация о гибели одной клетки (*P*) не накапливается в движущемся сигнале, поэтому клетка *Z* не узнает об изменениях, происшедших в пласте

должны быть простыми и неспецифичными, проблема становится неразрешимой. Столь затруднительно оказалось использовать для анализа морфогенеза молекулы клеточной адгезии. Они появляются на поверхности клеток после того, как их морфологические изменения уже видны под малым увеличением микроскопа. Поэтому трудно обсуждать их роль в разметке формообразовательных процессов. Скорее, они годятся в качестве первых маркеров ответа клетки на новую позиционную информацию, содержащуюся в каком-то другом сигнале.

На роль такого сигнала пока может претендовать только одно надклеточное явление в морфогенезе нервной системы — механические напряжения. Механические напряжения нейроэпителиальных пластов, описанные в предыдущей главе, обладают всеми необходимыми качествами для выполнения функций информационной системы в формообразовании головного мозга. Рассмотрим, в какой степени эти силы соответствуют условиям нормального клеточного морфогенеза.

Для того, чтобы клетка могла адекватно ответить на полученный сигнал, в нем должна содержаться информация о положении клетки и ее окружения. Механические напряжения охватывают не

только весь зачаток, но и весь мозг. Следовательно, каждая клетка в каждый момент времени может воспользоваться механической информацией о состоянии всего мозга, причем на клетку влияют как местные, так и общие натяжения. Понятно, чем более поздние стадии развития мы будем рассматривать, тем большее значение будут играть местные механические натяжения. Натяжения, охватывающие весь мозг, более мощные, но их меньше, чем локальных натяжений. Роль последних постепенно увеличивается, поскольку структуры мозга становятся областями самостоятельных морфогенезов. Каждая клетка оказывается в уникальной системе механических натяжений. Например, на стадии нервной пластинки продольного растяжения и поперечного сжатия, выявленного в экспериментах, изложенных в гл. 3, достаточно для индивидуального кодирования каждой отдельной клетки (рис. 33). Одинаковой механической информацией могут обладать только клетки, симметричные относительно сагиттальной плоскости. Аналогичная ситуация и в нервной трубке, но теменной изгиб, а в дальнейшем мозговые бороздки влияют на систему натяжений, из-за чего она усложняется, чем еще в большей степени индивидуализирует механическую информацию, получаемую клеткой. Таким образом, в системе механических натяжений объединена информация о положении клетки. Сведения об изменениях в ее окружении сразу сказываются на механическом состоянии клетки.

Рассмотрим, например, ситуацию с гибелью клетки, расположенной в зачатке с ограниченным числом клеток (рис. 34). Гибель одной клетки вызовет локальный сброс механических натяжений. Если допустить, что для запуска дифференцировки необходима определенная сила натяжений, то для компенсации гибели клетки необходима пролиферация одной из клеток этой группы. После пролиферации их число восстановится, а механическая напряженность зачатка вновь достигнет порогового дифференцированного уровня. Следовательно, механические натяжения могут позволить клетке получать информацию о динамике изменений в ее окружении.

Важен вопрос о дискретности получения механической информации, так как натяжения эпителиальных пластов пластов мозга существуют постоянно, вплоть до окончания дифференцировки нейробластов. По-видимому, существуют эндогенные и экзогенные механизмы, определяющие чувствительность клеток к натяжениям. С одной стороны, это может быть блокировка механозависимых ионных каналов на время экспрессии генов, а с другой — кратковременный сброс механических натяжений в ответ на полученный механический сигнал. В любом случае описанное в предыдущей главе чередование механочувствительных и механонечувствительных периодов развития указывают на дискретность получения клетками механической информации.

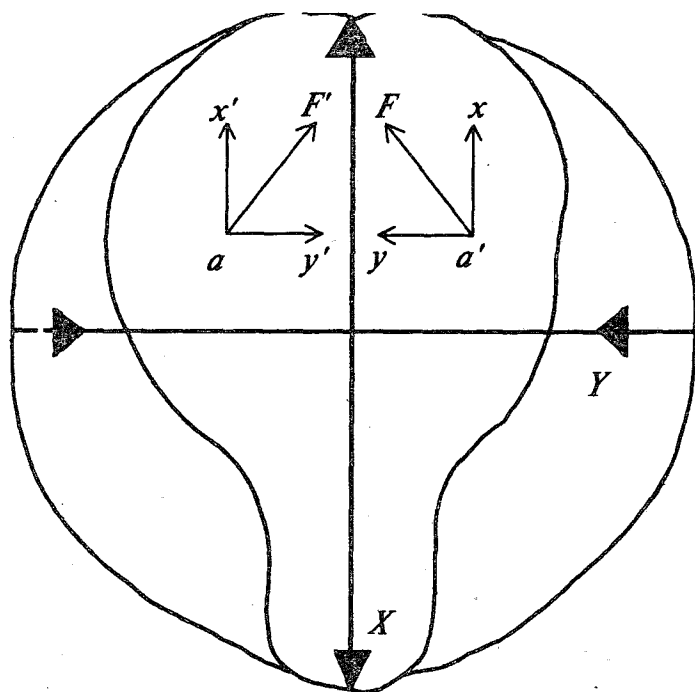


Рис. 33. Схема естественных механических натяжений нервной пластинки в начале нейруляции.

Основными натяжениями являются продольное растяжение по  $X$  и поперечное сжатие нервной пластинки —  $Y$ . Их достаточно для того, чтобы создать неповторимый комплекс механических натяжений у каждой нейроэпителиальной клетки. Схожие механические ситуации возможны только на контрлатеральной стороне тела —  $a, a'$

Таким образом, в эмбриональном головном мозге механические натяжения эпителиальных пластов являются одним из источников информации для каждой отдельной клетки. Содержащаяся в них информация носит индивидуальный характер, одновременно поступает от всего мозга и конкретного зачатка, дискретна, интегрирована и неспецифична. Свойства механической информации универсальны, но для ее реализации необходимо наличие активных механических процессов — формообразования мозга.

#### 4.1 ФОРМООБРАЗОВАНИЕ КАК ФАКТОР РЕГИОНАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

В основе развития лежит дифференциальная экспрессия генов в различных областях головного мозга. Естественен вопрос о ее происхождении в онтогенезе нервной системы. Непонятен механизм, при помощи которого из одного и того же набора хромосом

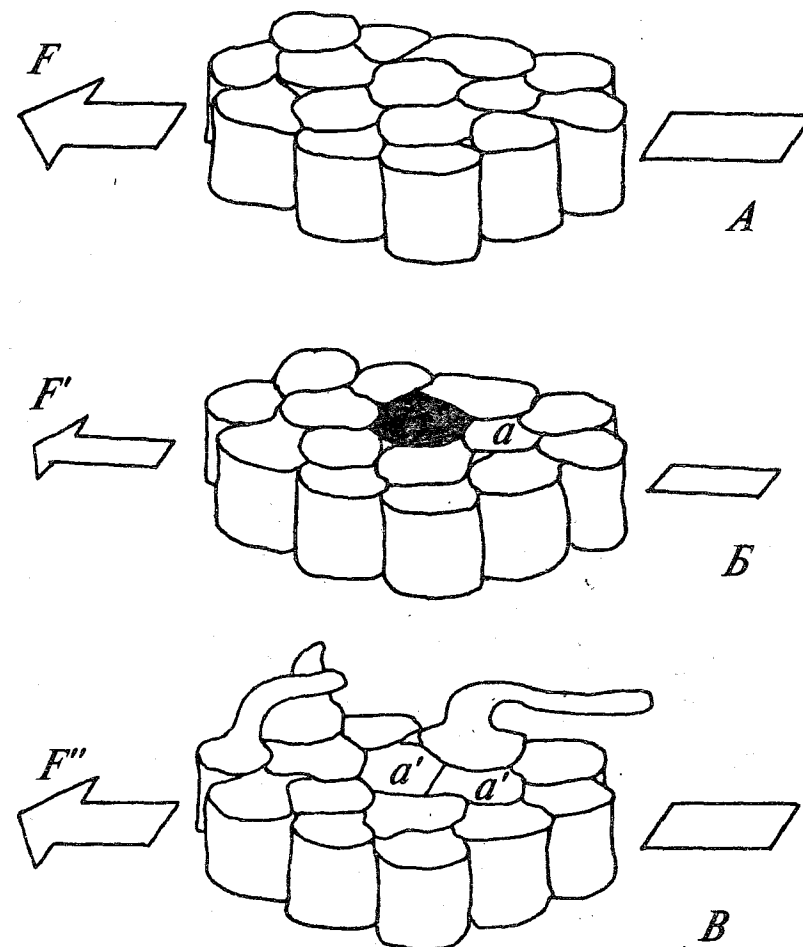


Рис. 34. Последовательность событий, связанных с гибелью одной из клеток при выходе в дифференцировку.

Для начала дифференцировки достигнуто состояние ( $F$ ), которое характеризуется соответствующим натяжением пласта ( $A$ ). Гибель одной из клеток ( $B$ ) приводит к сбросу натяжения ( $F'$ ), которое становится меньше, чем нужно для выхода в дифференцировку. Так как натяжение является результатом поляризации клеток всего пласта, его изменение влияет на все клетки. Одна из них ( $a$ ) делится, а поляризация ее потомков восстанавливает исходную величину натяжения ( $F = F'$ ), чем повторно запускается дифференцировка ( $B$ )

у дочерних клеток извлекаются и экспрессируются неодинаковые гены. Как в пространстве и во времени размечается региональная экспрессия генов? В работах Эдельмана и Тьерри (Edelman, Thiery, 1985) было показано, что у куриного эмбриона молекулы клеточ-

ной адгезии появляются довольно рано. До нейруляции такие молекулы, выделенные из нервной ткани (Н-МАК) и клеток печени (П-МАК), распределены равномерно. После начала нейруляции Н-МАК преобладал на дне нервной пластинки, а П-МАК — на ее краях. Налицо явная связь между формой развивающегося мозга и зональностью активации или репрессии генов.

Более детальные исследования проведены по анализу экспрессии генов в нейромерах заднего мозга (Gardner et al., 1988; Wilkinson, 1989). Как известно, непосредственно после нейруляции задний мозг позвоночных сегментируется. В нем появляется шесть или семь выпуклостей, ограниченных тонкими перетяжками. Эти структуры носят название нейромеров заднего мозга, или ромбомеров. Для цыпленка была показана связь между повторяющейся сегментацией заднего мозга и регулярной дифференцировкой нейронов и глии. Нейромерные сегменты заднего мозга соответствуют ряду черепномозговых нервов, сенсорных ганглиев и связанных с ними дериватов жаберных дуг. Исследование распределения гомеобоксодержащих генов у позвоночных показало, что существует по меньшей мере четыре тесно сцепленных кластера, или НОМ-комплекса, которые экспрессируются в различных областях вдоль переднезадней оси тела. При этом наиболее четкое совпадение границ экспрессии генов и формы сегментов мозга наблюдалось на уровне ромбомеров. Например, *Hox-2,9* экспрессируется в 4-м ромбомере, *Krox-20* ген в 3- и 5-м, а *Hox-2,8* в 3-м ромбомере и всех более каудальных структурах (рис. 35). Другие гены *Hox-2* комплекса также экспрессируются в доменах, передние границы которых совпадают с границами ромбомеров. Надо отметить, что при каждом шаге от одного гена к следующему вдоль по хромосоме передняя граница экспрессии перескакивает на два ромбомера в направлении головы.

Однако большинство исследований, посвященных региональной экспрессии НОМ-генов в заднем мозге мыши, было проведено на стадиях, следующих за исчезновением морфологически обособленных нейромеров. В основном исследовались 9–9,5-дневные зародыши у которых нейромеры исчезли, уже выполнив свои формообразовательные функции. Попытки выявить экспрессию этих генов на более ранних стадиях показали, что в момент существования ромбомеров (8-й день) она появляется только в заднем конце нервной трубки (Wilkinson, 1989; Levis, 1989). Затем экспрессия НОМ-генов продвигается в ростральном направлении, пока не достигнет одной из границ нейромеров. Морфологические границы между ромбомерами также возникают парами еще до начала экспрессии в них генов (Sakai, 1987, 1989). По-видимому, исчезновение нейромерных границ также происходит парами, что отражается на аналогичной топологии экспрессии генов. Таким образом, в случае с экспрессией НОМ-генов в ромбомерах мозга мыши мы имеем такую же схему, что и при появлении молекул

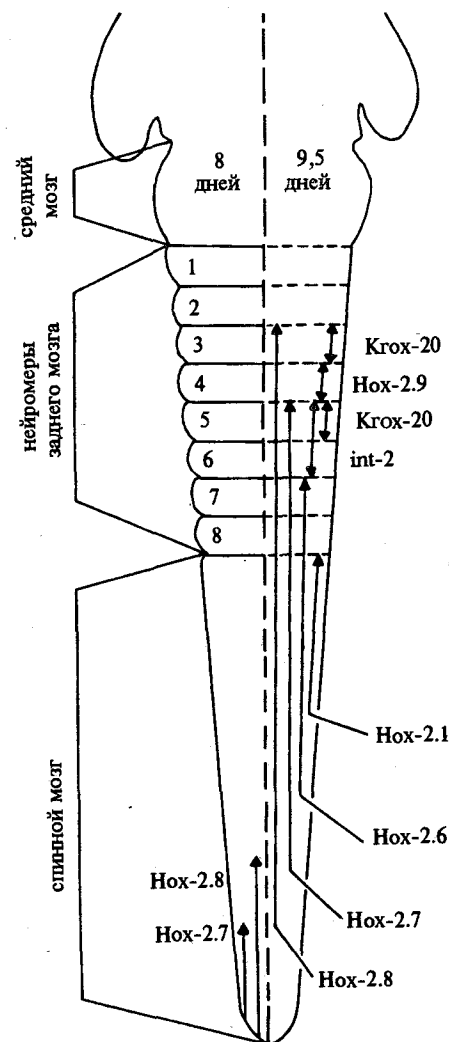


Рис. 35. Схема распределения нейромеров и регионально экспрессированных генов в заднем мозге мыши.

Левая половина рисунка — сегментация нейромеров на 8-й день развития, правая — на 9,5 дня. Первая экспрессия генов появляется на 8-й день, но только в хвостовой части зародыша. Затем зона экспрессии движется в ростральном направлении. После исчезновения нейромеров к 9-му дню развития появляются соответствующие им зоны экспрессии генов в районах заднего мозга: *Hox-2,1*, *Hox-2,6*, *Hox-2,7*, *Hox-2,8*, *Hox-2,9* — гены *Hox-2* комплекса; *int-2* — прото-онкоген; *Krox-20* — ген, кодирующий «цинковые пальцы»

клеточной адгезии. Сначала появляется морфологическая пространственная упорядоченность организации мозга, а затем соот-

ветствующая ей региональная экспрессия генов. Тем не менее, результаты анализа эмбриональной экспрессии генов позволили ряду авторов создать модель молекулярных основ морфогенеза.

В схематичном виде она представляется авторам как цепочка молекулярно-морфогенетических событий. Вначале происходит экспрессия генов-регуляторов. Они могут непосредственно регулировать экспрессию структурных генов, как в случае с молекулами клеточной адгезии, так и опосредованно. Регуляция экспрессии влияет на синтез и определяет адгезию и морфогенетические движения клеток. В свою очередь, изменение адгезивных свойств клетки влияет на возможность индукционных и формообразовательных взаимодействий, которые регулируют органогенез. Эта схема событий значительно изменится, если ее дополнить подробностями молекулярных преобразований на каждом из перечисленных этапов. Следовательно, при изучении формообразования головного мозга позвоночных мы имеем довольно полную картину событий, поясняющую причинно-следственные связи в развитии нервной системы.

Однако в этой стройной системе мы не знаем главного: что запускает региональную экспрессию регуляторных генов? Какова причина того, что регуляторные гены в одном месте головного мозга экспрессируются, а в другом нет? В связи с этим сложно объяснить, что руководит активацией и инактивацией регуляторных генов, участвующих в морфогенезе нервной системы. Трудно объяснить региональную, развернутую во времени и пространстве экспрессию генов, не поняв механизмов, делающих положение каждой клетки уникальным и неповторимым.

Положение клетки является уникальным только потому, что все события морфогенеза происходят в трехмерной системе координат, но информацию о собственном положении в пространстве клетка получает из взаимодействий в процессах формообразования. В данном случае формообразование является одновременно результатом межклеточных взаимодействий и механизмом, регулирующим эти взаимодействия.

Представим себе ситуацию, в которой формообразование нервной системы отсутствовало. Действительно, зачем головному мозгу форма, если она не выполняет никаких функций? Ядерные или стратифицированные структуры типа коры головного мозга могли бы существовать в плотном комке из клеток и отростков. Тогда бы, действительно, единственным источником информации могли бы быть диффундирующие химические сигналы. Однако о нереалистичности подобной организации нервной системы уже говорилось выше. Тем не менее, головной мозг в этом случае походил бы на шар из плотно упакованных клеток или на батон колбасы. Развитие нервной системы тогда представляло бы простой линейный рост числа клеток и волокон. В действительности этого нет. Следовательно, формообразование головного мозга

при всей его кажущейся ненужности несет в себе дифференцировочную стратегию развития. В закономерное преобразование формы головного мозга заложена топологическая информация о том, в каком регионе, какие именно и когда необходимо экспрессировать гены. Топологическим сигналом является, возможно, система механических напряжений пластов мозга. Участвуя в механических преобразованиях формы, клетки оказываются под влиянием механических напряжений. Механический сигнал очень не специфичен, но он может охарактеризовать положение клетки в пространстве и времени. Как описано в предыдущей главе, механические натяжения обладают двумя важными для морфогенеза параметрами: региональной специфичностью и изменчивостью во времени. Поэтому они вполне могут быть одним из тех источников информации, которые определяют региональность экспрессии дифференцировочных генов в развитии головного мозга, тем более что существуют экспериментальные данные о контроле механизмов дифференцировки при помощи межклеточных взаимодействий.

Например, в работах группы французских исследователей (Duprat et al., 1990) было показано, что судьба извлеченного из зародыша участка эктодермы, содержащего клетки будущей нервной системы, до начала индукции зависит от взаимодействия между клетками удаленного зачатка. Если выделенный участок инкубировался в течение некоторого времени, то клетки теряли свою ориентацию, а пласт постепенно разрушался. Однако если выделенный пласт был разделен на отдельные клетки, которые инкубировали совместно, то после их агрегации формировались нервная пластинка и нервная трубка. Затем клетки выходили в дифференцировку и формировали различные типы нейронов, которые авторы идентифицировали с помощью морфологических и иммуногистохимических методов. Следовательно, вместо эмбриональной индукции нейроэктодермы достаточно использовать деагрегацию и последующую самоорганизацию предшественников нервных клеток, чтобы запустить нейродифференцировку. Этого оказывается достаточно не только для того, чтобы вызвать тканеспецифическую дифференцировку, но и для создания условий для окончательной дифференциации отдельных типов нейронов.

Этот пример иллюстрирует предположение о том, что простые и неспецифические межклеточные взаимодействия, построенные на механических принципах, доступны для запуска тканеспецифических генов.

Прямая связь между механическим воздействием на организм и специфическим ответом в виде региональной экспрессии генов была обнаружена при исследовании влияний внешних факторов на растения. В опытах на арабидопсисе было установлено, что в ответ на прикосновение, ветер или повреждение это растение экспрессирует по меньшей мере 4 типа генов. Уже через 10–30 с после

воздействия уровень мРНК увеличивался в 100 раз (Bгаam, Davis, 1990). На региональную специфичность экспрессии генов указывает обнаруженный авторами факт развития укороченного стебля и стрелки растения. Надо отметить, что в ответ на механическое воздействие экспрессировались кальмодулин и сцепленные с ним гены. Эти данные подтолкнули авторов к выводу о том, что  $Ca^{2+}$  и кальмодулин включены в систему передачи сигналов из внешней среды на клеточный и генетический уровни. Вполне возможно, что и в этом случае мы имеем дело с механическими ионными каналами, которые определяют механочувствительность растения.

Сходные данные были получены на культуре ткани эпителиальных клеток. В этих опытах механическое натяжение эпителиальных клеток вызывало увеличение синтеза ДНК (Brunette, 1984). Существуют также экспериментальные данные о прямом влиянии механических натяжений на пролиферацию фибробластов цыпленка. Фибробласты цыпленка, растущие на нейлоновой сетке, оказались чувствительными к ее механическому растяжению. Механическое растяжение сетки приводило к увеличению числа митозов и количества клеток. На основании этих экспериментов авторы высказывали предположение о том, что в основе регуляции пролиферации клеток лежат их форма и внутриклеточная организация микрофиламентов, которая зависит от механических напряжений ткани (Curtis, Sehar, 1978).

Таким образом, анализируя конкретные морфогенетические процессы, мы сталкиваемся с парадоксальной ситуацией. Она заключается в том, что прежде чем можно выявить какие-либо химические преобразования, мы видим изменения в форме пластов и клеток. Изменения формы мозга могут, по-видимому, опережать изменения в геноме, форма развивающегося мозга способна нести в себе информацию о региональной экспрессии генов. По существу эта «формообразовательная» разметка судьбы клеток уже известна. Она отражена в понятии «компетентия» клеток. Под ним понимается способность клеток реагировать на внешнее воздействие. Выше это описано в опытах Дюпра (Duprat et al., 1990). Основная проблема развития мозга сводится к разрешению вопроса о том, что делает клетки компетентными. По-видимому, на сегодняшний день ответить можно только одним способом: допустить, что механические процессы в развитии формы мозга определяют пространственную упорядоченность экспрессии генов.

Уже на стадии ранней гаструлы механические натяжения поверхности зародышей амфибий имеют крайне сложную структуру и региональную специфичность, которая выделяет нейральное поле из других структур. Дорсальная губа бластопора создает систему механических натяжений, которые совпадают с локализацией зачатков. Нейральный регион эктодермы прилежит к губе бластопора и, по-видимому, испытывает достаточно сильное влияние этого натяжения. Гаструляционное натяжение эктодермы

создает первую механическую регионально-специфическую ситуацию в развитии зародыша. Натяжения создают ось зародыша, две симметрично напряженные половины и ростокаудальную неоднородность. Доказательством того, что это действительно результат механических взаимодействий, являются опыты Беловусова (1988). В них показано, что если на стадии гаструляции надрезать поперечно к оси тела вентральную половину зародыша, а затем в возникший разрез вставить небольшой участок вегетативной половины другого зародыша, то нервная система будет развиваться аномально. Ее объем увеличится примерно в полтора раза, а морфогенез и дифференцировка патологически изменятся. Сходные последствия вызывает перенапряжение поверхности зародыша при помощи иголок, введенных в нейроэктодермальный пласт (Савельев, 1988). Кратковременного и обратимого растяжения или сжатия участка поверхности достаточно для изменения морфогенеза структур, оказавшихся в поле воздействия. Следовательно, региональный запуск регуляторных генов определяется гетерогенностью механических напряжений на стадии гаструляции. Наверное, именно из этой гетерогенности рождается предопределенность судьбы предшественников нервных клеток.

Сходная ситуация возникает как на стадии нейруляции, так и во время дифференцировки нейромеров заднего мозга (см. рис. 35). Например, нейромеры заднего мозга морфологически обособляются на 8-й день развития мозга мышши параллельно с черепно-мозговыми ганглиями, а соответствующая им экспрессия набора гомеобоксных генов начинается на восьмой с половиной день. В данном случае механикоморфологическая сегментация также опережает региональную специфичность экспрессии генов. Надо отметить, что саму сегментацию нейронов заднего мозга довольно легко изменить: достаточно на 10 мин растянуть при помощи иголок поверхность нервной пластинки во время нейруляции (Савельев, 1988). Это приводит к полному изменению сегментации заднего мозга и даже отсутствию полости IV желудочка. Более четкий ответ на предположение о регулирующем воздействии механических натяжений на региональную экспрессию генов могли бы дать исследования распределения гомеобоксных генов в экспериментах по растяжению поверхности зародыша.

Оценку роли формообразования в региональной экспрессии генов можно дать в виде довольно абстрактной схемы, которая поясняет связь между двумя этими процессами (рис. 36). Биологическую сущность этой схемы можно выразить через циклы взаимодействий процессов формообразования и генной экспрессии. Так, первоначально существует дорсовентральная неравнозначность организации оплодотворенного яйца в силу наличия гравитационных взаимодействий. Ростокаудальную связь задает

область вхождения сперматозоида. В результате механозависимых симметричных делений возникает бластула (Bjerknes, 1986). В бластуле доминируют радиальносимметричные натяжения. Начало гаструляции вызывает к жизни форму зародыша с региональной специфичностью механических натяжений. Неоднородность натяжений может считаться клетками, в результате чего запускаются механизмы региональной экспрессии регуляторных генов. Функционирующие под их влиянием структурные гены вызывают фенотипические изменения в клетках. Эти изменения реализуются в пластах через систему напряжений и создают новую форму развивающегося зачатка.

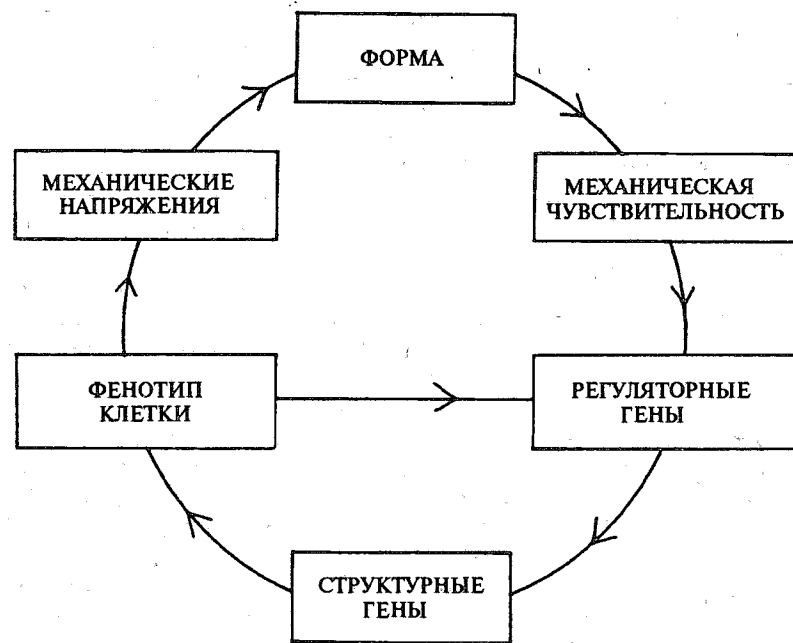


Рис. 36. Схема, иллюстрирующая связь между формообразованием и региональной экспрессией генов в развивающемся головном мозге.

На ранних эмбриональных стадиях функционирует полный цикл событий. После начала дифференцировки он укорачивается, а роль механических и формообразовательных процессов уменьшается.

Новая формообразовательная ситуация воспринимается клетками, и весь цикл повторяется вновь (см. рис. 36). Так как форма с каждым циклом усложняется, позиционная информация для каждой клетки все более индивидуализируется. Этот процесс не бесконечен. Формообразование довольно быстро (по сравнению со всем периодом развития) заканчивается, и связь между структурными и регуляторными генами перестает нуждаться в

информации, содержащейся в форме мозга и системе натяжений. Цикл укорачивается (см. рис. 36), а ведущая роль переходит к автогенетическим процессам.

#### 4.2. ФОРМООБРАЗОВАНИЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ПОВЕДЕНИЕ

Физиологическая активность эмбрионального головного мозга начинается с того момента, когда по аксону дифференцированного нейрона, достигшего клетки-мишени, начинают проходить импульсы. Сама система процессов, отражающих созревание нервной системы, сложна и хорошо отлажена в физиологической литературе (Волохов, 1968; Богданов, 1978). Однако до того, как начинают формироваться поведение и физиологическая активность мозга, возникает первичный паттерн нервных связей. Биологический смысл морфологической организации первичной нейральной дифференцировки был разработан еще Когхиллом (1934). Им было показано, что первичная нервная дифференцировка охватывает весь организм зародыша амфибии, чем определяется генерализованность ответов личинки на внешние воздействия. Затем, по мере развития структур и отделов головного мозга возникают все более частные дифференцировочные зоны. Первыми дифференцируются те нейроны, которые нужны для выполнения функции плавания. Следовательно, первичная дифференцировка зависит от того, какие конкретные задачи будет выполнять молодое животное при переходе к активной жизни. Приведенная схема становления нервной системы охватывает только ранний период развития, пока эмбрион не испытывает активного влияния со стороны внешней среды. После перехода к активной жизни на формирование поведения начинают сказываться условия внешней среды. Тот факт, что становление поведения животных носит эпигенетический характер, не вызывает у современных этологов сомнений, хотя основоположники этологии придерживались иного мнения. Они считали, что поведенческие признаки закреплены индивидуально, в результате генетической детерминации, а внешние воздействия лишь немного могут их корректировать (Lorenz, 1965). Эти наивные представления были отвергнуты дальнейшим ходом исследований роли генетических процессов в становлении поведения (Эрман, Парсонс, 1984; Мак-Фарленд, 1988). Наиболее адекватное объединение факторов среды и генетических воздействий на развитие поведения было проведено Брауном (Brown, 1975). Он считал, что путь становления поведения от оплодотворенной клетки до взрослого состояния организма можно разбить на ряд стадий. Переход от стадии к стадии зависит от совокупного влияния на поведение экспрессии генов и внешней среды. Этот процесс он представлял в виде символов:

$$P_1 + C_1 + E_1 \rightarrow P_2,$$

где  $P_1$  — исходное состояние (фенотип зародыша),  $C_1$  — экспрессия генов, характерная для этой стадии развития,  $E_1$  — влияние внешней среды на данной стадии,  $P_2$  — фенотип следующей стадии развития зародыша.

В этой схеме оставлен без ответа вопрос о том, что заставляет экспрессироваться нужные гены в нужном месте. Если мы примем выводы предыдущей главы, то между исходным фенотипом ( $P_1$ ) и генной экспрессией должен появиться новый параметр. Этим параметром является форма развивающегося мозга ( $F_1$ ), которая вместе с комплексом механо-химических взаимодействий определяет «фенотип» клеток и пластов мозга. По существу, формообразовательные процессы являются внешней средой для каждой клетки, хотя они сами ее и создают. Но эта внутренняя «среда» определяет региональную экспрессию генов. Таким образом, в самом общем виде, мы можем определить место формообразования головного мозга в процессе становления поведения. Для этого можно переписать формулу развития поведения с учетом формообразовательных процессов:

$$P_1 + F_1 + C_1 + E_1 \rightarrow P_2.$$

Понятно, что параметр  $F_1$  будет играть большую роль только на ранних этапах развития поведения. Чем дальше развитие, тем меньшее значение будет играть этот параметр. Надо отметить, что такая же судьба ждет в развитии поведения и параметр  $C_1$ , отражающий специфическую экспрессию генов в нервной системе. Влияние внешних воздействий будет непрерывно возрастать по мере накопления индивидуального опыта животного или человека.

В проблеме становления поведения животного особую роль играет окончательная форма взрослого мозга.

Существование связи между пространственной организацией головного мозга и поведением животных никогда не вызывало сомнений. Совершенно очевидно, что животные со сложным поведением обладают и сложным мозгом. Поэтому в сравнительно-анатомических работах и преобладает обратная логика: чем сложнее организован мозг, тем и больше поведенческих реакций у животного. И наоборот, чем проще форма, тем ниже поведенческий уровень. Эти рассуждения очень хороши, если сравнивать мозг шимпанзе и кролика. Тогда, действительно, разница наглядна и убедительна. В одном случае мы имеем лиссэнцефальный мозг и низкоорганизованное животное, а в другом — извилины и наиболее сложные формы поведения. Однако анатомические особенности организации мозга дают значительно меньше пищи для подобных сравнений, если мы начнем сопоставлять мозг кролика, джогоня и бобра. У всех перечисленных животных мозг лиссэнцефальный — лишенный извилин, но объединить поведение

этих животных довольно трудно. Отличия мозга этих животных не только во внешней форме, но и в гистологической организации. Следовательно, в основе различий поведения животных лежит как анатомическая, так и гистологическая организация мозга. Тем не менее, при большой разнице в уровнях организации анатомические различия в строении мозга становятся все более и более заметными. По-видимому, наблюдаемые у высших позвоночных борозды и извилины необходимы в качестве субстрата для создания сложных форм поведения. Если бы в них не было никакой необходимости, то тогда бы при усложнении поведения мозг просто увеличивался бы в размерах. По-видимому, в становлении поведения животного форма выполняет самостоятельные функции. В чем же они заключаются?

Если исходить из того, что процесс формообразования отражает пространственно-временное распределение дифференцировочных процессов, то причина разнообразия форм мозга становится яснее. При возникновении сложного по пространственной организации мозга должно пройти больше формообразовательных событий, чем при развитии относительно просто организованного мозга. Следовательно, и каждая клетка пройдет больше циклов по схеме: форма → механические процессы → экспрессия генов → фенотип клетки → форма. При увеличении числа таких циклов тоньше интегрируется развитие отделов и структур мозга, точнее индивидуальная позиционная информация для каждой нервной клетки.

Наверное, поэтому человек, дельфин, обезьяна имеют сложную морфологическую организацию нервной системы. Ее форма отражает удлинение, по сравнению с другими животными, времени формообразования. Каждая нервная клетка в головном мозгу этих организмов побывает во множестве морфогенетических циклов типа  $F_1 \rightarrow P_2$ , прежде чем «узнает» свое финальное положение в мозге и определит окончательный набор экспрессируемых генов. С другой стороны, увеличение количества таких циклов во время созревания поведения дает животному больше возможностей адаптироваться к влияниям внешней среды. Эти рассуждения наталкивают нас на формально непротиворечивый вывод о том, что прогрессивное развитие нервной системы обусловлено способностью нейральных зачатков к удлинению времени и увеличению разнообразия формообразовательных процессов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Белинцев Б.Н., Белоусов Л.В., Зарайский А.Г. Модель эпителиальных морфогенезов на основе упругих сил и контактной поляризации клеток. I // Онтогенез. 1985 а. Т. 16. N 1. С. 5-14.
- Белинцев Б.Н., Белоусов Л.В., Зарайский А.Г. Модель эпителиальных морфогенезов на основе упругих сил и контактной поляризации клеток. II // Онтогенез. 1985 б. Т. 16. N 5. С. 437-449.
- Белинцев Б.Н., Савич Д. Физический механизм, определяющий пространственную организацию при эпителиальном формообразовании // Биофизика. 1985. Т. 30. С. 284-291.
- Белоусов Л.В. Формирование и клеточная природа линий натяжения в осевых зачатках зародышей амфибий // Онтогенез. 1978. Т. 9. N 2. С. 124-130.
- Белоусов Л.В. Опыты по изменению полей натяжения осевых зачатков зародышей амфибий // Онтогенез. 1979. Т. 10. N 2. С. 120-129.
- Белоусов Л.В. Введение в общую эмбриологию. М., 1980.
- Белоусов Л.В. Контактная поляризация клеток зародышей лягушки в период гаструляции. 1. Контактная поляризация как реакция на механическую релаксацию // Онтогенез. 1988. Т. 19. N 1. С. 48-54.
- Белоусов Л.В., Дорфман Я.Г., Черданцев В.Г. Быстрые изменения формы и клеточной архитектуры изолированных фрагментов эмбриональных тканей амфибий как экспериментальная модель морфогенеза // Онтогенез. 1974. Т. 5. N 4. С. 323-333.
- Березин В.А. Молекулы клеточной адгезии нервной ткани // Усп. совр. биол. 1986. Т. 101. В. 1. С. 54-68.
- Богданов О.В. Фундаментальный эмбриогенез мозга. Л., 1978.
- Будко К.П., Гладкович Н.Г., Максимова Б.В., и др. Нейроонтогенез. М., 1985.
- Вологов А.А. Очерки по физиологии нервной системы. Л., 1968.
- Вольперт Л. Морфогенез в процессе развития // Молекулы и клетки. М., 1982. С. 115-123.
- Гексли Д., Бер Г. Экспериментальная эмбриология. М.; Л., 1938.
- Гурвич А. Атлас и очерк эмбриологии позвоночных и человека. СПб., 1909.
- Детлаф Т.А., Руднева Т.Б. Шпорцевая лягушка *Xenopus laevis* Dandin // Объекты биологии развития. М., 1975. С. 392-441.
- Коггилл Дж.Э. Анатомия и проблема поведения, М.; Л., 1934.
- Лакирев А.В., Белоусов Л.В., Наумиди И.И. Влияние внешних натяжений на дифференцировку тканей зародышей шпорцевой лягушки in vitro // Онтогенез. 1988. Т. 19. N 6. С. 591-600.
- Мак-Фарленд Д. Поведение животных. М., 1988.
- Михайло-Махлай Н.Н. Материалы по сравнительной неврологии позвоночных. М.; Л., 1952. С. 33-106.
- Мизайлов А.Т. Эмбриональные индукторы. М., 1988.
- Петров К.В., Белоусов Л.В. Кинетика контактной поляризации клеток в индуцированных тканях зародышей амфибий // Онтогенез. 1984. Т. 15. N 6. С. 643-648.
- Резников К.Ю. Пролиферация клеток мозга позвоночных в условиях нормального развития мозга и при его травме. М., 1981.
- Савельев С.В. Некоторые аспекты формообразования мозга из зародышей амфибий // Онтогенез. 1985. Т. 16. N 6. С. 620-627.
- Савельев С.В. Анализ формообразования головного мозга из зародышей сибирского углозуба // Онтогенез. 1987а. Т. 18. N 6. С. 639-650.

- Савельев С.В. Роль перемещений нейроэпителиальных клеток и тангенциальных механических напряжений в раннем эмбриональном формообразовании головного мозга. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1987б.
- Савельев С.В. Механизмы кодирования позиционной информации нейроэпителиальными клетками мозга зародышей амфибий // ДАН СССР. 1988. Т. 301. N 6. С. 1479-1483.
- Савельев С.В. Механизм эмбрионального формообразования шпорной борозды коры головного мозга человека // ДАН СССР. 1989. Т. 309. N 1. С. 204-207.
- Савельев С.В. Поляризация нейроэпителиальных клеток при введении участка нервной пластинки в полость нервной трубки зародышей амфибий // Онтогенез. 1990. Т. 21. N 3. С. 208-303.
- Саксен Л., Тойвоонен С. Первичная эмбриональная индукция. М., 1963.
- Сотников О.С. Динамика структуры живого нейрона. Л., 1985.
- Спирос А.В. Об эмбриональном структурообразовании на основе волн цитодифференцировок // Онтогенез. 1982. Т. 13. N 5. С. 469-477.
- Спирос А.В. Некоторые теоретические аспекты биологического морфогенеза: взаимосвязь паттерна и формы // Журн. общ. биол. 1989. Т. 50. С. 606-620.
- Стожун Д.Л., Миташов В.И. Регуляция пространственной организации регенерирующей конечности амфибий // Онтогенез. 1990. Т. 21. N 1. С. 5-31.
- Эрман Л., Парсонс П. Генетика, поведение и эволюция. М., 1984.
- Austin W.L., Wind M., Brown K.S. Differences in the toxicity and teratogenicity of cytochalasin D and E in various mouse strains // Teratology. 1982. V. 25. P. 11-18.
- Baer K.E. Über entwicklungsgeschichte der Thiere // Beobachtung und reflexion. Königsberg, 1837. Teil 2. S. 1-315.
- Baker P.C., Schroeder T.E. Cytoplasmic filaments and morphogenetic movements in the amphibian neural tube // Develop. Biol. 1967. V. 15. P. 432-450.
- Baker R.C., Graves G.O. The development of the brain of *Ambystoma* (3 to 17 mm body length). Three text figures and eight plates (fifteen figures) // J. Comp. neurol. 1932. V. 54. N. 2. P. 501-559.
- Beloussov L.V. Growth and morphogenesis of some marine hydrozoa according to histological data and time-lapse studies // Publications of the Seto marine Biological laboratory. 1973. V. 20. P. 315-366 (Proceedings of the Second International Symposium on Chidaria).
- Bergquist H. Studies on the cerebral tube in vertebrates. The neuromeres // Acta zool. 1952. V. 33. P. 117-187.
- Bergquist H. Die Neurometric // Anat. Anz. 1956. Bd. 102. H. 18-21. S. 449-456.
- Bergquist H., Kallen B. Notes on the early histogenesis and morphogenesis of the central nervous system in vertebrates // J. Comp. Neurol. 1954. V. 100. P. 627-660.
- Bergquist H., Kallen B. The archencephalic neuromery in *Ambystoma punctatum*. An experimental study // Acta Anat. 1955. V. 24. P. 208-214.
- Bjerknes M. Physical theory of the orientation of astral mitotic spindles // Science. 1986. V. 234. P. 1413-1416.
- Bream J., Davis R.M. Rain, wind- and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin related genes in *Arabidopsis* // Cell. 1990. V. 60. P. 352-364.
- Brown J.L. The evolution of behaviour. N.Y., 1975.
- Brun R.B. Neural fold and neural crest movement in the mexican salamander *Ambystoma mexicanum* // J. Exp. Zool. 1985. V. 234. N 1. P. 57-61.
- Brun R.B., Garson J.A. Neurulation in the Mexican salamander (*Ambystoma mexicanum*) a drug study and cell 8 hape analysis of the epidermis and the neural plate // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1983. V. 74. P. 275-295.
- Brunette D.M. Mechanical stretching increases the number of epithelial cells synthesizing DNA in culture // J. Cell Sci. 1984. V. 69. P. 35-45.
- Burnside B. Microtubules and microfilaments in newt neurulation // Dev. Biol. 1971. V. 26. P. 416-441.
- Burnside B. Microtubules and microfilaments in amphibian neurulation // Amer. Zoologist. 1973. V. 13. P. 989-1006.
- Burnside M.B., Jacobson A.G. Analysis of morphogenetic movements in the neural plate of the newt *Taricha torosa* // Dev. Biol. 1968. V. 18. P. 537-552.

Burr H.S. The early development of the cerebral hemispheres in *Ambystoma* // J. Comp. Neurol. 1922. V. 34. N 3. P. 277-294.

Byers B., Porter K.R. Oriented microtubules in elongating cells of the developing lens rudiment after induction // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1964. V. 52. P. 1091-1099.

Campbell C., Hodoss W. The concept of homology and the evolution of the nervous system // Brain Behav. Evol. 1970. V. 3. P. 353-367.

Carpenter E. The head pattern in *Ambystoma* studied by vital staining and transplantation methods // Proc. Soc. Exp. Biol., Med. 1932. V. 30. P. 370-372.

Carpenter E. The head pattern in *Ambystoma* studied by vital staining and transplantation methods // J. Exp. Zool. 1937. V. 75. P. 103-129.

Caviness V.S. The developmental consequences of abnormal cell position in the reeler mouse // Trends Neurosci. 1980. V. 3. P. 31-33.

Caviness V.S. Development of neocortical afferent system: Studies in the reeler mouse // Neurosci. Res. Progr. Bull. 1982. V. 20. P. 561-569.

Coghill G.E. Correlated anatomical and physiological studies of the growth of the nervous system of Amphibia. IV. Rates of proliferation and differentiation in the central nervous system of *Ambystoma* // J. Comp. Neurol. 1924. V. 37. P. 71-120.

Coghill G.E. Correlated anatomical and physiological studies of the growth of the nervous system of Amphibia. V. The growth of the motor mechanism of *Ambystoma punctatum* // J. Comp. Neurol. 1926. V. 40. P. 47-92.

Coghill G.E. Correlated anatomical and physiological studies of the growth of the nervous system of Amphibia. VIII. The development of the pattern of differentiation in the cerebrum of *Ambystoma punctatum* // J. Comp. Neurol. 1928. V. 45. N 1. P. 227.

Coghill G.E. The structural basis of the integration of behavior // Proc. nat. Acad. Sci. 1930. V. 16. P. 637-643.

Cowan W.M. A synoptic view of the development of the vertebrate central nervous system // Life Sci. Res. Rep. 1982. N 24. P. 7-24.

Crick F.H.C. Diffusion in embryogenesis // Nature. 1970. V. 225. P. 420-422.

Crossland W.J., Uchwat C.L. Neurogenesis in the chick ventral lateral geniculate and ectomammillary nuclei: Relationship of soma size to birthdate // Dev. Brain Res. 1983. V. 6. P. 33-46.

Curtis A.S.G., Sechar G.M. The control of cell division by tension or diffusion // Nature. 1978. V. 274. N 5666. P. 52-53.

Demarest J.R., Loo D.D.F., Sachs G. Activation of apical chloride channels in the gastric oxyntic cell // Science. 1989. V. 245. P. 402-404.

Ebbeson S. Evolution and ontogeny of neural circuits // Behav. Brain Sci. 1984. V. 7. P. 321-366.

Edelman E.M., Chuong M. Embryonic to adult conversion of neural cell adhesion molecules in normal and staggerer mice // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. N 22. P. 7036-7040.

Edelman E.M., Thiery J.P. The cell in contact // Neurosci. Inst. Publ. N.Y. 1985.

Edwards C. The ionic mechanisms underlying the receptor potential in mechanoreceptors // The Physiology of Excitable Cell. N.Y.; Liss. 1983. P. 497-503.

From presumptive ectoderm to neural cells in an amphibian. Duprat A.M. et al. // Int. J. Dev. Biol. 1990. V. 34. P. 140-156.

Fujita S. Kinetic of cellular proliferation // Exp. Cell Res. 1962. V. 28. P. 52-60.

Gardner C.A., Darnell D.K., Poole S.S., et al. Expression of an engrailed-like gene during development of the early embryonic chick nervous system // J. Neurosci. Res. 1988. V. 21. P. 426-437.

Gillette R. Cell number and cell size in the ectoderm during neurulation (*Ambystoma maculatum*) // J. Exp. Zool. 1944. V. 96. P. 201-222.

Gimlich R.L. Acquisition of developmental autonomy in the equatorial region of the *Xenopus* embryo // Dev. Biol. 1986. V. 115. P. 340-352.

Gimlich R.L., Braun J. Improved fluorescent compounds for tracing cell lineage // Dev. Biol. 1985. V. 109. P. 509-514.

Goertler K. Die Formbildung der Medullenanlage bei Urodelen // Arch. Entw. Mech. Org. 1925. Bd. 106. S. 503-541.

Gordon R. A review of the theories of vertebrate neurulation and their relationship to the mechanics of neural tube birth defects // J. Embryol. Exp. Morphol. 1985. V. 89. Suppl. P. 229-255.

Grayson S. Migration-directing liquid properties of embryonic amphibian tissues // Amer. Zool. 1984. V. 24. N 3. P. 649-655.

Greenaway J.C., Shepard T.H., Kuc J. Comparison of cytochalasin (A, B, D and E) in chick explant teratogenicity and tissue culture systems // Soc. Exp. Biol. Med. 1977. V. 155. P. 239-242.

Griggs L. Early stages in the development of the central nervous system of *Ambystoma punctatum* // J. Morphol. 1910. V. 21. P. 425-483.

Guharay F., Sachs F. Stretch activated single ion-channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle // J. Physiol. (L.). 1984. V. 352. P. 685-701.

Gurwitsch A. Über Determination, Normierung und Zufall in der Ontogenese // Arch. Entwicklungsmechanik der Organismen. 1910. Bd. 30. Teil 1. S. 133-193.

Gurwitsch A. Weiterbildung und verallgemeinerung des feldbegriffes // Arch. Entw. Organismen. 1927. Bd. 112. S. 433-454.

Gustin M.C. et al. Mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane // Science. 1988. V. 242. P. 762-765.

Hamburger V. A manual of experimental embryology, revised ed. Chicago, 1960.

Herrick C.J. Morphogenetic factors in the differentiation of the nervous system // Physiol. Rev. 1925. N 5. P. 112-130.

Herrick C.J. Development of the cerebrum of *ambystoma* in early functional stages // J. Comp. Neurol. 1937. V. 67. P. 381-422.

Herrick C.J. Development of the cerebrum of *ambystoma* during early swimming stages // J. Comp. Neurol. 1938. V. 68. P. 203-241.

Hinds J.W., Ruffett T.L. Cell proliferation in the neural tube: An electron microscopic and Golgi analysis in the mouse cerebral vesicle // Z. Zellforsch. 1971. Bd. 115. P. 226-264.

Hirose G., Jacobson M. Clonal organization of the central nervous system of the frog. I. Clones stemming from individual blastomeres of the 16-cell and earlier stages // Dev. Biol. 1979. V. 71. P. 191-202.

His W. Zur allgemeine Morphologie des Gehirns // Arch. f. Anat. u. Physiol. Anat. Abt. 1892. S. 346-383.

His W. Über mechanische Grundvorgänge thierischer Formenbildung // Arch. f. Anat. u. Physiol. 1894. S. 1-80.

Holtfreter J. Structure, mobility and locomotion in isolated embryonic amphibian cells // J. Morphol. 1946. V. 79. P. 27-62.

Holtfreter J. Observation on the migration, aggregation and phagocytosis of embryonic cells // J. Morphol. 1947. V. 80. P. 25-55.

Holtfreter J. Significance of the cell membrane in embryonic processes // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1948. V. 49. P. 709-760.

Hsu Y. Time-Lapse cinematography of whole mouse embryo development in vitro from blastocyst to limb-bud stage // Teratology. 1983. V. 27. N 2. P. 51.

Huettnner A.F. Fundamentals of comparative embryology of the vertebrates. N.Y., 1953.

Hughes A. Development of the primary sensory system in *Xenopus laevis* (Dandini) // J. Anat. 1957. V. 91. P. 323-328.

Hutchinson C. Cell number-volume relationship in the medullary plate of *Ambystoma punctatum* // Anat. Rec. 1944. V. 88. P. 439.

Imoh H. Appearance and distribution of RNA-rich cytoplasm in the embryo of *Xenopus laevis* during early development // Develop. Growth and Differ. 1984. V. 26. N 2. P. 167-476.

Imoh H. Formation of the neural plate and mesoderm in normally developing embryos of *Xenopus laevis* // Develop. Growth and Differ. 1985. V. 27. N 1. P. 1-11.

Imoh H. Cell death during normal gastrulation in the newt, *Cynops pyrrhogaster* // Cell Differ. 1986. V. 19. N 1. P. 35-42.

Jacobson A.G. Inductive processes in embryonic development // Science. 1966. V. 152. P. 25-34.

Jacobson A.G. Morphogenesis of the neural plate and tube // Morphogenesis and Pattern Formation. N.Y., 1981. P. 233-263.

Jacobson A.G., Gordon R. Changes in the shape of the developing vertebrate nervous system analysed experimentally man // J. Exp. Zool. 1976. V. 2. P. 191-246.

Jacobson A.G., Meier S. Morphogenesis of the head of a newt: mesodermal segments, neuromeres, and distribution of neural crest // Dev. Biol. 1984. V. 106. P. 181-193.

Jacobson C.-O. The localization of the presumptive cerebral regions in the neural plate of the axolotl larva // J. Embryol. Exp. Morphol. 1959. V. 7. Part 1. P. 1-21.

Jacobson C.-O. Cell migration in the neural plate and the process of neurulation in the axolotl larva // Zool. Bidv. Upps. 1962. V. 35. P. 433-449.

Jacobson M. Developmental Neurobiology. N.Y., 1970.

Jacobson M. Developmental neurobiology. N.Y., 1978.

Jacobson M. Rohon-Beard neuron origin from blastomeres of the 16-cell frog embryo // J. neurosci. 1981 a. V. 1. P. 918-922.

Jacobson M. Rohon-Beard neuron arise from a substitute ancestral cell after removal of the cell from which they normally arise in the 16-cell frog embryo // J. Neurosci. 1981 b. V. 1. P. 923-927.

Jacobson M. Origin of the nervous system in amphibians // Neur. develop. 1982. N.Y. P. 45-99.

Jacobson M. Clonal organization of the central nervous system of the frog. III. Clones stemming from individual blastomeres of the 128-, 256-, and 512-cell stages // J. Neurosci. 1983. V. 3. P. 1019-1038.

Jacobson M. Cell lineage analysis of neural induction: origins of cells forming the induced nervous system // Dev. Biol. 1984. V. 102. P. 122-129.

Jacobson M. Clonal analysis of the vertebrate central nervous system // Trends Neurosci. 1985 a. V. 8. P. 151-155.

Jacobson M. Clonal analysis and cell lineages of the vertebrate central nervous system // Ann. Rev. Neurosci. 1985 b. V. 8. P. 71-102.

Jacobson M., Hirose G. Origin of the retina from both sides of the embryonic brain: a contribution to the problem of crossing at the optic chiasma // Science. 1978. V. 203. P. 637-739.

Jacobson M., Hirose G. Clonal organization of the central nervous of the frog. II. Clones stemming from individual blastomeres of the 32- and 64-cell stages // J. Neurosci. 1981. V. 1. P. 271-284.

Jacobson M., Klein S.L. Analysis of clonal restriction of mingling in *Xenopus* // Philos. Trans. R. Soc. L. Ser. B. 1985. V. 312. N 1153. P. 57-65.

Jacobson M., Moody S.A. Quantitative lineage analysis of the frog's nervous system. I. Lineage of Rohon-Beard neurons and primary motoneurons // J. Neurosci. 1984. V. 4. P. 1361-1369.

Jonston J.B. The morphology of the forebrain vesicle in vertebrates // J. Comp. Neurol. 1909. V. 19. P. 457-539.

Jonston J.B. Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. V. Survey of forebrain morphology // J. Comp. Neurol. 1923. V. 36. N 2. P. 337-481.

Kageura H., Yamana K. Pattern regulation in isolated halves and blastomeres of early *Xenopus laevis* // J. Embryol. Exp. Morphol. 1983. V. 74. P. 221-234.

Kageura H., Yamana K. Pattern regulation in defect embryos of *Xenopus laevis* // Dev. Biol. 1984. V. 101. P. 410-415.

Kallen B. Neuromery in living and fixed chick embryos // Kgl. Fysiograf. Sällskap. i Lund, Handl. 1955. V. 25. N 9. P. 73-78.

Kallen B. Early morphogenesis and pattern formation in the central nervous system // Organogenesis. Chicago, 1965. P. 107-128.

Kallen B., Lindskog B. Formation and disappearance of neuromery in musculus // Acta Anat. 1953. V. 18. P. 273-282.

Karfunkel P. The role of microtubules and microfilaments in neurulation in *Xenopus* // Dev. Biol. 1971. V. 25. P. 30-56.

Karfunkel P. The activity of microtubules and microfilaments in neurulation in the chick // J. Exp. Zool. 1972. V. 181. P. 289-302.

Karfunkel P. The mechanism of neural tube formation // Int. Rev. Cytol. 1974. V. 38. P. 245-271.

Katz M.J., Lasek R.J., Nauta H.J.W. Ontogeny of substrate pathways and the origin of the neural circuit pattern // Neurosci. 1980. V. 5. P. 821-833.

Keller R.E. Vital dye mapping of the gastrula and neurula of *Xenopus laevis*. I. Prospective areas and morphogenetic of the superficial layer // Dev. Biol. 1975. V. 42. P. 222-241.

Keller R.E. Vital dye mapping of the gastrula and neurula of *Xenopus laevis*. II. Prospective areas and morphogenetic movements of the deep layer // Dev. Biol. 1976. V. 51. P. 118-137.

Keller R. Cell rearrangement in morphogenesis // Zool. Sci. 1987. V. 4. N 5. P. 763-779.

Kimmel C.B., Law R.D. Cell lineage of zebrafish blastomeres. III Clonal analysis of the blastula and gastrula stages // Dev. Biol. 1985. V. 108. P. 94-101.

Kimmel C.B., Warga R.M. Tissue-specific cell lineages originate in the gastrula of the zebrafish // Science, 1986. V. 231. P. 365-368.

Kingsbury B.F. The fundamental plan of the vertebrate brain // J. Comp. Neurol. 1922. V. 34. N 5. P. 461-492.

Kuhlenbeck H. Vorlesungen über das Zentralnervensystem der Wirbeltiere. Jena, 1927.

Langman J., Guerrant R.L., Freeman B.G. Behavior of neuroepithelial cells during closure of the neural tube // J. Comp. Neurol. 1966. V. 127. P. 399-412.

Lansman J.B., Hallam J., Rink T.J. Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? // Nature. 1987. V. 325. P. 811-813.

Lee H.-Y., Kalmus G.W. Effects of cytochalasin B of the morphogenesis of explanted early chick embryos // Growth. 1976. V. 40. P. 153-162.

Lee H.-Y., Nagela R.G. Neural tube defects caused by local anesthetic in aerly embryos // Teratology. 1985. V. 31. P. 119-127.

Le Douarin N. Cell migration in embryos // Cell. 1984. V. 38. P. 353-360.

Lewis J. Genes and segmentation // Nature. 1989. V. 341. P. 382-383.

Linville G.P., Shepard T.H. Neural tube closure defects caused by cytochalasin B // Nature New. Biol. 1972. V. 236. P. 246-247.

Löfberg J., Jacobson C.-O. Effects of vinblastine sulphate, colchicine, and guanosine phosphate on cell morphogenesis during amphibian neurulation // Zoon. 1974. V. 2. P. 85-98.

Lorenz K. Evolution and Modification of Behavior. Chicago, 1965.

Løvtrup S. Morphogenesis in the amphibian embryo. gastrulation and neurulation // Acta Univ. Gothoburgensis Zool. (Goteborg). 1965. V. 1. P. 1-139.

Lunn W.G. The embryology of *Eleutherodactylus nubicola*, an anuran which has no tadpole stage // Contr. Embryol. 1942. V. 30(190). P. 27-62.

Martin A., Langman J. The development of the spinal cord examined by autoradiography // J. Embryol. Exp. Morphol. 1965. V. 14. P. 25-35.

Masho R., Kubota H.Y. Developmental fates of blastomeres of eight-cell-stage *Xenopus laevis* embryos // Dev. Growth Differ. 1986. V. 28. P. 113-123.

Meier S. The development of segmentation in the cranial region of vertebrate embryos // Scann. Electron Microsc. 1982. V. 3. Chicago. P. 1269-1282.

Meier S., Tam P.P.L. Metameric pattern in the embryonic axis of the mouse. I. Differentiation of the cranial segments // Differentiation. 1982. V. 21. N 2. P. 95-108.

Meinhard H. Models of segmentation // Somites Dev. Embryos Proc. Nato Adv. Res. Workshop Glasgow. N.Y.; L., 1986. P. 179-189.

Messier P.-E. Effects of formamide on neuroepithelial cells and on interkinetic nuclear migration in the chick embryo // J. Embryol. Exp. Morphol. 1976. V. 35. P. 197-212.

Messier P.-E., Auclair C. Effects of cytochalasin B on interkinetic nuclear migration in the chick embryo // Dev. Biol. 1974. V. 36. P. 218-223.

Messier P.-E., Auclair C. Alteration of apical junctions and inhibition of interkinetic nuclear migration by cytochalasin B and trypsin // Acta Embryol. Exp. 1977. V. 3. P. 341-356.

Moody S. Fates of the blastomeres of the 16-cell stage *Xenopus* embryo // Dev. Biol. 1987. V. 119. P. 560-578.

Moody S.A. Fates of the blastomeres of the 32-cell stage *Xenopus* embryo // Dev. Biol. 1987. V. 122. P. 300-319.

Moody S.A., Jacobson M. Compartmental relationships between anuran primary spinal motoneurons and somitic muscle fibers that they first innervate // *J. Neurosci.* 1983. V. 3. P. 1670-1682.

Morris C.E., Sigurdson W.J. Stretch-inactivated ion channels coexist with stretch-activated ion channels // *Science*. 1989. V. 243. N 4892. P. 807-809.

Morris-Kay G.M. Growth and development of pattern in the cranial neural epithelium of rat embryos during neurulation // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1981. V. 65. P. 225-241.

Morris-Kay G.M., Tuckett F. The role of microfilaments in cranial neurulation in rat embryos: effects of short-term exposure to cytochalasin D // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1985. V. 88. P. 333-348.

Müller F., O'Rahilly R. The first appearance of the future cerebral hemispheres in the human embryo at stage 14 // *Anat. Embryol.* 1988. V. 177. P. 495-511.

Murphy P., Davidson D.R., Hill R.E. Segment-specific expression of a homeobox-containing gene in the mouse hindbrain // *Nature*. 1989. V. 341. P. 156-159.

Nakamura O., Kishiyama K. Prospective fates of blastomeres at the 32-cell stage of *Xenopus laevis* embryos // *Proc. jap. Acad.* 1971. V. 47. P. 407-412.

Nakamura O., Takasaki H., Nagata A. Further studies of the prospective fates of blastomeres at the 32-cell stage of *Xenopus laevis* embryos // *Med. Biol.* 1978. V. 56. P. 355-360.

Nakatsci N., Jonson K.E. Comparative study of extracellular fibrils on the ectodermal layer in gastrulae of five amphibian species // *J. Cell Sci.* 1983. V. 59. P. 61-70.

Neurulation and the cortical tractor model for epithelial folding // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1986. V. 96. P. 19-49.

Nieuwkoop P.O. Activation and organization of the central nervous system in amphibians. Part III. Synthesis a new working hypothesis // *J. Exp. Zool.* 1952. V. 120. P. 83-108.

Nieuwkoop P.O., Florschütz P.A. Quelques caractères specieux de la gastrulation et de la neurulation de l'oeuf de *Xenopus laevis* Dandin et de quelques autres anoures I. Etude descriptive // *Arch. Biol.* 1950. V. 61. P. 113-150.

Nieuwkoop P.O., Johnen A.G., Albers B. The epigenetic nature of early chordate development. L.; N.Y., 1985.

Nishida H., Satoh N. Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. I. Up to the eightcell stage // *Dev. Biol.* 1983. V. 99. P. 382-394.

O'Rahilly R., Müller F., Hutchins G.M., Moore G.W. Computer renking of the sequence of appearance of features of the brain in staged human embryos. Stages 18 and 19 // *Amer. J. Anatomy*. 1988. V. 182. P. 205-317.

O'Shea S. The cytoskeleton in neurulation: Role of cation // *Progr. in Anatomy*. Cambridge, 1981. V. 1. P. 35-60.

Picouet M.J. Le développement du thalamus de Anoures au cours de la métamorphose // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1975. V. 33. N 2. P. 313-333.

Porter K.R. Cytoplasmic microtubules and function // *Principles of Biomolecular Organization*. Churchill, 1966. P. 308-356.

Puelles L., Domenech-Ratto G., Martinez-de-La-Torre M. Local of the rostral end of the longitudinal brain Axis: review of an old topic in the light of marking experiments on the closing rostral neuropore // *J. Morphol.* 1987. V. 194. P. 163-171.

Purification and reconstruction of chloride channels from kidney and trachea / Landry D.W. et al. // *Science*. 1989. V. 244. P. 1469-1472.

Rakic P. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex // *Brain Res.* 1971. V. 33. P. 471-476.

Ramon-y-Cajal S. Studies on vertebrate neurogenesis. Springfield, 1960.

Turner A., Snape A.M., Wylie C.C., Heasman J. Regional identity is established before gastrulation in the *xenopus* embryo // *J. Exp. Zool.* 1989. V. 251. N 2. P. 245-252.

Ryan T.J. Biochemical consequences of mechanical forces generated by distention and distortion // *J. Amer. Acad. Dermatol.* 1989. V. 21. N 1. P. 115-130.

Sachs F. Baroreceptor mechanisms at the cellular level // *Fed. Proc.* 1987. V. 46. P. 12-16.

Sachs F. Mechanical transduction in biological systems // *Critical Reviews in Biomedical Engineering*. 1988. V. 16. P. 141-169.

Sakai Y. Neurulation in the mouse. I. The ontogenesis of neural segments and the determination of topographical regions in a central nervous system // *Anat. Record*. 1987. V. 218. P. 450-457.

Sakai Y. Neurulation in the mouse: Manner and timing of neural tube closure // *Anat. Record*. 1989. V. 223. P. 194-203.

Saner F.C. Mitosis in the neural tube // *J. Comp. Neurol.* 1935. V. 62. P. 377-405.

Saner F.C. Some factors in the morphogenesis of vertebrate embryonic epithelium // *J. Morphol.* 1937. V. 61. P. 563-579.

Saner M.E., Chittenden A.C. Deoxyribonucleic acid content of cell nuclei in the neural tube of chick embryo: Evidence for intermitotic migration of nuclei // *Exp. Cell Res.* 1959. V. 16. P. 1-16.

Satoh N. Recent advances in our understanding of the temporal control of early embryonic development in amphibians // *Early Amphibian Dev. Meet. Brit. Soc. Dev. Biol. Cambridge*, 1985. P. 257-270.

Schoenwolf G.C. On the morphogenesis of the early rudiments of the developing central nervous system // *Scan. Electron Microsc.* 1982. V. 1. P. 1371-1385.

Schoenwolf G.C. Histological and ultrastructural studies of secondary neurulation in mouse embryos // *Am. J. Anat.* 1984. V. 169. P. 361-376.

Schoenwolf G.C. Shaping and bending of the avian neuroepithelium: morphometric analysis // *Dev. Biol.* 1985. V. 109. P. 127-139.

Schoenwolf G.C., Desmond M.E. Neural tube occlusion precedes rapid brain enlargement // *J. Exp. Zool.* 1984. V. 230. N 3. P. 405-407.

Schoenwolf G.C., Folsom D., Moc A. A reexamination of the role microfilaments in neurulation in the chick embryo // *Anat. Rec.* 1988. V. 220. N 1. P. 87-102.

Schoenwolf G.C., Franks M.V. Quantitative analysis of changes in cell shapes during bending of the avian neural plate // *Dev. Biol.* 1984. V. 105. P. 257-272.

Schoenwolf G.C., Powers M.L. Shaping of the chick neuroepithelium during primary and secondary neurulation: Role of cell elongation // *Anat. Rec.* 1987. V. 218. P. 181-195.

Schroeder T.E. Neurulation in *Xenopus laevis*. An analysis and model based upon light and electron microscopy // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1970. V. 23. P. 427-462.

Schroeder T.E. Cell constriction: contractile role of microfilaments in division and development // *Amer. Zool.* 1973. V. 13. P. 942-960.

Segmental expression of Hox-2 homeobox-containing genes in the developing mouse hindbrain // *Nature*. 1989. V. 341. P. 405-409.

Selman G.G. The forces producing neural clouding in amphibia // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1958. V. 6. P. 448-456.

Shepard P., Jacobson M. Clonal restriction boundaries in *xenopus* embryos shown with two intracellular lineage tracers // *Science*. 1987. V. 236. P. 851-854.

Shepard T.H., Greenaway J.C. Teratogenicity of cytochalasin D in the mouse // *Teratology*. 1977. V. 16. P. 131-136.

Smedley M.J., Stanisstreet M. Calcium and neurulation in mammalian embryos. II. Effects of cytoskeletal inhibitors and calcium antagonists on the neural folds of rat embryos // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1986. V. 93. P. 167-178.

Smith J.C. Disorganized embryos? // *Nature*. 1983. V. 302. N 5910. P. 658-659.

Smith J.C., Slack J.M.W. Dorsalization and neural induction properties of the organizer in *xenopus laevis* // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1984. V. 78. P. 279-317.

Smith J.C., Schoenwolf G.C. Role of cell-cycle in regulating neuroepithelial cell shape during bending of the chick neural plate // *Cell Tissue Res.* 1988. V. 252. P. 491-500.

Spemann H. Experimentelle Beiträge zu einer theorie der Entwicklung. Berlin, 1936.

Spemann H., Mangold H. Über Induction von Embryonalanlage durch Implantation artfremder Organisatoren // *W. Roux' Arch. Entwicklungsmech. Organism.* 1924. Bd. 100. S. 599-638.

Stannius H. Handbuch der Anatomie der Wirbelthiere. Buch. 2. Die Amphibien. Berlin, 1856.

Sten G.S. Strength and weakness of the genetic approach to the development of the nervous system // *Ann. rev. Neurosci.* 1981. V. 4. P. 163-173.

Sumi R. Über die Morphogenese des Gehirns von *Hynobius nebulosus* // *Folia Anat. Jap.* 1926. Bd. 4. H. 3-4. S. 171-270.

Suzuki A.S., Harada K. Prospective neural areas and their morphogenetic movements during neural plate formation of *xenopus* embryos. I. Development of vegetal half embryos and chimera embryos // Dev. Growth Differ. 1986. V. 28. P. 519-529.

Takasaki H. Fates and roles of the presumptive organizer region in the 32-cell embryo in normal development of *Xenopus laevis* // Dev. Growth Differ. 1987. V. 29. N 2. P. 141-152.

Tam P.P.L., Meier S., Jacobson A.G. Differentiation of the metameric pattern in the embryonic axis of the mouse // Differentiation. 1982. V. 21. P. 109-122.

The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Sulston J.E. et al. // Dev. Biol. 1983. V. 100. P. 64-119.

The formation of the neural tube in rat embryos, cultured in vitro, studied with teratogens. Smiths-van Prooije A. et al. // Acta Histochem. 1986. V. 32. P. 41-45.

The nature of developmental restriction in *Xenopus laevis* embryos. Heasman J. et al. // J. Embryol. Exp. Med. 1986. V. 97. P. 65-73.

The role of extracellular material in chick neurulation. I. Effects of concanavalin A. Lee H.-Y. et al. // J. Exp. Zool. 1976. V. 198. P. 261-266.

Trinkaus J.P. Further thoughts on directional cell movement during morphogenesis // J. Neurosci. Res. 1985. V. 13. N 1-2. P. 1-19.

Tseng Mi-pai, Wang Xing-ming. Шиянь шэньху сюэбао // Acta Biol. Exp. Sin. 1984. V. 17. N 2. P. 219-243.

Tuckett F., Morriss-Kay G.M. The kinetic behaviour of the cranial neural epithelium during neurulation in the rat embryo // J. Embryol. Exp. Morphol. 1985 a. V. 85. P. 111-119.

Tuckett F., Morriss-Kay G.M. The ontogenesis of cranial neuromeres in the rat embryo. II. A transmission electron microscope study // J. Embryol. Exp. Morphol. 1985 b. V. 88. P. 231-247.

Tuckett F., Morriss-Kay G.M. The distribution of fibronectin, laminin and entactin in the neurulation rat embryo studied by indirect immunofluorescence // J. Embryol. Exp. Morphol. 1986. V. 94. P. 95-112.

Ueck M. Ontogenetic development of the pineal organ // Neuroendocrinol. Lett. 1986. V. 7. N 3. P. 1-126.

Vaage S. The segmentation of the primitive neural tube in chick embryos (*Gallus domesticus*). A morphological, histochemical and autoradiographic investigation // Ergebn. Anat. Entw. Gesch. 1969. V. 41. P. 3-87.

Vogt W. Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit örtlicher Vitalfärbung. I. Methodik und Wirkungsweise der örtlichen Vitalfärbung mit Agar als Färbeträger // Arch. Entw.-Mech. Organ. 1925. Bd. 106. S. 542-610.

Vogt W. Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit örtlicher Vitalfärbung. II. gastrulation und Mesodermbildung bei Urodelen und Anuren // Arch. Entw.-Mech. Organ. 1929. Bd. 120. S. 384-706.

Waddington C.H., Perry M.M. A note on the mechanism of cell deformation in the neural folds of the amphibian // Exp. Cell. Res. 1966. V. 41. P. 691-693.

Watterston R.L. Structure and mitotic behavior of the early neural tube // Organogenesis. N.Y., 1965. P. 129-159.

Warren J. The development of the parathyroid and pineal region in *necturus maculatus* // Am. J. Anat. 1905. V. 5. P. 1-29.

Webster W., Langman J. The effect of cytochalasin B on the neuroepithelial cells of the mouse embryo // Am. J. Anat. 1978. V. 152. P. 209-229.

Weisblat D.A., Kim S.Y., Stent G.S. Embryonic origins of cells in the leech *Helobdella triseriata* // Dev. Biol. 1984. V. 104. P. 65-85.

Weisblat D.A., Harper G., Stent G.S., et al. Embryonic cell lineages in the nervous system of the glossiphoniid leech *Helobdella triseriata* // Dev. Biol. 1980. V. 76. P. 58-78.

Wiley M.J. The effects of cytochalasins on the ultrastructure of neurulating hamster embryos in vivo // Teratology. 1980. V. 22. P. 59-69.

Yamazaki-Yamamoto K. A relevant method for estimating cell cycle of developing cell: The conspicuous lengthening of  $T_s$  during the early neural development of *Cynops* embryo // Growth Differ. 1985. V. 27. N 2. P. 155-165.

Ziomek C.A., Johnson M.N. Properties of polar and apolar cells from the 16-cell mouse morula // Wilhelm Roux's Arch. 1981. V. 190. P. 287-296.

Ziomek C.A., Johnson M.N., Handyside A.H. The developmental potential of mouse 16-cell blastomeres // J. Exp. Zool. 1982. V. 221. P. 345-355.

Zwaan J., Bryan P.R.J., Pearce T.L. Interkinetic nuclear migration during the early stages of lens formation in the chicken embryo // J. Embryol. Exp. Morphol. 1969. V. 21. P. 71-83.

Zwaan J., Hendrix R.W. Changes in cell and organ shape during early development of the ocular lens // Am. Zool. 1973. V. 13. P. 1039-1049.

Научное издание

Савельев Сергей Вячеславович

Формообразование мозга позвоночных

Зав. редакцией *И.И. Шегура*

Редактор *Г.Г. Есакова*

Художественный редактор *Ю.М. Добрянская*

Переплет художника *В.С. Казаков*

Технический редактор *К.Е. Панкратьева*

Оператор ПЭВМ *Е.Г. Иванов*

Н/К

Сдано в набор 20.04.93. Подписано в печать 17.05.93.

Формат 60 x 90/16. Бумага кн.-журн. офс.

Гарнитура литературная. Офсетная печать.

Усл. печ. л. 9,0. Уч.-изд. л. 10,02.

Тираж 1000 экз. Заказ 1145 Изд. № 2241.

Техническое редактирование и подготовка оригинал-макета  
выполнены в Лаборатории Вычислительных Методов  
механико-математического факультета МГУ

Ордена "Знак Почета" издательство Московского университета.

103009, Москва, ул. Герцена, 5/7.

Типография ордена "Знак Почета" изд-ва МГУ.

119899, Москва, Ленинские горы.